

Resumen

Las actividades relacionadas con el ADN como la transcripción, replicación, recombinación y reparación implican cambios en la estructura del ADN y en la organización de la cromatina. Estos cambios estructurales dependen de su interacción con proteínas.

Las proteínas HMGA1 (*High Mobility Group A1*) son miembros de una superfamilia de proteínas de baja masa molecular, se encuentran en el núcleo de las células y modifican la conformación espacial del ADN. Actúan como factores de transcripción arquitectónicos regulando la expresión de numerosos genes. De esta manera influyen en muchos procesos celulares como el crecimiento, el desarrollo embrionario, la diferenciación, la proliferación y la muerte celular.

Por otro lado, este grupo de proteínas está relacionado con algunos procesos que afectan negativamente el desarrollo normal de la célula como la integración de los retrovirus en la cromatina, la inducción de la transformación neoplásica y la promoción de la metástasis, participando así en procesos celulares patológicos como la obesidad, la diabetes, la arteriosclerosis y el cáncer.

Los genes de la proteína HMGA1a humana son altamente expresados durante la embriogénesis y prácticamente en todos los cánceres agresivos humanos.

Las interacciones HMGA1a-ADN se dan a través de los motivos de unión al ADN denominados *AT-hooks*, los cuales se unen preferentemente a regiones ricas en AT (adeninas y timinas), en el surco estrecho del ADN. Las proteínas HMGA1a cuentan con tres motivos *AT-hooks*.

Asimismo, se han encontrado una variedad de moléculas pequeñas, naturales o sintéticas, que interaccionan con secuencias de ADN en el mismo sitio de reconocimiento que las proteínas HMGA1a, es decir, drogas que preferentemente se unen al surco estrecho del ADN en regiones ricas en adenina y timina.

Para entender mejor el mecanismo por el cual estas proteínas y fármacos se unen al surco estrecho del ADN es necesario determinar la estructura tridimensional de sus complejos con ADN. Con ello, es posible proporcionar información valiosa para el estudio de las patologías relacionadas con la sobreexpresión de la HMGA1a y el diseño de nuevos tipos de agentes terapéuticos.





Abstract

The DNA-related activities, such as transcription, replication, recombination and repair, involve changes in the structure of the DNA and in the organization of the chromatin fiber. These structural changes depend on the DNA-protein and protein-protein interactions.

The High Mobility Group 1 (HMGA1) proteins are members of a superfamily of low molecular weight proteins, which are located in the cellular nucleus and modify the spatial conformation of DNA. These proteins act as architectural transcription factors that regulate the expression of several genes. Therefore, HMGA1 proteins affect many cellular processes such as growth, embryonic development, differentiation, proliferation and apoptosis.

Furthermore, this group of proteins is related to some processes that negatively affect the normal cell development, including the integration of retroviruses into genomes, the induction of neoplastic cell transformation and metastatic tumor progression, leading to pathological processes for instance the obesity, diabetes, atherosclerosis and cancer.

The HMGA1a gen is highly expressed during embryogenesis and practically in all human aggressive cancers.

The HMGA1a-DNA interactions occur through DNA-binding motifs called *AT-hooks*, which preferentially bind to the minor groove of chromosomal DNA at AT-rich (adenine and thymine rich) regions. Each protein contains three *AT-hooks* motifs.

In addition, a variety of small molecules, natural or synthetic, have been found to interact within DNA sequences at the same recognition site as the HMGA1a proteins, *i.e.* drugs that preferentially bind to the minor groove of AT-rich DNA.

For better understanding the mechanism by which these proteins and drugs bind to the minor groove of DNA, it is necessary to determine the three-dimensional structure of their complexes with DNA. Thus, valuable information will be provided to study pathologies related to the HMGA1a overexpression and design new types of therapeutic agents.





Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1 Prefacio.....	9
1.1 Origen del proyecto	9
2 Introducción.....	11
2.1 Objetivos del proyecto	11
2.2 Alcance del proyecto	11
3 El ADN y su unión con proteínas y drogas.....	13
3.1 El ADN	13
3.2 Las proteínas HMGA y su unión con el ADN	17
3.3 Drogas de unión al surco estrecho del ADN	22
3.3.1 La droga P10	24
3.3.2 La droga R05	25
4 Materiales y Métodos	27
4.1 Obtención de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) humana en <i>Escherichia coli</i>	28
4.1.1 Transformación, inducción y expresión	30
4.1.2 Tratamiento del sedimento bacteriano	32
4.2 Purificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91)	33
4.2.1 Cromatografía de intercambio iónico.....	34
4.2.2 Cromatografía de exclusión molecular	36
4.2.3 Diálisis y concentración de la HMGA1a(Δ 50-91).....	38
4.2.4 Cuantificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91).....	42
4.3 Métodos electroforéticos	43
4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	45
4.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-ácido acético-urea (AU-PAGE)	49
4.3.3 Electroforesis en geles EMSA	52
4.4 Preparación de oligonucleótidos	55
4.5 Preparación de fármacos de unión al surco estrecho del ADN	57
4.6 Estudios cristalográficos	57



4.6.1	Fundamentos de la cristalización	57
4.6.2	Condiciones para la cristalización	59
4.6.3	Metodología de cristalización: Cristalización por difusión de vapor	60
4.7	La cristalografía de rayos X.....	63
4.7.1	Estructura cristalina	63
4.7.2	Difracción de rayos X.....	65
5	Resultados y Discusión	69
5.1	Obtención de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) humana en <i>Escherichia coli</i>	69
5.2	Purificación cromatográfica de la proteína	71
5.2.1	Cromatografía de intercambio catiónico	71
5.2.2	Cromatografía de exclusión molecular	77
5.3	Preparación y cuantificación de las muestras de oligonucleótido	85
5.4	Preparación de las muestras de fármacos	87
5.5	Estudios cristalográficos con HMGA1a(Δ 50-91)	87
5.5.1	Análisis de la interacción HMGA1a(Δ 50-91)-CCAATAATCGCGATTATTGG mediante gel EMSA	88
5.5.2	Ensayos cristalográficos del oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG con la proteína HMGA1a(Δ 50-91)	89
5.6	Estudios cristalográficos con fármacos de unión al surco estrecho del ADN.....	92
5.6.1	Ensayos cristalográficos de los oligonucleótidos A(AT) ₅ T y C(AT) ₄ G con la droga P10.....	93
5.6.2	Ensayos cristalográficos de los oligonucleótidos A(AT) ₅ T y C(AT) ₄ G con la droga R05	96
5.6.3	Análisis de los diagramas de difracción.....	100
6	CONCLUSIONES.....	103
7	BIBLIOGRAFÍA.....	107
7.1	Referencias bibliográficas	107
7.2	Bibliografía complementaria	110
8	ANEXO: Ensayos cristalográficos realizados	111



Glosario

A	Adenina
Ac.	Acetato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Antibiótico ampicilina
amp ^R	Gen de resistencia al antibiótico ampicilina
AT	Adenina - Timina
<i>AT-hook</i>	Dominio de unión al ADN de las proteínas HMGA
C	Citosina
C-terminal	Extremo carboxilo terminal de un péptido o de una proteína
Cac	Cacodilato (dimetil-arseniato)
CM	Carboximetil celulosa
DMAC	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	<i>Electroforesis Mobility Shift Assay</i>
Fig.	Figura
Fr.	Fracción
G	Guanina
GPAU	Gel electroforético de poliacrilamida-ácido acético-urea
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-ácido etansulfónico]
HMG	<i>High Mobility Group</i>
IDP	<i>Intrinsically disordered proteins</i>



IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Isop.	Isopropanol
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
MGBDs	<i>Minor groove binding drugs</i>
MP	Muestra de partida (muestra que se carga en la columna cromatográfica)
MPD	2-metil-2,4 pentanodiol
mQ	Agua milliQ®. Agua ultrapura
MWCO	<i>Molecular weight cut off.</i>
O.N.	<i>Overnight</i>
PAGE	<i>Poliacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Par de bases
PEG	Polietilenglicol
PRAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PSA	Persulfato amónico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T	Timina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TZD	Tiazolidinediona
UV	Ultravioleta



1 Prefacio

1.1 Origen del proyecto

El ADN es la molécula que codifica la información genética necesaria para el desarrollo y funcionamiento de los organismos vivos. Debido a su importancia esencial y a la complejidad estructural que posee es una de las macromoléculas más estudiadas actualmente.

La estructura del ADN está fuertemente relacionada con su función. Además, se sabe que dicha estructura puede ser alterada por otras moléculas que interactúan con algunas zonas específicas del ADN.

Entre estas moléculas se encuentran las proteínas HMGA, las cuales se unen al surco estrecho del ADN en secuencias ricas en adeninas (A) y timinas (T) por tres regiones denominadas *AT-hooks*. Por otra parte, existen fármacos que interactúan con el surco estrecho del ADN en el mismo tipo de secuencias que las HMGA.

La importancia de las secuencias ricas en ATs no solamente recae en la interacción con proteínas y drogas, sino que además se sabe que estas secuencias son altamente repetidas en el genoma de la mayoría de los organismos y se desconoce con certeza su función.

Existen numerosos estudios que aportan información importante acerca de las proteínas HMGA. Sin embargo, se desconoce en gran medida el mecanismo de acción de estas proteínas en los procesos celulares en los que participa.

En este trabajo se pretende estudiar la estructura tridimensional de los dominios funcionales de la HMGA1a interactuando con fragmentos de ADN rico en adeninas y timinas. Además, intentaremos conocer la estructura tridimensional de complejos de ADN ricos en ATs con dos fármacos de unión al surco estrecho del ADN (MGBDs).





2 Introducción

2.1 Objetivos del proyecto

Los objetivos concretos de este proyecto son el estudio de las estructuras tridimensionales de los complejos de oligonucleótidos sintéticos con secuencias específicas ricas en adeninas y timinas con un fragmento de la proteína HMGA1a [HMGA1a(Δ 50-91)], así como con dos fármacos que se unen al surco estrecho del ADN (MGBDs): 1) la droga P10 y, 2) la droga R05.

El fragmento HMGA1a(Δ 50-91) corresponde a la región entre los aminoácidos 50 y 91 de la proteína HMGA1a humana y contiene dos de los tres dominios de unión al ADN de la proteína (los *AT-hooks* 2 y 3). Dicho fragmento se obtendrá mediante su expresión en la bacteria *Escherichia coli* utilizando la técnica del ADN recombinante. Posteriormente, se purificará la proteína hasta alcanzar el grado de pureza necesaria para los ensayos cristalográficos.

A continuación, se harán distintos ensayos cristográficos por medio de la técnica de difusión de vapor con gota colgada, tanto de los complejos ADN-HMGA1a(Δ 50-91) como de los complejos ADN-MGBDs. Los mejores cristales obtenidos de estos ensayos se difractarán en las instalaciones de la Plataforma Cristalográfica del Parc Científic de Barcelona y en el Sincrotrón Alba de Barcelona.

2.2 Alcance del proyecto

El proyecto comprende las siguientes etapas:

- Expresión de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) en un cultivo de la bacteria *E. coli* (cepa Rosetta (DE3) pLysS).
- Purificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) recombinante por medio de cromatografía de intercambio catiónico seguida de cromatografía de exclusión molecular.
- Análisis de la interacción entre la HMGA1a(Δ 50-91) y el oligonucleótido de secuencia CCAATAATCGCGATTATTGG, para determinar las condiciones de cristalización del complejo más favorables.



-
- Ensayos cristalográficos con la proteína HMGA1a(Δ 50-91) obtenida y el oligonucleótido de secuencia CCAATAATCGCGATTATTGG.
 - Ensayos cristalográficos de los complejos de las drogas P10 y R05 con las siguientes secuencias ricas en AT:
 - AATATATATATT [A(AT)₅T]
 - CATATATATG [C(AT)₄G]
 - Difracción de rayos X en la Plataforma Cristalográfica del Parc Científic de Barcelona y en el Sincrotrón Alba de Barcelona de los mejores cristales obtenidos y análisis de sus diagramas de difracción.



3 El ADN y su unión con proteínas y drogas

3.1 El ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una de las moléculas esenciales para todos los organismos vivos. Esta molécula es un biopolímero formado por la unión de nucleótidos, constituidos a su vez por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato (Fig. 3-1).

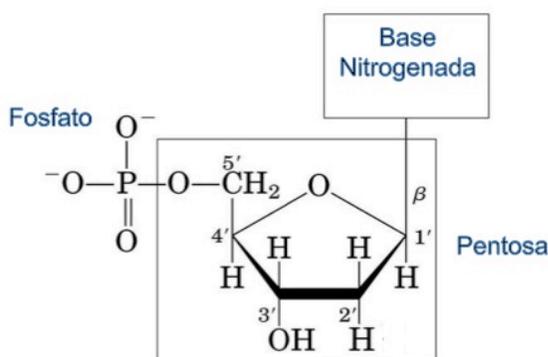


Fig. 3-1. Las tres subunidades de un nucleótido de ADN: una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos (la 2-desoxirribosa) y un grupo fosfato.

Se denomina ácido desoxirribonucleico debido a que el azúcar que contiene es la pentosa β-D-2-desoxirribosa. Unido al carbono 1' de la pentosa se encuentra la base nitrogenada, la cual puede ser una purina (adenina (A) o guanina (G)), o bien, una pirimidina (citosina (C) o timina (T)) (Fig. 3-2.). Asimismo, los nucleótidos se unen entre sí por medio de enlaces fosfodiéster entre el carbono 3' de la pentosa de un nucleótido y el carbono 5' de la pentosa de otro.

Las moléculas de ADN forman una doble hélice formada por dos largas cadenas de nucleótidos en posición antiparalela, es decir, una de las hebras tiene orientación 5' → 3' y la otra hebra se orienta 3' → 5' (Fig. 3-3).



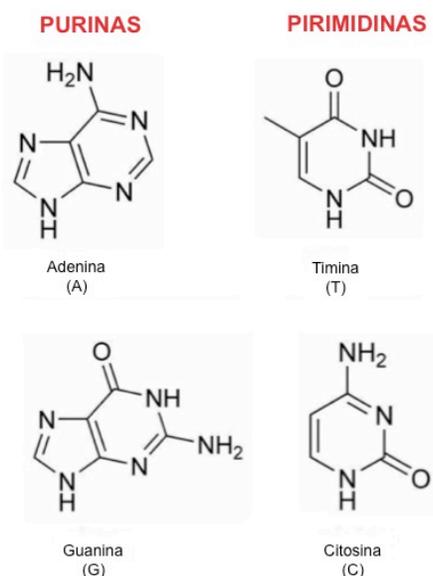


Fig. 3-2. Estructuras químicas de las bases nitrogenadas del ADN. A la izquierda las purinas: adenina y guanina; a la derecha las pirimidinas: timina y citosina.

La doble hélice se mantiene estable debido a la formación de puentes de hidrógeno entre las bases asociadas a cada una de las dos hebras de la hélice. La base de una hebra forma un enlace únicamente con un tipo de base de la otra hebra, a esto se le denomina complementariedad de las bases. Así, las purinas forman enlaces con las pirimidinas, de manera que A se une solamente a T y C se une únicamente a G, formando dos y tres puentes de hidrógeno respectivamente (Fig. 3-3). El fundamento bioquímico de este apareamiento de bases fue propuesto en 1953 por Watson y Crick en base a los datos obtenidos de ensayos analíticos y estudios de difracción de rayos X por Rosalind Franklin (Watson y Crick, 1953). La propuesta de estos autores consistía en dos cadenas de nucleótidos enrolladas entre sí formando una doble hélice dextrógira, a la que más tarde denominaron estructura secundaria de forma B.

La estructura propuesta por Watson y Crick es la forma predominante en las células. La forma B presenta un diámetro aproximado de 20 Å, diez pares de bases (pb) por vuelta y un paso de hélice de 33.8 Å, por lo que tiene una distancia entre pares de bases de aproximadamente 3.38 Å.



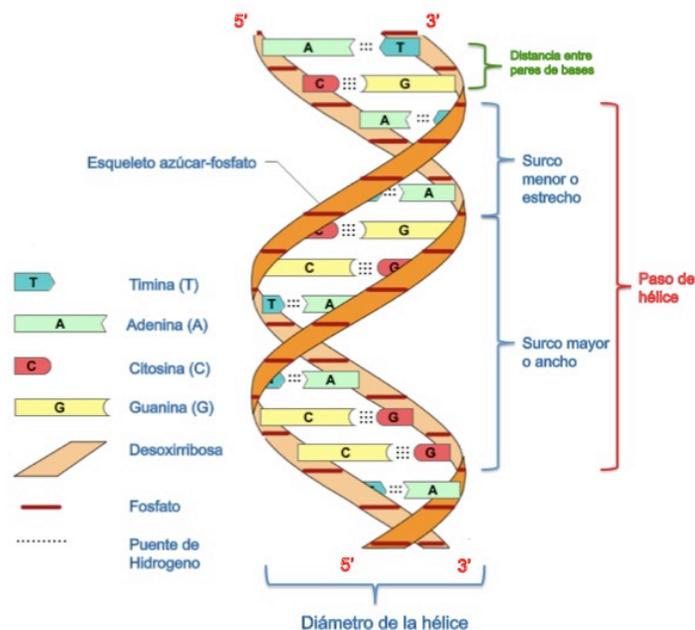


Fig. 3-3. Esquema de la estructura secundaria del ADN. Se muestra el esqueleto azúcar-fosfato formando la doble hélice y las cuatro bases nitrogenadas en su interior. Se señalan los parámetros principales de la doble hélice. (Adaptado de <http://gema-miblogdecmc.blogspot.com.es/2012/04/elimpre-scindible-de-la-vida-ej-1-t-5.html>).

Sin embargo, la forma B no es la única estructura secundaria que existe. El ADN también se puede encontrar en forma A, forma Z, forma C y forma D. Asimismo, al apareamiento de bases que propone Watson y Crick se le suman otros que también adopta el ADN, entre ellos el Hoogsteen (Hoogsteen, 1959). Este tipo de apareamiento de bases presenta distintos enlaces por puentes de hidrógeno que el apareamiento Watson y Crick debido a que las purinas están giradas 180° respecto al enlace glucosídico.

Las funciones biológicas del ADN incluyen el almacenamiento de toda la información genética (secuencia de genes y genoma), la transcripción a ARN y posterior traducción a proteínas, y la duplicación del material genético para transmitir la información a las células hijas durante la división celular.

La secuencia de ADN que conforma el genoma humano contiene codificada información en forma de genes. Las secuencias relacionadas con los genes representan sólo el 30% del total del genoma. El otro 70% de ADN se le denomina ADN extragénico. Alrededor del 70% del ADN



extragénico corresponde a secuencias repetitivas de ADN (cerca del 50% del total del genoma humano). Además, el 95% de las secuencias relacionadas con los genes no codifican, por lo que sólo el 1,5% del total del genoma humano son secuencias que codifican proteínas (Lander *et al.*, 2001).

A pesar de que las regiones repetitivas de ADN extragénico constituyen la mayor parte del genoma humano y del hecho de presentar un alto grado de conservación evolutiva, no se conoce mucho sobre la función que desempeñan. Estas secuencias repetitivas están compuestas por una elevada cantidad de adeninas y timinas (Lander, *et al.* 2001), y aunque no se sabe concretamente, se cree que juegan un rol estructural en la función del genoma.

La doble hélice de ADN rica en AT presenta distintas formas estructurales (forma B y D) dependiendo de la humedad relativa, del tipo de cationes y de la concentración de sal en la que se encuentra (Leslie *et al.*, 1980). El primer oligonucleótido conteniendo sólo AT del que se determinó su estructura por medio de rayos X fue el ATAT (Viswamitra *et al.*, 1982). Esta estructura contenía una doble hélice dextrógira antiparalela con enlaces puente de hidrógeno entre adeninas y timinas tipo Watson y Crick. Sin embargo, posteriormente se demostró que oligonucleótidos ricos en AT en ocasiones formaban doble cadena con pares de bases Hoogsteen (Abrescia *et al.*, 2004). Hay estudios que demuestran que algunos oligonucleótidos que contienen solamente pares de bases AT presentan polimorfismos en su estructura dependiendo de la concentración de sales y de la temperatura a la que se encuentran (Zuo *et al.*, 1990).

Por lo anterior, resulta interesante el estudio de la estructura y función de las abundantes secuencias ATs no codificantes que conforman el genoma. Estas regiones no se presentan únicamente en el genoma humano sino que también aparecen en el de otras especies (Campos *et al.*, 2006).

El grupo de investigación MACROM estudia oligonucleótidos ricos en AT y su interacción con drogas, proteínas y péptidos. Estudios estructurales de varias secuencias ricas en AT con drogas como la pentamidina muestran que distintas secuencias adoptan distintas conformaciones, distinguiéndose la secuencia d(ATATATATAT)₂ con una conformación de hélice superenrollada de forma B estándar alternando pares de bases Watson y Crick, y Hoogsteen. En dicha estructura, la parte central de la droga se une al surco estrecho de esta



hélice (Moreno *et al.*, 2010). Por otro lado, recientemente lograron por primera vez presentar la estructura tridimensional de un complejo de oligonucleótido rico en AT con un péptido correspondiente a un *AT-hook* (el *AT-hook* 3 de la proteína HMGA1a) (Fonfría-Subirós *et al.*, 2012).

3.2 Las proteínas HMGA y su unión con el ADN

Las proteínas HMG (*High Mobility Group*; proteínas de alta movilidad durante separaciones electroforéticas) son proteínas cromosomales no histonas que regulan y facilitan varias actividades relacionadas con el ADN como la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación (Bustin, 1999).

Las HMG son una familia de proteínas muy abundantes en las células de los organismos, están unidas al ADN o a nucleosomas de todas las células eucariotas y actúan como elementos arquitectónicos, es decir, provocan cambios estructurales en la cromatina. La fidelidad de la expresión génica está altamente regulada por la estructura de las fibras de cromatina que tienen relación con cambios estructurales del ADN y con la actividad de la cromatina, así se sabe que estas proteínas tienen una influencia importante en el correcto o incorrecto desarrollo celular (Hock *et al.*, 2007). La familia de proteínas HMG se clasifica en tres: las HMGA, las HMGB y las HMGN (Fig. 3-4).

La subfamilia de proteínas HMGA (anteriormente llamadas HMG-I/Y) ha suscitado especial interés debido a sus inusuales características y a su versatilidad biológica (Reeves, 2001). Las proteínas HMGA se unen al surco estrecho del ADN en pequeños tramos ricos en Adenina-Timina (AT) por medio de regiones denominadas "*AT-hooks*". Estos dominios funcionales de unión al ADN, característicos de las proteínas HMGA, son altamente conservados en la evolución (Reeves, 2001; Fusco y Fedele, 2010).



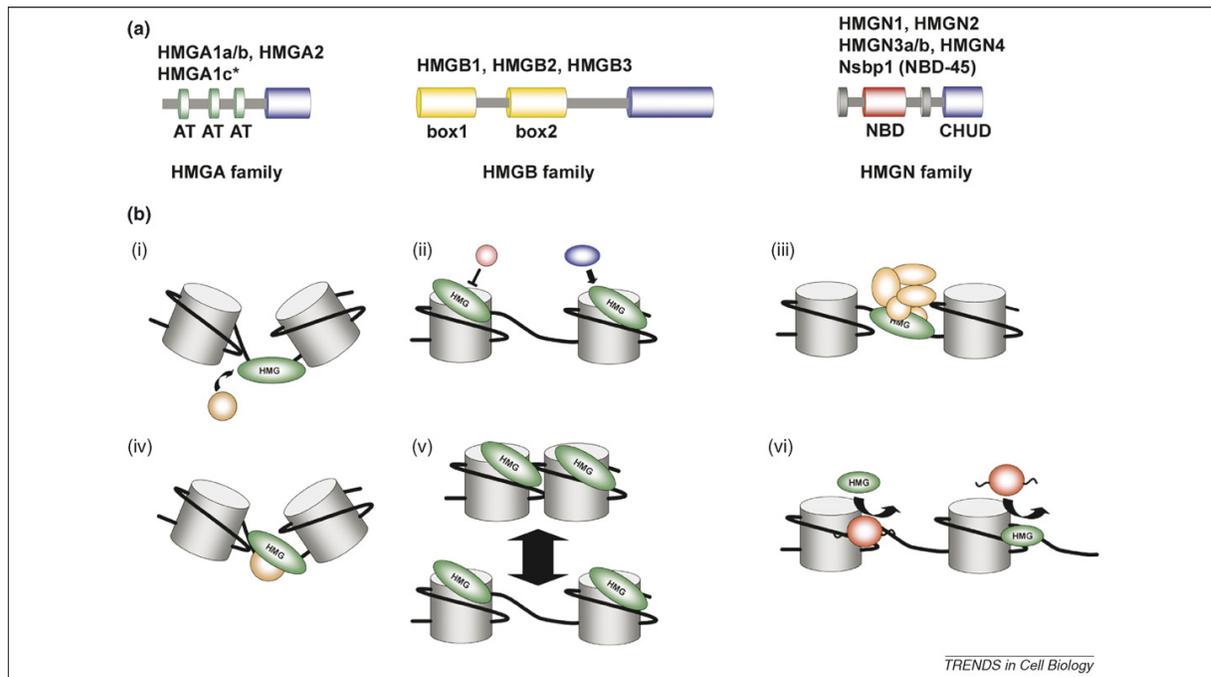


Fig. 3-4. Funciones arquitectónicas de las proteínas HMG. **(a)** Las principales características estructurales de las HMG. La familia HMGA contiene tres *AT-hooks* (en verde) y un extremo C-terminal ácido (en azul), excepto la HMGA1c que contiene sólo dos *AT-hooks* (*). Las HMGB contienen dos *HMGB-boxes* (en amarillo) y un largo extremo C-terminal ácido (en azul). Las HMGN se caracterizan por un dominio NBD cargado positivamente (en rojo) y una región C-terminal cargada negativamente llamada dominio CHUD (en azul). **(b)** Las HMG pueden alterar la estructura de la cromatina a través de una variedad de mecanismos. (i,ii) Las HMG (en verde) alteran la estructura de la cromatina y facilitan la unión de factores adicionales. Esto puede ser a través de (i) la flexión del ADN (como en el caso de las HMGA y HMGB), o (ii) previniendo o facilitando el acceso de los factores de modulación de la cromatina (como en el caso de la HMGN y quizás la HMGA). (iii) Las HMG son parte del módulo de unión a la cromatina de los complejos multiproteicos. (iv) Las HMG facilitan transiciones estructurales en sitios diana por medio de factores específicos de regulación. (v) Despliegamiento de la cromatina inducido por las HMGN y plegamiento (compactación) de la cromatina por medio de las proteínas HMGA. (vi) Las HMG compiten con otras proteínas nucleares por los sitios de unión a la cromatina alterando la estructura local o global de las fibras de cromatina (Hock *et al.*, 2007).

Las proteínas HMGA comprenden un grupo de cuatro proteínas (HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c y HMGA2) que están codificadas por dos genes distintos. Las tres proteínas HMGA1 son productos del mismo gen pero con *splicing* alternativo mientras que la HMGA2 está codificada por un gen distinto (Fusco y Fedele, 2007) (Fig. 3-5). Los genes que codifican estas proteínas son ampliamente expresados durante la embriogénesis, ya que las HMGA están relacionadas con el crecimiento celular, la diferenciación y el desarrollo del embrión (Reeves, 2001); por otra parte, estos genes son muy poco o nada activos en tejidos adultos (Fusco and Fedele, 2007).



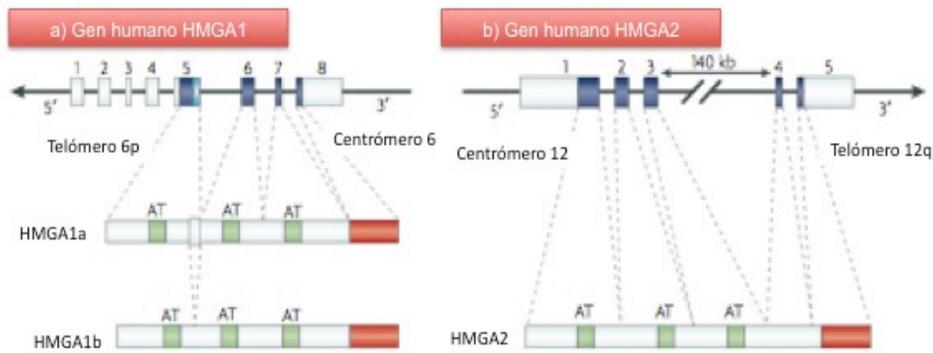


Fig. 3-5. Esquema de genes y proteínas HMGA (Adaptado de Fusco y Fedele 2007).

Los miembros de la familia de las HMGA contienen tres *AT-hooks* y un extremo carboxilo terminal ácido (Fig. 3-6) del cual se desconoce su función aunque se cree pudiera intervenir en la interacción con otras proteínas. Las HMGA no presentan capacidad como activadores transcripcionales directos sino que regulan la expresión de genes cambiando la conformación del ADN al unirse a él en regiones ricas en AT (Cleynen y van de Ven, 2008).

Las proteínas HMGA en solución son intrínsecamente desordenadas, es decir, no poseen estructura fija secundaria ni terciaria. Sin embargo, estas proteínas adquieren cierta estructura cuando se unen al ADN o a algún sustrato. Los elementos centrales de los *AT-hooks* (Fig. 3-6) son los que interactúan con el ADN y provocan cambios estructurales en él.

HMGA1a	1	MSESSKSSQPLASKQEKDGT---EKRGGRPRKQPPVSPGTALVGSQKEPSEVPTPKRPRGRPKGSKNKGAAKT--RKT	75
HMGA1b	1	MSESSKSSQPLASKQEKDGT---EKRGGRPRKQP-----SKEPSEVPTPKRPRGRPKGSKNKGTAKT--RKV	64
HMGA1c	1	MSESSKSSQPLASKQEKDGT---EKRGGRPRKQPPVSPGTALVGSQKEPSEVPTPKRPRGRPKGSKKNWRRRK--RRA	75
HMGA2	1	MSARGEGAGQPSTSAQGQFAA ^{pap} QKRGGRPRKQ-----QQEPTGEPSPKRPGRPKGSKNKSPSKAaqKKA	68
HMGA1a	76	TTTPGRKPRGRPKK-----LEEEEEEGISQESSEEEQ-----	107
HMGA1b	65	TTTPGRKPRGRPKK-----LEEEEEEGISQESSEEEQ-----	96
HMGA1c	76	SR---RSPRRR-----SSDPCVppaphwrssflglidsaplppppplpqahhhhrllwppp	127
HMGA2	69	EATGEKRPGRPKKwpqqvqqkpaQEEETEETSSQESAEED-----	109
HMGA1c	128	psstcaltttlhstpaaglpwaewgavfwpqfppappahprihtcpgggg	179

Fig. 3-6. Alineación de los aminoácidos presentes en la estructura primaria de las proteínas HMGA humanas. Realizado en BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>. En letras rojas se destacan las secuencias idénticas y en minúsculas las secuencias únicas. El recuadro verde subraya el centro de cada *AT-hook* y el recuadro lila el extremo ácido C-terminal.



La secuencia de aminoácidos en la zona de interacción de las HMGA es siempre (P)RGRP, la prolina (P) inicial es sustituida por una glicina (G) en el *AT-hook* 1 (Fig. 3-7). Estudios de RMN realizados con la forma HMGA1a(Δ 50-91) (región correspondiente a los aminoácidos 50-91 de la proteína HMGA1a y que contiene, por tanto, los *AT-hooks* 2 y 3) han podido determinar que el fragmento RGR tiene una estructura totalmente estirada, que se adapta perfectamente al surco estrecho del ADN con secuencias AT (Geierstanger *et al.*, 1994; Huth *et al.*, 1997). Además, estudios recientes de rayos X realizados en nuestro laboratorio muestran la geometría de la doble hélice de ADN de secuencia CGAATTAATTTCG formando un complejo con el tercer *AT-hook* de la proteína HMGA1a (Fonfría-Subirós *et al.*, 2012). En ellos se puede observar la misma secuencia RGR del *AT-hook* perfectamente adaptada y estirada en el surco menor del oligonucleótido (Fig. 3-8). Sin embargo, la zona intermedia entre los *AT-hooks* no se ha podido caracterizar pero juega un papel importante en la interacción.

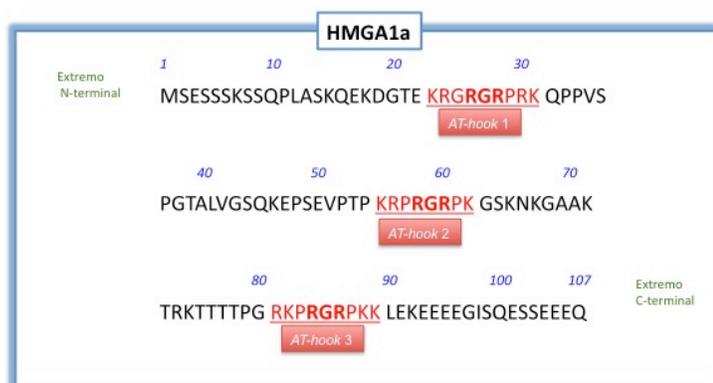


Fig. 3-7. Secuencia de aminoácidos de la proteína HMGA1a. En letras rojas se destacan los tres *AT-hooks*. Se resalta la secuencia invariable RGRP de la zona central de los *AT-hooks*.

La flexibilidad estructural que poseen permite a las proteínas HMGA participar ampliamente en actividades nucleares incluyendo la replicación y reparación del ADN, la remodelación de la cromatina, el control de la transcripción génica y la regulación del procesamiento de los ARN mensajeros (Reeves, 2003). Sin embargo, es necesaria una disección molecular de los dominios funcionales de la proteína que permita conocer el mecanismo por el cual la HMGA actúa en procesos naturales y anómalos.



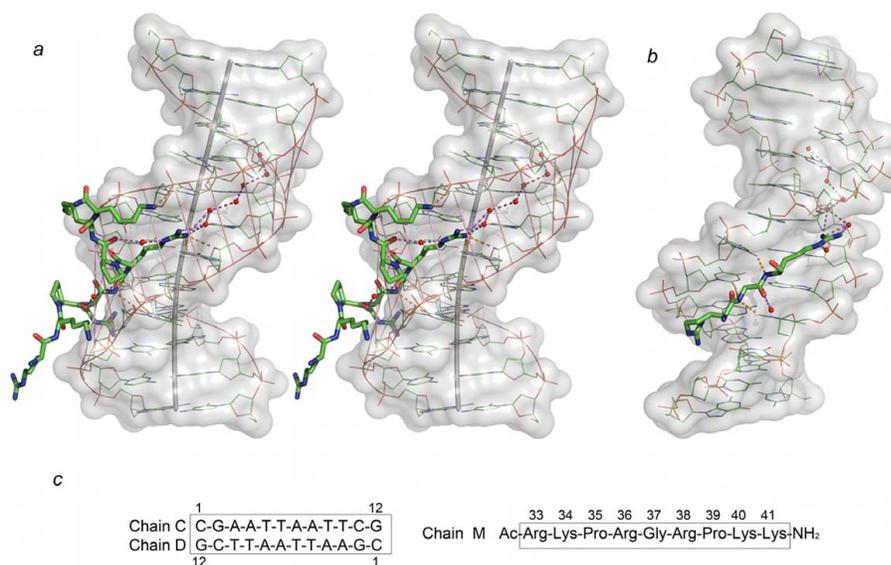


Fig. 3-8. Estructura cristalográfica y composición del complejo *AT-hook*-ADN. **(a)** Imagen estereoscópica del complejo. El ADN se muestra parcialmente transparente, el eje helicoidal en gris oscuro. Los enlaces fosfodiéster están representados por líneas rojas. Se observa que el surco menor por el cual se inserta el péptido es mucho más amplio. **(b)** Zona central del *AT-hook* (RGR). **(c)** Secuencias de las cadenas de ADN (Chain C y Chain D) y de péptido (Chain M) del complejo (Fonfría-Subirós *et al.*, 2012).

La sobreexpresión de los miembros de la familia de proteínas HMGA en humanos está presente en un gran número de diferentes tipos de cáncer. Estos incluyen órganos como la próstata, el colon, el pulmón, el pecho, el páncreas, y la tiroides (Tallini y Dal Cin, 1999; Belton *et al.*, 2012). En todas estas clases de tumores, el incremento de la concentración de proteínas HMGA está relacionado con el incremento en el grado de malignidad o de potencial metastático (Cleyne y van de Ven, 2008).

Por lo anterior, el papel de las proteínas HMGA en la transformación de la célula en adultos está esencialmente basada en su habilidad para regular la expresión de genes relacionados justamente en el control de la proliferación celular y la invasión (Fedele y Fusco, 2010).

Actualmente, se propone la HMGA1a como un biomarcador potencial y diana terapéutica para la detección y tratamiento de muchos tipos de cáncer (Shah y Resar, 2012). La sobreexpresión general de HMGA1 en cánceres humanos la hacen una diana terapéutica atractiva para tratamientos oncológicos por medio de estrategias biotecnológicas que bloqueen o eliminen la expresión de esta proteína en la mayoría de los tejidos.



El estudio de las proteínas HMGA y particularmente la HMGA1a ha ganado importancia en los últimos años. Sin embargo, actualmente se desconocen los detalles del mecanismo de interacción con el ADN y la estructura tridimensional que adopta esta proteína al formar el complejo con el ADN.

3.3 Drogas de unión al surco estrecho del ADN

Continuamente, la ciencia está buscando fármacos que puedan representar una posible terapia para las enfermedades relacionadas con la transcripción y replicación de determinados genes. Una estrategia utilizada para el descubrimiento de estos fármacos se basa en la estructura de la molécula pequeña para unirse al ADN y así interferir en su unión con proteínas o complejos proteicos evitando consecuencias negativas derivadas de dicha unión.

A las drogas que se unen al ADN específicamente en el surco estrecho se les llama fármacos de unión al surco estrecho del ADN (MGBD, del inglés *Minor Groove Binding Drugs*) y presentan una afinidad y especificidad comparable con las proteínas de unión al ADN (Wemmer y Dervan, 1997; Beckerbauer, 2000; Sheng *et al.*, 2013).

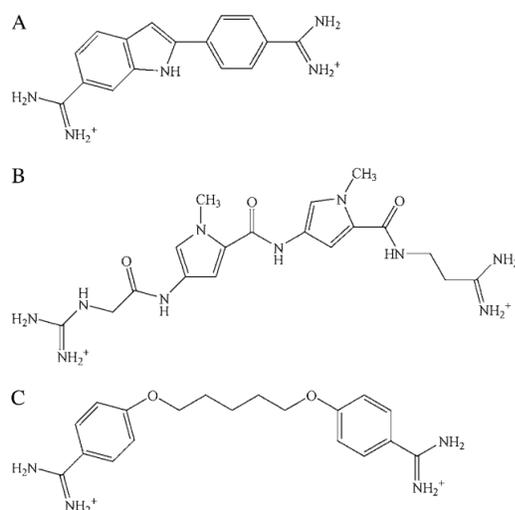


Fig. 3-9. Estructuras moleculares de a) DAPI, b) netropsina, c) pentamidina (Degtyareva *et al.*, 2007).



Los MGBD se caracterizan por unirse al ADN en el surco estrecho en regiones ricas en AT. Existe una variedad de compuestos naturales y sintéticos que poseen estas características. Estos compuestos contienen anillos aromáticos en su estructura, son moléculas alargadas que forman una curvatura que sirve para anclar con el surco estrecho y tienen donadores de puentes de hidrógeno en sus extremos, entre otras particulares (Wemmer y Dervan, 1997; Wilson *et al.*, 2008). Algunos ejemplos de MGBD son las drogas netropsina, pentamidina y DAPI, entre otras (Fig. 3-9).

El grupo MACROM publicó la estructura superenrollada formada por un complejo de ADN que contenía sólo adeninas y timinas con la droga pentamidina. En ella, el dúplex se encontraba formando una estructura mezclada de pares de bases Watson y Crick y pares de bases Hoogsteen (Fig. 3-10a) (Moreno *et al.*, 2010). Además, la estructura de la pentamidina cambiaba en cuanto a la curvatura que adoptaba; así la droga formaba una estructura más lineal al estar unida al ADN formado solamente por ATs (Fig. 3-10b).

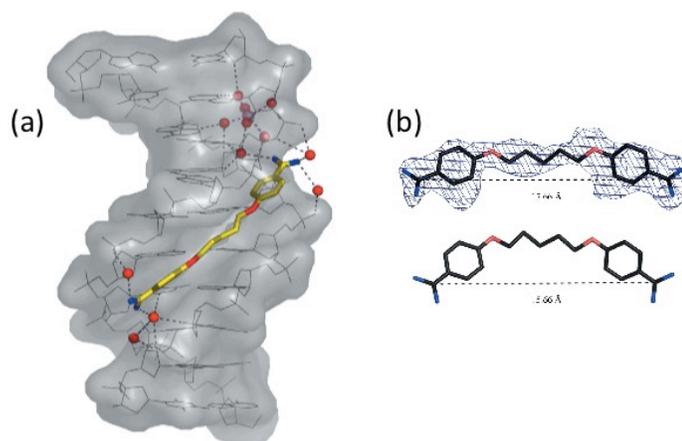


Fig. 3-10. (a) Vista del complejo pentamidina-d(ATATATATAT)₂. La droga se encuentra en el surco menor en el centro de la secuencia. Los extremos del dúplex son distintos. Arriba se forma el par de bases estándar Watson y Crick y abajo forman pares de bases Hoogsteen. (b) Comparación de la pentamidina unida al d(ATATATATAT)₂ y unida a otra secuencia rica en CT. La distancia entre los extremos es mayor al estar en contacto con ADN rico en AT (Moreno *et al.*, 2010).

Los fármacos de unión al surco estrecho del ADN representan una herramienta útil en la biología y la medicina humana en cuanto al conocimiento del mecanismo de unión del ADN con otros compuestos, así como en el tratamiento y terapia para enfermedades relacionadas con



moléculas y biomoléculas que se unen al ADN. Por ello, en este trabajo estudiaremos la interacción de dos fármacos con oligonucleótidos ricos en ATs.

3.3.1 La droga P10

Las tiazolidinedionas (TZD) son moléculas pequeñas que mejoran la sensibilidad de los tejidos a la insulina actuando como agonistas selectivos de receptores de la insulina localizados en el núcleo celular. Por ello, estos fármacos son utilizados como terapia para la diabetes mellitus tipo 2 y otras enfermedades relacionadas

Las tiazolidinedionas son ligandos selectivos de una de las isoformas del PRAR (por sus siglas en inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*). Estos receptores nucleares intervienen en la regulación de genes y, actualmente, se han descubierto tres clases: PPAR α , PPAR β , PPAR γ . Las TZD actúan como ligandos en estos últimos y, de esta manera, se produce la activación de este receptor como factor de transcripción. Además, también se unen a él coactivadores y todo este complejo multiproteico reconoce secuencias de ADN activando la transcripción de un número específico de genes (Yki-Järvinen, 2004).

La droga P10 es un agente hipoglicemiante (antidiabético) derivado de las tiazolidinedionas. El nombre químico de esta droga es (\pm)-5-[4-[2-(5-etil-2-piridinil)etoxi]bencil]-2,4 tiazolidinediona. La molécula contiene un centro asimétrico, y el compuesto sintético es un racemato. Los dos enantiómeros de la droga P10 se interconvierten *in vivo* (Fig. 3-11).

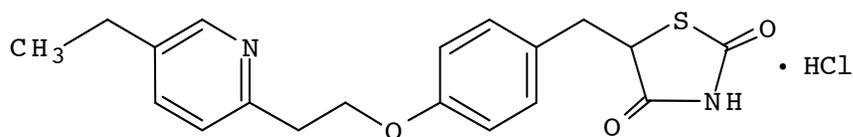


Fig. 3-11. Estructura de la droga P10.



La droga P10 es un polvo cristalino blanco, inodoro que tiene la fórmula molecular $C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$ y una masa molecular de 392.90 g/mol. Es soluble en N,N-dimetilformamida (DMAC) y en dimetil sulfóxido (DMSO) (≥ 10 mg/mL), levemente soluble en etanol anhidro, muy levemente soluble en acetona y acetonitrilo, prácticamente insoluble en agua, e insoluble en éter.

La estructura que posee esta molécula la hace una candidata como MGBD, ya que contiene dos anillos aromáticos, tiene dos donadores puente de hidrógeno y es una molécula alargada que podría adaptarse y situarse en el surco estrecho del ADN. Hasta ahora, no se ha estudiado la estructura tridimensional que adopta al estar en contacto con ADN, ni las modificaciones estructurales que causaría a la doble hélice.

3.3.2 La droga R05

La droga R05, al igual que la droga P10, es un derivado del tipo tiazolidinediona. La R05 reduce la glucemia disminuyendo la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado.

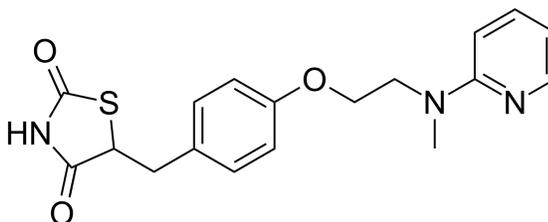


Fig. 3-12. Estructura de la droga droga R05.

El nombre químico de la droga R05 es (\pm) -5-[4-[2-[metil-(2-piridinil)amino]etoxi]bencil]-2,4 tiazolidinadiona. Es un polvo cristalino blanco, inodoro, cuya fórmula molecular es $C_{18}H_{19}N_3O_3S$ y su masa molecular es 357.428 g/mol. Es parcialmente soluble en dimetil sulfóxido (DMSO) (≥ 10 mg/mL) y prácticamente insoluble en agua y en éter.



La droga R05 contiene dos anillos aromáticos y tres donadores puente de hidrógeno (Fig. 3-12). De esta manera, es una buena candidata como fármaco de unión al surco estrecho del ADN. Hasta ahora, no se ha estudiado tampoco la estructura tridimensional que adopta esta droga y el ADN al formar un complejo.



4 Materiales y Métodos

Para alcanzar los objetivos deseados en este trabajo primeramente se ha de obtener la proteína HMGA1a(Δ 50-91) con el grado de pureza requerido para los ensayos cristalográficos. Una vez obtenida y purificada la proteína, se analizarán las condiciones más favorables de interacción con el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG y se realizarán una serie de ensayos cristalográficos con este complejo. Paralelamente, realizaremos ensayos cristalográficos con dos MGBDs: la droga P10 y la droga R05, interactuando con dos secuencias de oligonucleótidos ricas en ATs: A(AT)₅T y C(AT)₄G. En el diagrama que se presenta a continuación (Fig. 4-1) se muestran los pasos a seguir durante el desarrollo de este proyecto.

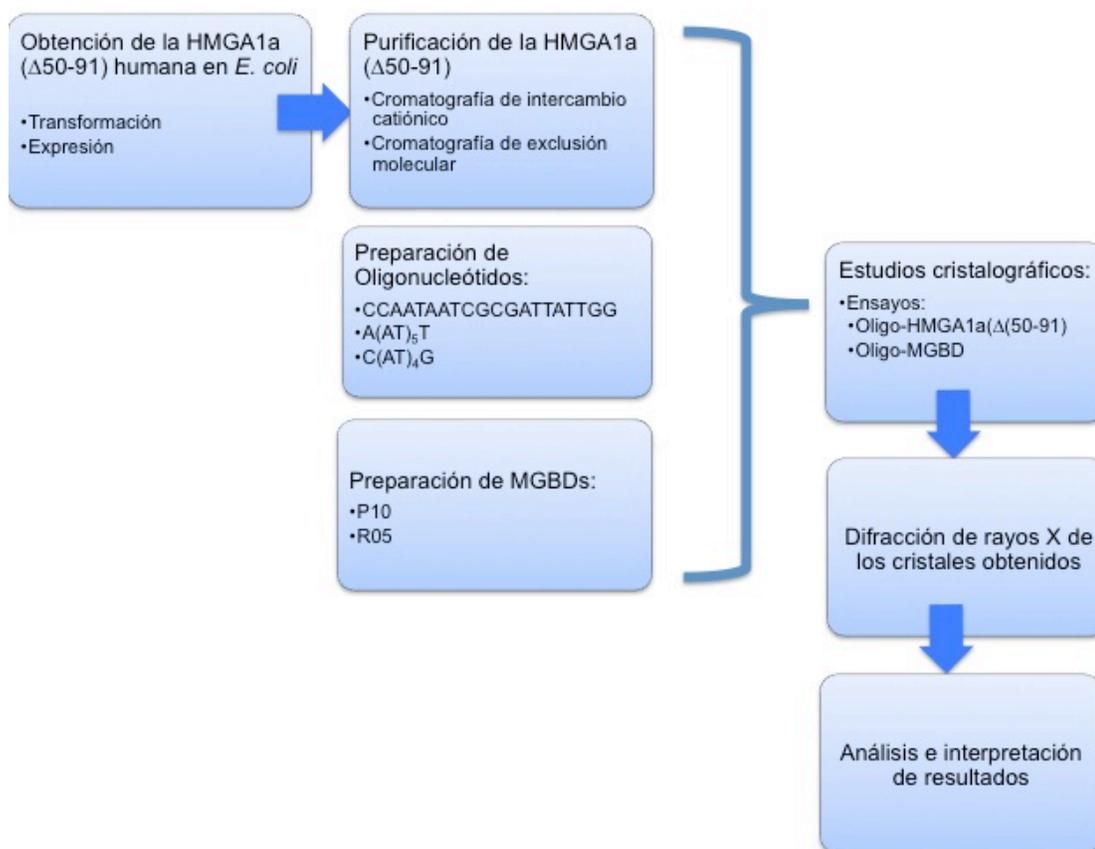


Fig. 4-1. Esquema del desarrollo del proyecto.



4.1 Obtención de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) humana en *Escherichia coli*

La obtención de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) humana se realizará mediante la técnica del ADN recombinante. Mediante esta técnica es posible transferir secuencias de ADN de un organismo a otro. El material genético se introduce en la célula huésped en forma de plásmidos. Un plásmido es una molécula de ADN circular, pequeña que tiene la capacidad de replicarse independientemente del cromosoma de la célula.

Al proceso de introducir material genético en forma de plásmido dentro de una célula bacteriana se le llama transformación.

El proceso de transformación requiere un marcador de selección que señale qué células han sido transformadas y cuáles no han integrado el ADN extraño. Los marcadores deben de estar incluidos en el plásmido insertado y normalmente se utiliza la resistencia a algún antibiótico (Fig. 4-2).

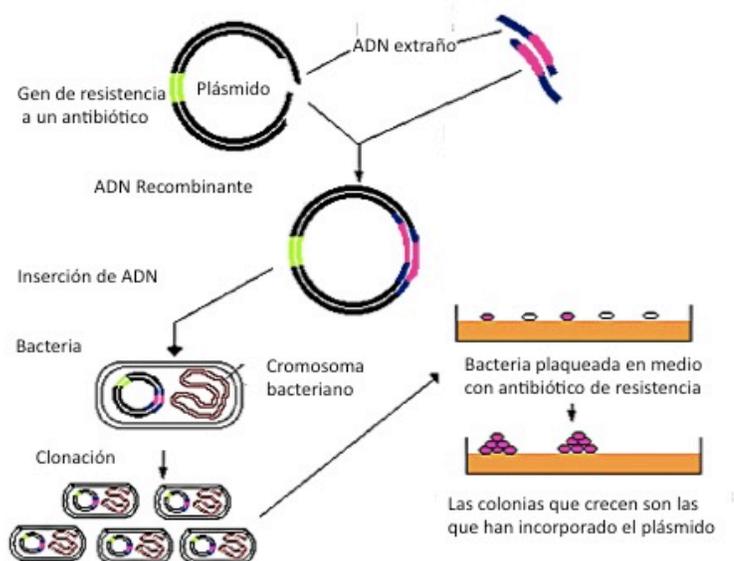


Fig. 4-2. Esquema del proceso de transformación y selección de células transformadas.

En este proyecto se desea producir un fragmento de la proteína HMGA1a humana: el HMGA1a(Δ 50-91).



Partiremos de células competentes de la cepa Rossetta (DE3) pLysS de *Escherichia coli*, a la cual le introduciremos el vector de expresión pET3a-HMGA1a(Δ 50-91), de alrededor de 5000 pb (cedido por el Dr. Reeves, Washington State University) (Fig. 4-3). Este vector contiene el gen que codifica a la proteína HMGA1a(Δ 50-91) y los elementos necesarios para asegurar su transcripción y posterior traducción a la proteína HMGA1a(Δ 50-91). Además, contiene el gen que codifica la resistencia al antibiótico ampicilina (amp^R) que se utilizará como marcador de selección una vez transformada la célula huésped.

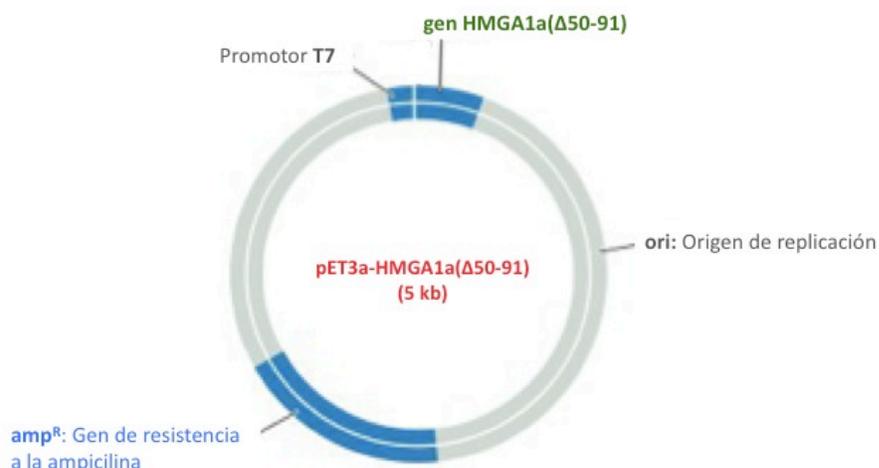


Fig. 4-3. Esquema del plásmido pET3a-HMGA1a(Δ 50-91).

La cepa Rossetta (DE3) pLysS de *Escherichia coli* fue seleccionada como célula huésped por poseer propiedades que favorecen y hacen más eficiente la expresión y la purificación de la HMGA1a(Δ 50-91). Contiene en su genoma el sistema pET para controlar los niveles de expresión de proteínas recombinantes que provengan de vectores de expresión pET.

El sistema pET se basa en el manejo del promotor T7. El gen diana está clonado en el plásmido pET3a-HMGA1a(Δ 50-91) bajo el control de la transcripción y traducción del promotor T7. La expresión de este promotor es proporcionada por la ARN polimerasa T7 en la célula huésped. La ARN polimerasa T7 es tan selectiva y activa que casi todos los recursos celulares se enfocan en la expresión del gen diana. La expresión es mucho más específica y controlada por medio de la inducción con IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (Fig. 4-4).



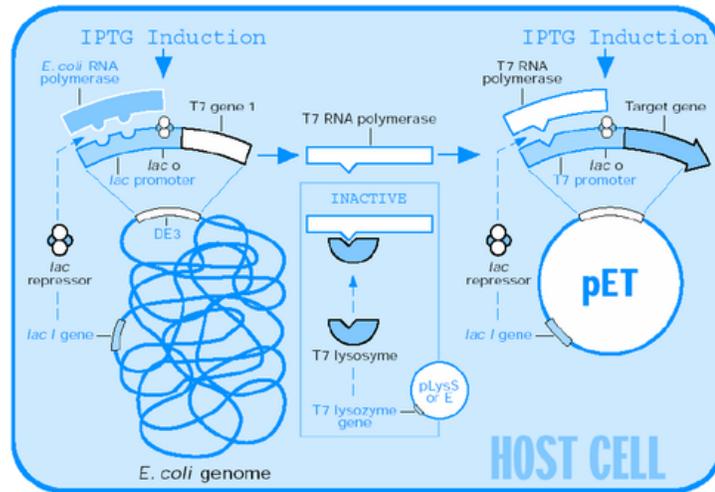


Fig. 4-4. Esquema del sistema pET en células *E. coli* (<http://life.nthu.edu.tw/~b871614/protocols/pet.html>)

La inducción se hará en la fase de crecimiento exponencial de las células para optimizar la expresión de la proteína deseada.

A continuación se presentan los protocolos a seguir para la transformación, selección de células transformadas, inducción y expresión de la forma HMGA1a(Δ 50-91).

4.1.1 Transformación, inducción y expresión

Todos los protocolos de este proyecto deben realizarse bajo condiciones estériles: trabajar a un costado de la llama con material y medio estéril.

Transformación

1. Sobre 100 μ l de células competentes de la cepa Rosetta (DE3) pLysS de *Escherichia coli* añadir 0,5 μ l de la disolución de ADN plasmídico (aproximadamente 100 ng/ μ l). Paralelamente hacer un control solamente con células competentes.
2. Colocar las muestras en hielo por 15 min.
3. Choque térmico: 5 min a 37°C en baño María.
4. Colocar las muestras en hielo por 2 min.



Mediante este tratamiento de choque térmico se facilita la entrada del ADN plasmídico en la células competentes.

5. Agregar 1 ml de medio LB sin antibiótico.
6. Incubar 1 hora a 37°C en baño María.
7. Centrifugar durante 3 min a 4000 rpm (micrófuga). Las bacterias sedimentan.
8. Eliminar el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 100 µl.
9. Resuspender el sedimento (el cual contiene las bacterias) en los 100 µl y sembrarlos sobre una placa de agar con medio LB + ampicilina (50 µg/ml) + Cloranfenicol (25 µg/ml): Cultivo en medio sólido.

El medio LB (medio de cultivo Luria Bertani) es rico en nutrientes como sales, aminoácidos y glúcidos necesarios para el desarrollo y reproducción de las bacterias. Concretamente, 1 litro de medio LB contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio a pH 7. El antibiótico ampicilina es el marcador de selección.

10. Colocar en la estufa a 37°C y dejar incubando *overnight* (O.N.).
11. El día siguiente veremos que en la placa de células transformadas habrán crecido algunas colonias de bacterias, mientras en el control no debe de crecer nada debido a que las células no transformadas no son resistentes a la ampicilina.

Cultivo en medio líquido

1. Picar una colonia de bacterias transformadas sobre un tubo de ensayo con 3 ml de LB + Amp (50 µg/ml).
2. Incubar a 37°C con agitación (250 rpm) durante aproximadamente 6 horas hasta observar turbulencia en el tubo.
3. Verter el cultivo sobre un matraz con 50 ml de LB + Amp (50 µg/ml).
4. Incubar a 37°C con agitación (250 rpm) O.N.

Inducción de la expresión

1. Inocular el volumen necesario del cultivo en 1 litro de LB + Amp (50 µg/ml) para alcanzar un a $DO_{600} = 0,1-0,2$.



2. Incubar a 37°C con agitación (250 rpm) hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,6-0,7$.
3. Agregar 1 ml de IPTG 1M → Inducción.
4. Incubar a 37°C con agitación (250 rpm) durante 3 horas.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a 4°C en un rotor SLA 3000.
6. Eliminar el sobrenadante.
7. Guardar el sedimento (las bacterias) a -80°C hasta su procesado (apartado 4.1.2).

Una vez comenzada la inducción se toman alícuotas a los tiempos 0 h, 1.5 h y 3 h para determinar la absorbancia y hacer controles electroforéticos del proceso en geles de SDS (ver apartado 4.3.1). Por lo tanto, se realiza lo siguiente:

1. Separar 1 ml de cultivo para medir la DO_{600} .
2. Tomar una alícuota de 125 μ l.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min (microfuga).
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender el sedimento en 30 μ l de tampón de muestras para electroforesis.
6. Guardar a -20°C hasta realizar el gel de electroforesis.

4.1.2 Tratamiento del sedimento bacteriano

La proteína HMGA1a(Δ 50-91) se produce intracelularmente en la bacteria, por lo tanto es necesario procesar el sedimento bacteriano obtenido para conseguir un extracto enriquecido de la proteína producida. El protocolo a seguir es el siguiente (Reeves y Nissen, 1999):

Para 1 litro de cultivo:

1. Resuspender el sedimento de bacterias en 100 ml de $HClO_4$ al 5%, Tritón X-100 0,5% (frío). Pipetear continuamente hasta obtener una buena dispersión.
2. Dejar 30 minutos en hielo como mínimo, invirtiendo de tanto en tanto.
3. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4°C (rotor GSA, Sorvall).
4. Descartar el sedimento (restos moleculares insolubles).
5. Agregar ácido tricloroacético (TCA) al sobrenadante hasta alcanzar una concentración final del 25% (33.3 ml). De esta manera precipitarán las proteínas.



6. Colocar las muestras en hielo por una hora y hasta O.N. invirtiendo de tanto en tanto.
7. Centrifugar a 10000 rpm durante 20 min a 4°C (rotor GSA, Sorvall).
8. Descartar el sobrenadante. El sedimento de la proteína precipitada puede ser fluido, por lo que hay que tener cuidado al decantar.
9. Resuspender el sedimento en 60 ml de H₂O.
10. Agregar TCA hasta una concentración final de 25% (20 ml).
11. Colocar las muestras en hielo invirtiendo de tanto en tanto.
12. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4°C (rotor GSA, Sorvall).
13. Descartar el sobrenadante con cuidado.
14. Lavar el sedimento con 60 ml de acetona con 10 mM HCl fría (-20°C).
15. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4°C (rotor GSA, Sorvall).
16. Descartar el sobrenadante con cuidado. Hacerlo justo al terminar de centrifugar y con la ayuda de una pipeta Pasteur.
17. Lavar el sedimento con 60 ml de acetona fría (-20°C).
18. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4°C (rotor GSA, Sorvall).
19. Descartar el sobrenadante.
20. Lavar el sedimento con 60 ml de acetona fría (-20°C).
21. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4°C (rotor GSA, Sorvall).
22. Descartar el sobrenadante con cuidado.
23. Secar al vacío el sedimento y conservar a -20°C.

Este sedimento obtenido es un extracto enriquecido en HMGA1a(Δ 50-91) pero se tendrá que purificar ya que contiene otras proteínas de la bacteria.

4.2 Purificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91)

Una vez realizado el tratamiento del sedimento bacteriano descrito anteriormente, es necesario separar la proteína HMGA1a(Δ 50-91) de otras proteínas propias de la bacteria que contiene el sedimento. Para poder alcanzar el grado de pureza requerido se realizarán las técnicas cromatográficas que a continuación se describen.



4.2.1 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía es una de las técnicas de purificación más utilizadas para la caracterización de moléculas complejas. Este método se basa en el principio de retención selectiva y el objetivo es separar distintos componentes de una mezcla. Los componentes se encuentran disueltos en una fase móvil y se desplazan con distintas velocidades a través de una fase estacionaria.

La cromatografía de intercambio iónico permite la separación de iones o moléculas polares de una mezcla en base a las propiedades de carga de las moléculas. En este caso, la fase estacionaria es un sólido que contiene grupos funcionales ionizables cuya carga interacciona electrostáticamente con los iones presentes en la fase móvil (Fig. 4-5). En separaciones de proteínas, la cromatografía de intercambio iónico es utilizada muy frecuentemente como técnica inicial de separación.

Las proteínas tienen grupos funcionales cargados positiva o negativamente. Mediante esta técnica se logra separar las proteínas de acuerdo a su carga neta, la cual depende de su fase móvil. Así, ajustando el pH o la concentración de iones de la fase móvil se logra la separación.

La fase estacionaria se conoce como resina de intercambio y muestra en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta. De acuerdo a la carga de la fase estacionaria, este tipo de cromatografía se clasifica en dos: cromatografía de intercambio catiónico y de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes cargados positivamente debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional cargado negativamente (Fig. 4-5). La cromatografía de intercambio aniónico retiene aniones usando grupos funcionales con carga positiva.

La proteína HMGA1a(Δ 50-91) tiene una carga neta positiva, por lo tanto se utilizará una columna de intercambio catiónico. En este caso trabajaremos con una matriz (fase estacionaria) de carboximetil celulosa (CM52, Whatman) y utilizaremos sodio como contraión. La matriz se empaqueta dentro de una columna de vidrio que en su extremo inferior dispone de un filtro permeable capaz de retener la matriz pero permitiendo el flujo de la fase móvil.

La fase móvil se impulsará a través de la fase estacionaria mediante una bomba peristáltica que asegura un flujo constante.



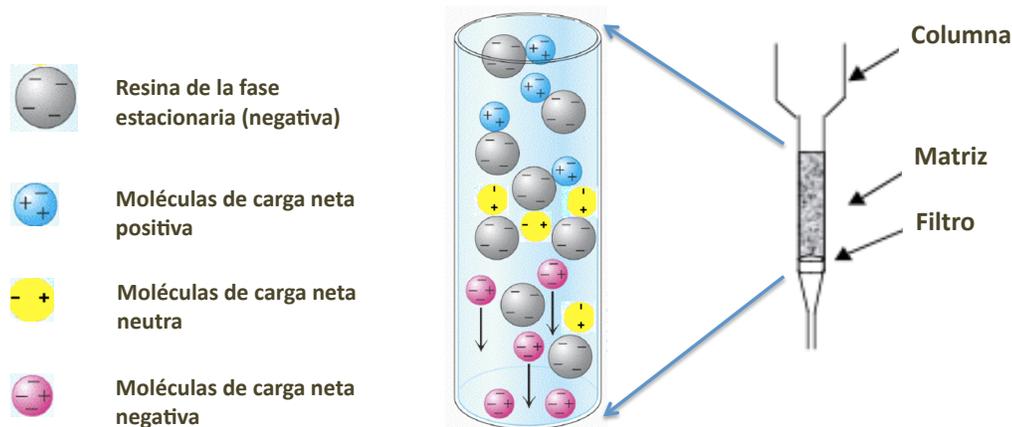


Fig. 4-5. Esquema de una columna de intercambio catiónico. Las moléculas de carga neta positiva (en azul) quedan unidas a la resina de la matriz de la columna de carga negativa (en gris). Las moléculas neutras (amarillas) no se unen a la resina y las moléculas de carga neta negativa (rosas) repelen a la fase estacionaria por ser de la misma carga y salen primero de la columna.

La cromatografía de intercambio catiónico consta de tres fases:

- *Equilibrado de la fase estacionaria.* En esta etapa se ajusta la resina a las condiciones salinas y de pH iniciales requeridas para el experimento poniéndose en contacto la fase estacionaria con el contraíón.
- *Aplicación de la muestra y lavado.* La muestra debe estar en la misma disolución empleada para equilibrar la columna. Es necesario centrifugar la muestra antes de cargarla en la columna para eliminar posibles restos insolubles y así evitar que entren a la columna. La proteína HMGA1a(Δ 50-91), al tener carga neta positiva, desplazará a los contraiones y se unirá a la matriz de la columna. Las proteínas con la misma carga que la matriz no se unirán y serán eluidas durante el lavado.
- *Elución de las proteínas unidas a la matriz.* Mediante un incremento en el gradiente de concentración, el contraíón desplazará primeramente a las proteínas menos cargadas positivamente y las de mayor carga positiva y más adheridas a la matriz se eluirán más tarde.



Para el proceso de equilibrado pasaremos al menos 10 volúmenes de la disolución de equilibrado por volumen de resina empaquetada en la columna.

Las disoluciones a utilizar para la purificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) son:

- Equilibrado = 50 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7
- Gradiente = concentraciones crecientes de NaCl: 50mM \rightarrow 1 M NaCl, 25 mM Tris, pH 7.

La aplicación de las concentraciones crecientes en la columna se hará de manera gradual (gradiente continuo) o bien de forma escalonada (gradiente isocrático). El gradiente continuo es especialmente eficaz para separar solutos que tienden a salir de la columna en un intervalo de concentraciones cercano. En la realización de esta técnica se utilizarán ambos gradientes.

El volumen eluido de la columna es fraccionado mediante un colector de fracciones automático programado para la recogida de un volumen determinado en cada fracción.

Para saber qué fracciones colectadas de la columna contienen la proteína, es necesario medir la absorbancia a 220 nm, región donde absorben los enlaces peptídicos de las proteínas. Para detectar proteínas también es común medir la absorbancia a 276 nm, ya que en esa región absorben aquellas proteínas que presentan aminoácidos con grupos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). Además, para comprobar que no existe contaminación por parte de ácidos nucleicos se puede controlar la absorbancia a 260 nm, que es en la región donde absorbe el ADN.

Una vez detectadas las fracciones que absorben a 220 nm, se seleccionarán para analizarlas electroforéticamente (apartado 4.3.1 y 4.3.2) para identificar donde se encuentra la proteína de interés y que, en nuestro caso, habrá que seguir purificando por medio de la técnica que se describe a continuación.

4.2.2 Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular o gel filtración permite la separación de moléculas en base a en su tamaño molecular. En esta técnica la fase estacionaria es un gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Estas esferas están constituidas



por largas cadenas de polímeros unidas entre si por enlaces químicos para formar una red tridimensional.

En el interior de una columna de cromatografía pueden distinguirse tres volúmenes distintos: el volumen total (V_t), que es el que ocupa la columna con el gel hidratado; el volumen vacío (V_o), que es el volumen existente entre las esferas del gel; y el volumen ocupado por las esferas del gel ($V_t - V_o$).

La mezcla de moléculas de distintos tamaños se hace pasar por la columna. Las moléculas de tamaño pequeño pueden penetrar en el interior de las esferas porosas del gel y no son extraídas de la columna hasta que no haya pasado a través de ella un volumen de líquido igual al volumen total (V_t). Por otra parte, las moléculas de tamaño mayor que los poros de las esferas del gel no pueden penetrar en su interior y atraviesan la columna recorriendo únicamente el volumen vacío (V_o), y por lo tanto serán las primeras en salir de la columna. Las moléculas de tamaño intermedio son extraídas fraccionadamente con volúmenes entre V_t y V_o . De esta manera, en esta cromatografía la separación de proteínas se da en función de sus masas moleculares, obteniéndose primero las de mayor tamaño (Fig. 4-6).

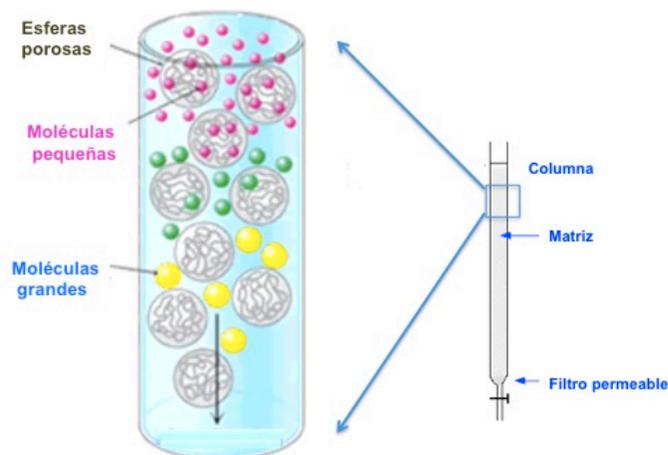


Fig. 4-6. Esquema de una columna de cromatografía de exclusión molecular. Las moléculas más grandes (en amarillo) no pueden entrar en las esferas porosas y atraviesan más rápido la columna en comparación con las más pequeñas (en rosa).

En este proyecto se utilizará esta técnica para repurificar las fracciones ricas en HMGA1a(Δ 50-91) provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico. La columna a utilizar es la



Superdex™ Peptide 10/300 GL de GE Healthcare con un rango óptimo de separación de proteínas con masa molecular entre 100 y 7000. Se utilizará el equipo *ÄKTA Purifier 10* de GE Healthcare.

Durante el desarrollo de esta técnica se utilizará un único tampón tanto para el equilibrado de la columna como para la elución. Las proteínas saldrán de la columna según su masa molecular disueltas en este tampón. El tampón a utilizar es: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5.

La detección de estas proteínas será mediante la absorbancia a 220 nm. Colectaremos las fracciones que absorban en estas regiones y comprobaremos la presencia y pureza de la HMGA1a(Δ 50-91) por medio de técnicas electroforéticas. De igual manera que en la cromatografía de intercambio catiónico, se controlará la absorbancia a 260 y 280 nm por los motivos explicados anteriormente.

4.2.3 Diálisis y concentración de la HMGA1a(Δ 50-91)

La diálisis es el proceso mediante el cual se separan moléculas en una solución basándose en los índices de difusión o presión osmótica a través de una membrana semipermeable. La diálisis permite cambiar la composición de la disolución en la cual se encuentra la proteína. Esta técnica es comúnmente usada para disminuir la concentración de sales de soluciones de proteínas.

El proceso de concentración se realizará en dos etapas del proceso del proyecto. Primeramente se concentrarán las fracciones provenientes de la columna de intercambio catiónico y, posteriormente, como último paso para conseguir la proteína HMGA1a(Δ 50-91) en las condiciones requeridas, se concentrarán y dializarán las fracciones provenientes de la columna de cromatografía de exclusión molecular.

En función del volumen de la muestra de partida y teniendo en cuenta la masa molecular de la proteína se selecciona el concentrador a utilizar. En nuestro caso, la HMGA1a(Δ 50-91) tiene una masa molecular de 4781.5 g/mol, por lo que el dispositivo que utilizaremos será el concentrador Vivaspin® 20 Centrifugal MWCO 3000 (Fig. 4-7c). Este concentrador tiene una capacidad de hasta 20 ml de muestra y una masa molecular límite (MWCO) de 3000.



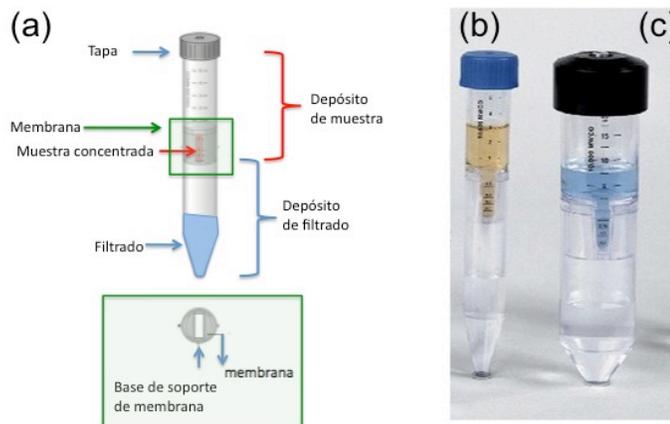


Fig. 4-7. Concentradores Vivaspin®. **(a)** Componentes del dispositivo concentrador. **(b)** Vivaspin® 6. **(c)** Vivaspin® 20 (http://www.sartorius.com/fileadmin/fm-dam/sartorius_media/Lab-Products-and-Services/LabFiltration/UltrafiltrationDevices/VivaspinCentrisart/Manuals/Manual_Vivaspin6+20_SLU6092-e.pdf).

Asimismo, una vez repurificada la proteína en la columna de cromatografía de exclusión molecular, concentraremos las muestras seleccionadas que contengan la HMGA1a(Δ 50-91) con un Vivaspin® 6 Centrifugal MWCO 3000 (Fig. 4-7b). Este concentrador tiene capacidad de 6 ml de muestra y una masa molecular límite de 3000.

Estos concentradores son dispositivos de ultrafiltración para la concentración y/o purificación de muestras biológicas. Tanto el Vivaspin® 6 como el 20 cuentan con un par de membranas verticales idénticas y operan mediante la centrifugación en rotores de ángulo fijo u oscilantes. La solución con moléculas de tamaño menor al MWCO atraviesan la membrana y pasa al depósito de la parte inferior del Vivaspin® (Fig. 4-7a); a este volumen de solución se le llama filtrado. El volumen restante es fácilmente medible mediante la escala impresa en el lateral del concentrador y se le denomina concentrado. La membrana vertical garantiza un bloqueo mínimo durante el proceso de filtración y asegura una rápida concentración de la muestra. Además, la pérdida del producto es mínima gracias a la baja adsorción de proteínas.

Los Vivaspin® ofrecen además la posibilidad de realizar el proceso de diafiltración, permitiendo la eliminación de sales y de otras macromoléculas contaminantes presentes en la disolución proteica inicial. Aprovechando esta alternativa, muy conveniente para nuestro proyecto, se



realizará el proceso de diálisis y concentración en el mismo dispositivo mediante el intercambio de tampones de distinta concentración.

Así, las muestras provenientes de la columna de cromatografía de exclusión molecular, se concentrarán hasta un nivel determinado, se añadirá tampón de muestra final (el tampón al que se desea dejar la proteína) al concentrador y se concentrará nuevamente hasta el volumen deseado. Este ciclo de lavado se realiza tres veces, con esto se remueve aproximadamente el 99% del contenido de sal inicial. De esta manera se reemplazarán las sales del solvente inicial por las del tampón final a través de la membrana de ultrafiltración.

El procedimiento a seguir para concentrar la muestra de proteína es el siguiente (Fig. 4-8):

1. Hidratar la membrana del concentrador, es decir, verter un volumen del tampón en el cual se encuentra la muestra proteica al depósito de muestras del concentrador.
2. Centrifugar a la velocidad especificada por el proveedor durante el tiempo necesario para que se filtre al menos la mitad del volumen inicial cargado.
3. Mientras tanto, centrifugar las muestras a 7500 rpm por 10 min a 4°C.
4. Una vez hidratada la membrana, vaciar el concentrador, tanto el depósito de muestra como el de filtrado.
5. Rápidamente, verter la muestra a concentrar (previamente centrifugada) al depósito de muestras del Vivaspin®.
6. Centrifugar a una velocidad ligeramente inferior a la máxima especificada por el proveedor para el tipo de concentrador hasta filtrar el volumen necesario de muestra inicial para obtener la concentración deseada.
7. Recuperar la muestra concentrada pipeteando directamente del depósito de muestras el volumen restante con mucho cuidado.
8. Recuperar el filtrado.



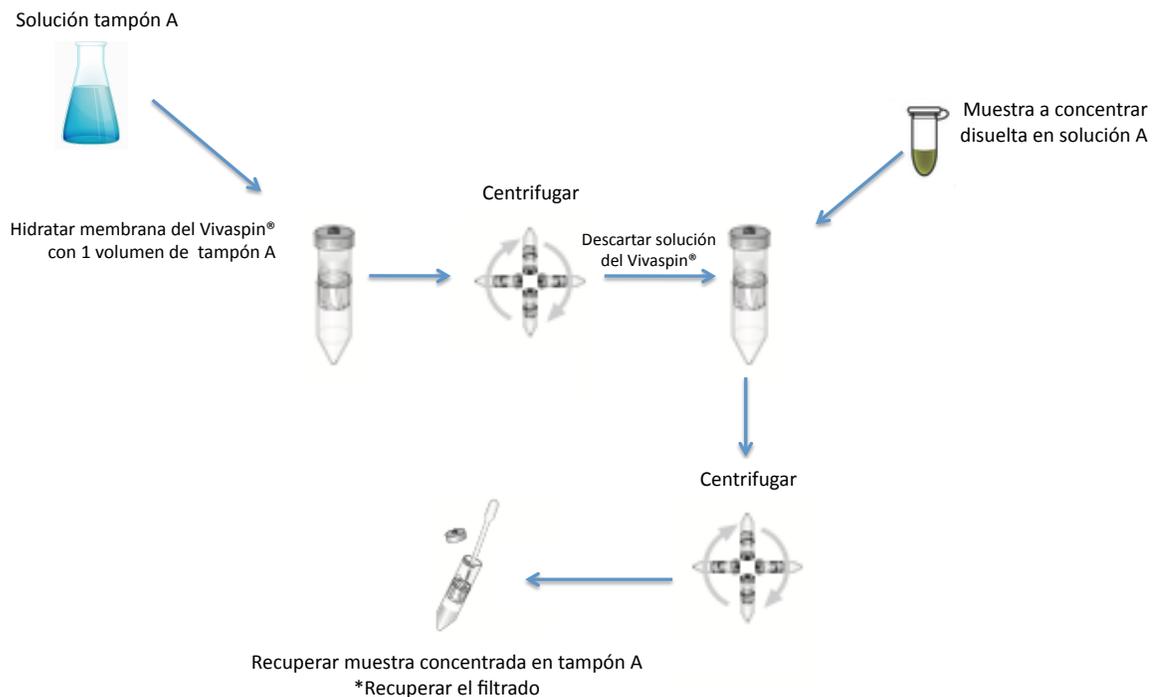


Fig. 4-8. Diagrama del proceso de concentración en Vivaspin®.

Asimismo, el procedimiento a seguir para realizar la diafiltración es el siguiente (Fig. 4-9):

1. Repetir pasos 1-6 del protocolo anterior.
2. Realizar un lavado con el tampón en el cual deseas que se encuentre la proteína concentrada. Verter un volumen del tampón al depósito de muestras del concentrador.
3. Centrifugar a una velocidad ligeramente inferior a la máxima especificada por el proveedor para el tipo de concentrador hasta filtrar el volumen necesario de muestra inicial para obtener la concentración deseada.
4. Repetir los pasos 2 y 3 recuperando el filtrado en cada ciclo.
5. Recuperar la muestra concentrada pipeteando directamente del depósito de muestras el volumen restante con mucho cuidado.
6. Recuperar el filtrado.



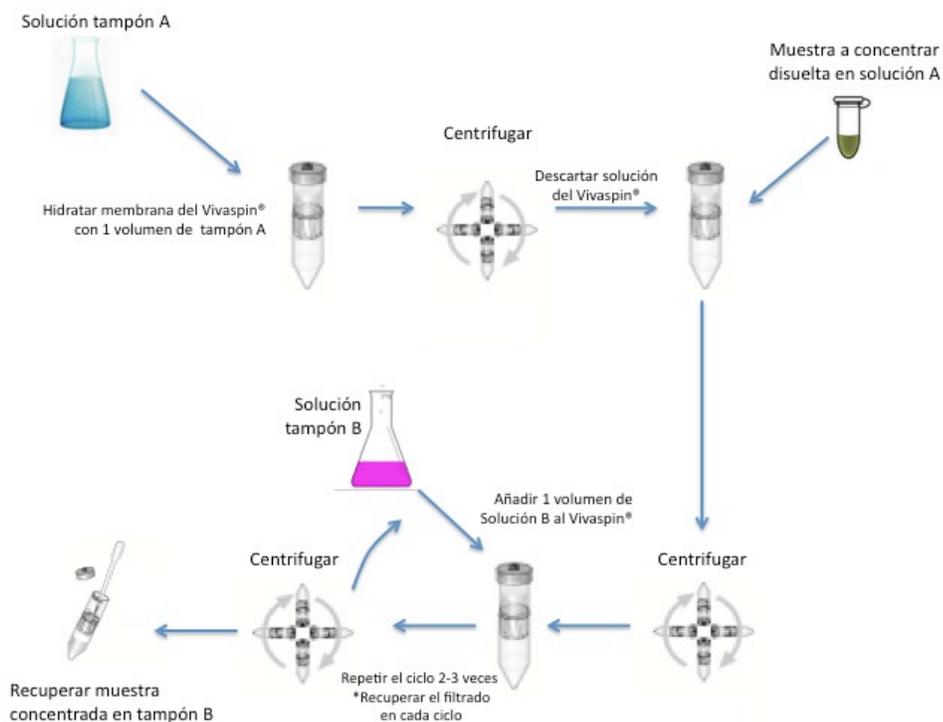


Fig. 4-9. Diagrama del proceso de diafiltración en Vivaspin®.

4.2.4 Cuantificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91)

La concentración de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) se calculará midiendo la absorbancia de las muestras a 220 nm (donde absorbe el enlace peptídico) y aplicando la ley de Lambert-Beer (Eq. 4-1):

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

Eq. 4-1. Ecuación de Lambert-Beer.

Donde:

A = Absorbancia

ϵ = coeficiente de extinción molar a la longitud de onda considerada

C = concentración de la muestra

l = longitud de la cubeta (1 cm)



El coeficiente o factor de extinción molar es un parámetro que define cuan fuertemente una sustancia absorbe la luz a una determinada longitud de onda, por unidad de masa o de concentración molar. En el caso de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) es 38200 l/mol·cm, o 7,99 ml/mg·cm (Huth *et al.*, 1997). Esto significa que a una longitud de onda de 220 nm, una solución de 1 mg/ml de la proteína tiene una absorbancia de 7,99.

La absorbancia se medirá dos veces por cada muestra a cuantificar. El blanco se hará con 800 μ l del tampón en el cual se encuentra disuelta la proteína. La primera medida se hace con 1 μ l de muestra concentrada en 800 μ l de tampón. Homogeneizar muy bien la muestra y leer la absorbancia. A continuación, se agregará 1 μ l más de muestra y se leerá la absorbancia de nuevo. Por último, calcular la concentración de las dos diluciones y obtener la media.

4.3 Métodos electroforéticos

La electroforesis es una técnica analítica que permite separar e identificar moléculas. Se basa en la migración diferencial de moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Esta técnica es comúnmente utilizada para la separación y visualización de ácidos nucleicos y proteínas. La movilidad de estas moléculas depende de su carga, tamaño y forma, así como de la fuerza del campo eléctrico y de la porosidad del soporte.

Los elementos necesarios para llevar a cabo la separación electroforética son, primeramente una fuente de alimentación que proporcione un campo eléctrico mediante dos electrodos (cátodo y ánodo) entre los que se produzca una diferencia de potencial. Cuanto mayor sea ésta, mayor es la velocidad de migración de las moléculas. Asimismo, es necesaria una cubeta en donde se sitúen los electrodos en sus extremos, un soporte electroforético (el gel) y un tampón de electroforesis (Fig. 4-10).



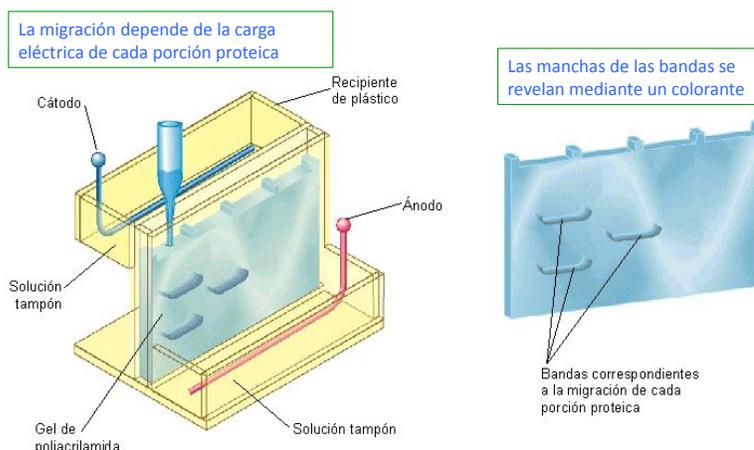


Fig. 4-10. Esquema del montaje para un análisis electroforético (<http://www.fotosimágenes.org/electroforesis>).

En este trabajo realizaremos separaciones electroforéticas por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). El soporte de estos geles se prepara a partir de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}=\text{CO}-\text{NH}_2$) con N,N'-metilénbisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). El primer compuesto funciona como monómero, es decir, como unidad básica para la formación de largas cadenas lineales (poliacrilamida); el segundo tiene la función de controlar el entramado de las cadenas de acrilamida mediante su unión de forma covalente. Cuando la solución de acrilamida polimeriza, adquiere la forma del recipiente, por lo tanto es necesario un molde. La reacción de polimerización está catalizada generalmente por PSA (persulfato amónico) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina).

En el desarrollo de este proyecto se realizarán tres tipos de geles de poliacrilamida: geles poliacrilamida-SDS, geles poliacrilamida acético-urea y geles EMSA (por sus siglas en inglés *Electrophoresis Mobility Shift Assay*). En los dos primeros analizaremos la presencia (cantidad) y pureza (calidad) de las muestras provenientes de cromatografías. Con el último gel analizaremos la actividad de la proteína HMGA1a($\Delta 50-91$) al interactuar con el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG.



4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) se realizarán utilizando el protocolo de sistema discontinuo de tampones introducido por Laemmli (1970) y modificado posteriormente por Thomas y Kornberg ocho años más tarde (Thomas y Kornberg, 1978). Este tipo de geles se preparan de forma discontinua y contienen dos partes:

- Apiladora (*stacking*). Esta parte del gel contiene una baja concentración de acrilamida, por tanto, no tiene tanta resistencia al paso de moléculas.
- Separadora (*resolving*). Ésta es la parte baja del gel y contiene una concentración más alta de acrilamida en comparación con el *stacking*. En esta fase es donde se logra la separación de moléculas con distinto masa molecular.

El SDS (dodecil sulfato de sodio) es un surfactante aniónico que interacciona con la mayoría de las proteínas desnaturizándolas y evitando la interacción entre ellas durante la electroforesis. El SDS recubre las proteínas y les confiere carga neta negativa proporcional a su masa. Dos aminoácidos de una proteína se unen a una molécula de SDS, es decir, hay 1,4 g de SDS por cada gramo de proteína aproximadamente. La unión SDS-proteína es crítica para conseguir una buena migración electroforética.

Las muestras a cargar en el gel SDS-PAGE se preparan con un tampón de muestras (Tabla 4-3) que contiene un exceso de SDS y se calientan a 100°C durante 6 min (la temperatura desnatura a las proteínas). Además, se añadirá SDS también al tampón de cubeta (Tabla 4-2).

Una vez desnaturizadas y cargadas negativamente, todas las moléculas tendrán la misma densidad de carga, por lo tanto, la migración en el gel será hacia el polo positivo (se colocará en la parte inferior del gel) con una velocidad inversamente proporcional a su tamaño.



GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS		
Reactivos	Resolving Acrilamida 15%, Bisacrilamida 0,4%, 0,375 M Tris, 0,1% SDS	Stacking Acrilamida 6%, Bisacrilamida 0,16%, 0,125 M Tris, 0,1% SDS
Solución A 30% acrilamida, 0,8% bisacrilamida	5 ml	0,6 ml
Solución B 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	-
Solución C 10% SDS	100 µl	30 µl
Solución D 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,75 ml
H₂O	2,35 ml	1,59 ml
TEMED	4,5 µl	3 µl
PSA Solución al 10%	75 µl	30 µl

Tabla 4-1. Composición de un gel de poliacrilamida-SDS de 10 cm x 15 cm x 1,5 mm.

TAMPÓN DE CUBETA (gel SDS-PAGE)		
Reactivos	5x (1 Litro)	Concentración 1x
Tris	30 g	0,01 M
Glicina	144 g	0,075 M
SDS	5 g	0,02 %

Tabla 4-2. Composición del tampón de cubeta de los geles de poliacrilamida-SDS. Normalmente se prepara el tampón 5x y se diluye a 1x para ser utilizado durante la electroforesis.

TAMPÓN DE MUESTRAS 4x (gel SDS-PAGE)	
Reactivos	Cantidad
Tris 2 M pH 6,8	1,25 ml
Glicerol	4 ml
SDS	0,8 g
β-mercaptoetanol	2 ml
H₂O	Hasta 10 ml
Azul de bromofenol	Punta de espátula

Tabla 4-3. Composición del tampón de muestras para electroforesis SDS-PAGE.



Preparación de la muestra

La muestra se disuelve en el tampón de muestras (Tabla 4-3) y se hierve por 6 min a 100°C. El tampón cuenta con azul de bromofenol, colorante que permite visualizar la migración de la muestra. El β -mercaptoetanol (o 2-mercaptoetanol) es un agente reductor que se añade al tampón para deshacer los enlaces disulfuro que forman las cisteínas de las proteínas, y el glicerol da densidad a la mezcla. La cantidad de proteína cargada debe ser entre 1 y 20 μ g.

Preparación del montaje de los geles SDS-PAGE

1. El molde se prepara con dos placas de vidrio separadas por espaciadores (Fig. 4-11). Sellar los laterales y la parte inferior con una goma y mantenerlo unido con pinzas.
2. Preparar el *resolving* (Tabla 4-1) y verterlo entre las dos placas.
3. Agregar una capa de 1-2 mm de isopropanol al molde con *resolving* para conseguir una interfase recta y evitar el contacto con el oxígeno.
4. Esperar hasta que polimerice el gel.
5. Decantar el isopropanol, lavar con H₂O y secar perfectamente el H₂O del molde.
6. Preparar el *stacking* (Tabla 4-1). Añadirlo sobre el *resolving* y colocar el peine que define los pozos donde se cargarán la muestras.
7. Esperar hasta que polimerice el gel.
8. Tomar la cubeta donde se colocará el gel y llenar la parte inferior con el tampón de cubeta (Tabla 4-2). Fijar el gel en la cubeta, retirar el peine y añadir tampón de cubeta a la parte superior. Asegurarse de no dejar burbujas entre el gel y el tampón de cubeta.
9. Aplicar las muestras con una jeringa *Hamilton*.
10. Iniciar el proceso de electroforesis aplicando un campo eléctrico constante entre 100 y 130 V.
11. Dejar correr las muestras hasta que el colorante del tampón de muestras haya migrado hasta 0,5 - 1 cm del final del gel.



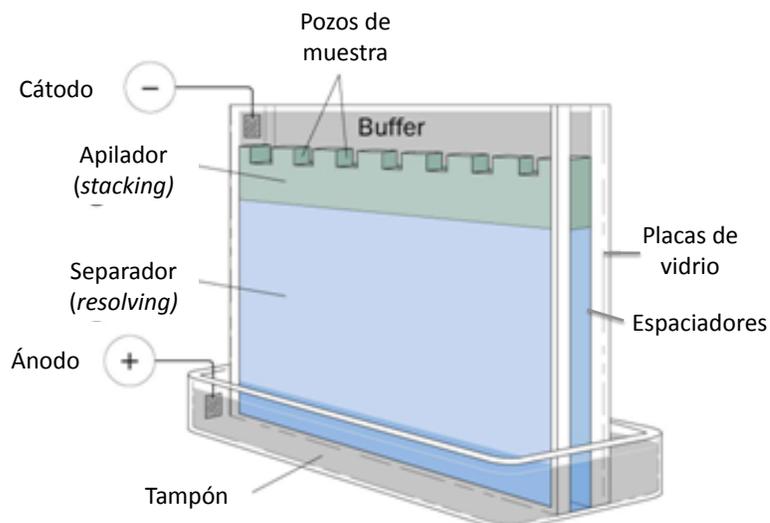


Fig. 4-11. Esquema del montaje y partes de un gel de poliacrilamida-SDS.

Detección de las proteínas

Al término de la electroforesis, se retira el gel de la cubeta y se separa del molde. El gel se tiñe sumergiéndolo en una solución colorante que contiene azul de Coomassie G-250 (Tabla 4-4). Esta solución fija las proteínas al gel y permite su tinción.

El tiempo de tinción es de por lo menos una hora. Después el gel se retira del teñidor y se sumerge en la solución desteñidora (Tabla 4-5) O.N. para retirar el colorante unido de forma inespecífica. La tinción y destinción de los gels se realiza en continua agitación.

Conservación de los gels

Por último, es necesario secar los gels para poder conservarlos. El procedimiento de secado se hace entre dos láminas de celofana húmedas, colocado sobre una placa de vidrio y sujetado con pinzas. Dejarlo secar de 2 a 5 días. Este procedimiento se realiza para todos los gels poliacrilamida que realizaremos en este trabajo.



SOLUCIÓN TEÑIDORA		
Reactivos	Gel SDS-PAGE	Gel AU-PAGE
Azul de Coomassie	2,5 g (G-250)	2,75 g (R-250)
Isopropanol	250 ml	-
Metanol	-	500 ml
Ácido Acético	100 ml	100 ml
H₂O	Hasta 1 L	500 ml
<i>Filtrar la solución con papel filtro</i>		

Tabla 4-4. Composición de la solución colorante de los geles SDS-PAGE y AU-PAGE.

SOLUCIÓN DESTEÑIDORA		
Reactivos	Gel SDS-PAGE	Gel AU-PAGE
Isopropanol	100 ml	-
Metanol	-	500 ml
Ácido Acético	100 ml	100 ml
H₂O	Hasta 1 L	500 ml

Tabla 4-5. Composición de la solución desteñidora de los geles SDS-PAGE y AU-PAGE.

4.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-ácido acético-urea (AU-PAGE)

La electroforesis en poliacrilamida-ácido acético-urea (Panyim y Chalkley, 1969) se basa en la separación de proteínas según su carga eléctrica, por lo que es posible separar moléculas del mismo tamaño pero con distinta carga. En este trabajo se desarrollará la técnica AU-PAGE utilizando las condiciones de Panyim y Chalkley pero sustituyendo el PSA y el TEMED por tiourea y H₂O₂ (Hurley, 1977) (Tabla 4-6).

La migración se logra en función de dos parámetros: la carga y el tamaño de las moléculas. El AU-PAGE se utiliza comúnmente para separar proteínas muy básicas debido a que éstas se disuelven muy bien en la mezcla de urea y medio ácido. La urea interfiere con las interacciones hidrofóbicas de las proteínas y las desnaturaliza parcial o totalmente (dependiendo de la concentración de urea).



En los geles AU-PAGE se utiliza un solución al 5% de ácido acético como tampón de cubeta.

Preparación de muestras del gel AU-PAGE

La preparación de las muestras es muy sencilla, sólo es necesario mezclarlas con 1 volumen del tampón de muestras (Tabla 4-7). El colorante de migración, en este caso es el verde de metilo. No es necesario hervir las muestras.

En el caso de tener muestras con alta concentración de sales, es necesario tratarlas con TCA para evitar que dichas sales afecten el desarrollo de la electroforesis. El protocolo a seguir es el siguiente:

1. Agregar a las muestras TCA hasta una concentración final del 25%.
2. Colocar las muestras en hielo por 15 min.
3. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a 4°C (microfuga).
4. Descartar el sobrenadante con cuidado.
5. Lavar el sedimento con 1 ml de acetona (vórtex).
6. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a 4°C (microfuga).
7. Descartar el sobrenadante con cuidado y secar las muestras al aire.
8. Resuspender en de agua milliQ®.
9. Agregar un volumen de tampón de muestras AU-PAGE 2x y cargar las muestras en el gel.

Preparación del montaje del gel AU-PAGE

1. El molde se prepara con dos placas de vidrio separadas por espaciadores. Sellar los laterales y la parte inferior con una goma y mantenerlo unido con pinzas.
2. Preparar el gel (Tabla 4-6), verterlo entre las dos placas y colocar inmediatamente el peine para definir los pozos.
3. Esperar un momento a que polimerice el gel.
4. Tomar la cubeta donde se colocará el gel y llenar la parte inferior con el tampón de cubeta. Fijar el gel en la cubeta, retirar el peine y añadir tampón de cubeta a la parte superior. Asegurarse de no dejar burbujas entre el gel y el tampón de cubeta.



5. Aplicar las muestras con una jeringa *Hamilton*.
6. Iniciar el proceso de electroforesis aplicando un campo eléctrico constante entre 18 y 20 mA.
7. Dejar correr las muestras hasta que el colorante del tampón de muestras haya migrado hasta 0,5 - 1 cm del final del gel.

Detección de proteínas

La detección de las proteínas se logra de la misma manera que el gel SDS-PAGE pero con distintas soluciones teñidora (Tabla 4-4) y desteñidora (Tabla 4-5). El tiempo de tinción también es de mínimo 1 hora y se destiñe O.N.

GEL DE POLIACRILAMIDA-ÁCIDO ACÉTICO-UREA	
Reactivos	Cantidad 2,5 M Urea, Acrilamida 15%, Bisacrilamida 0,1%, Á. Acético 5,37%, Tiourea 0,09%, H ₂ O ₂ 0,56%
Solución A* 30% Acrilamida, 0,2% Bisacrilamida	6 ml
Ácido acético Solución al 43%	1,5 ml
Urea 10 M	3 ml
Tiourea	10.5 mg
H₂O	Hasta 12 ml
H₂O₂	67,5 µl

Tabla 4-6. Composición de un gel de poliacrilamida-ácido acético-urea 10 cm x 15 cm x 1,5 mm.



TAMPÓN DE MUESTRAS 2x (gel AU-PAGE)	
Reactivos	Cantidad
B-mercaptoetanol	14 µl
Urea 10 M	8 ml
Ácido acético	0,5 ml
H₂O	Hasta 10 ml
Verde de metilo	Punta de espátula

Tabla 4-7. Composición del tampón de muestras para una electroforesis en gel AU-PAGE.

4.3.3 Electroforesis en geles EMSA

Los geles EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*) o geles de retardo se utilizan para detectar la interacción proteína-oligonucleótido. El fundamento de esta técnica se basa en la movilidad electroforética por tamaño de molécula. Si la proteína o péptido es activo, es decir, al interactuar con el ADN se une al él y forma complejo ADN-proteína/péptido, el tamaño de éste será mayor comparado con el oligonucleótido libre.

En los geles EMSA se prueban distintas relaciones entre las biomoléculas formadoras del complejo para conocer cuál es la condición óptima de formación de complejo.

Para cumplir con los objetivos de este proyecto, realizaremos un gel EMSA para analizar la interacción HMGA1a(Δ50-91) con el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG. Cargaremos en cada pozo del gel la misma cantidad de oligonucleótido y cantidades crecientes de proteína.

Preparación del montaje de los geles EMSA

La composición del gel se describe en la Tabla 4-8. La preparación del montaje de los geles es prácticamente la misma descrita para los geles AU-PAGE. Es imprescindible conservar la integridad del ADN y de la proteína. Por lo anterior, debido a la sensibilidad de las proteínas y los oligonucleótidos a la temperatura, el gel EMSA se realiza a 8°C (en la cámara fría) y es necesario vigilar que durante la electroforesis no incremente la temperatura (colocar el montaje sobre hielo).



Preparación de las muestras de geles EMSA

Para evitar interacciones con otras sustancias que puedan afectar a la formación del complejo ADN-proteína, el tampón de muestras de los geles EMSA no tienen colorante de migración.

En este caso utilizaremos como tampón de muestras 0,3x TBE (0,027 M Tris-Borato y 0,6 mM EDTA) y 5x TBE (Tabla 4-9). Además del tampón, a las muestras se les añade glicerol al 50% para aportarles densidad a la solución. Es necesario incubar las muestras preparadas durante una hora a 8°C para permitirles formar el complejo ADN-proteína.

GEL DE RETARDO (EMSA)	
Reactivos	Cantidad Acrilamida 8%, Bisacrilamida 0,2%,
Solución A 30% Acrilamida, 0,8% Bisacrilamida	3,2 ml
5x TBE 54 g Tris, 27,5 g ácido bórico, 20 ml EDTA 0,5 M pH 8	0,8 ml
H₂O	7,83 ml
PSA Solución al 10%	60 µl
TEMED	12 µl

Tabla 4-8. Composición para preparar 2 geles EMSA de tamaño: 10 cm x 15 cm x 0,75 mm.

Antes de cargar las muestras en el gel, es necesario realizar un *prerunning*, esto es, conectar el campo eléctrico al sistema de electroforesis montado con el tampón de cubeta a 75 V por 30 min (como mínimo), a 8°C y colocado sobre hielo. Una vez transcurrido ese tiempo, se cargan las muestras en el gel (trabajando en la cámara fría con mucho cuidado al cargar ya que las muestras no tienen colorante) y se realiza el *run* (se inicia la electroforesis de las muestras) a 125 V por una hora a 8°C en la cámara fría y montado sobre hielo.



TAMPÓN DE CUBETA (gel EMSA)	
Reactivos	Tampón de cubeta 5x TBE pH 8
Tris	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA	20 ml
H₂O	Hasta 1 L

Tabla 4-9. Composición del tampón de cubeta de los geles EMSA. Normalmente se prepara el tampón 5x y se diluye a 1x para ser utilizado durante la electroforesis.

Detección de ADN y complejo

La detección del ADN se hace sumergiendo el gel en una solución teñidora que contiene 5 µl de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain de Invitrogen™ + 50 ml TBE 0,3x durante 20 min a temperatura ambiente. El SYBR Gold, a diferencia del bromuro de etidio (compuesto comúnmente utilizado para teñir ADN), no es un agente intercalante, es decir, no se inserta en el espacio entre pares de bases, sino que se asocia a la molécula de ADN interactuando en el surco menor del ADN. El teñidor SYBR representa una alternativa como tinte al bromuro de etidio, ya que es 100 veces más sensible que éste y mucho menos dañino para la salud.

Para observar el ADN teñido, es necesario escanear el gel con fuente de excitación TransUV (GelDoc XR Biorad).

Esta tinción nos permitirá observar el oligonucleótido, ya sea libre o formando el complejo con la proteína.

Detección de la proteína HMGA1a(Δ50-91)

La detección de las bandas correspondientes a la proteína se realizará mediante la tinción en plata SilverQuest™ Silver Staining Kit de Invitrogen™ (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/silverquest_man.pdf).



Mediante la tinción en plata lograremos observar y comprobar la formación del complejo ADN-proteína. Si se tiñe una de las bandas que aparecía con la tinción con *SYBR® Gold*, representa la formación del complejo.

4.4 Preparación de oligonucleótidos

Los oligonucleotidos con los que trabajaremos provienen del Instituto Pasteur de París y los recibimos liofilizados con un grado de pureza que oscila entre 95 y 98%. Éstos son obtenidos mediante la síntesis en fase sólida usando el método de la fosforoamidita y purificados por HPLC. En este trabajo se estudiarán tres oligonucleótidos de distinta secuencia y longitud (Tabla 4-10).

OLIGONUCLEÓTIDOS	
Secuencia	Longitud (Nº nucleótidos)
CCAATTATCGCGATTATTGG	20
AATATATATATT	12
CATATATATG	10

Tabla 4-10. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Las muestras en polvo se disuelven normalmente en H₂O milliQ® estéril. El proceso de preparación de la disolución madre debe llevarse a cabo de manera cuidadosa y precisa, tomando en cuenta que la muestra en polvo es muy volátil. Es necesario evitar cualquier tipo de contaminación que pudiera alterar o degradar el ADN en el momento de preparar la disolución.

Para poder realizar los ensayos es indispensable conocer la concentración de oligonucleótido en la disolución madre. Para ello, en el espectrofotómetro se realiza por duplicado la lectura puntual de la absorbancia a 260 nm (máxima absorbancia de los enlaces fosfodiéster de los nucleótidos) de una solución con 0,5 µl de disolución madre en 500 µl de H₂O milliQ estéril. Se promedian los resultados de absorbancia a 260 nm y se aplica la ley de Lambert-Beer (Eq. 4-1) y el factor de dilución para determinar la concentración de la disolución.



El coeficiente de extinción a 260 nm de los oligonucleótidos se calcula mediante la ecuación de Cantor *et al.* (1970) (Eq. 4-2):

$$\epsilon_{260} = \epsilon_{DpEpFpGp\dots KpL} = 2 \cdot (\epsilon_{DpE} + \epsilon_{EpF} + \epsilon_{FpG} + \dots + \epsilon_{KpL}) - \epsilon_E - \epsilon_F - \epsilon_G - \dots - \epsilon_K$$

Eq. 4-2. Ecuación de Cantor *et al.*

En esta ecuación el coeficiente a 260 nm (ϵ_{260}) de un oligonucleótido de cualquier secuencia ($DpEpFpGp\dots KpL$), se calcula a partir de los coeficientes de extinción de cada tipo de enlace entre dos bases (ϵ_{DpE} , ϵ_{EpF} , ϵ_{FpG} , ..., ϵ_{KpL}) y el de las bases que aparecen en posiciones internas (ϵ_E , ϵ_F , ϵ_G , ..., ϵ_K). Los valores de los coeficientes se muestran en la Tabla 4-11.

DNA	Coefficiente de extinción, ϵ (l·mmol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	DNA	Coefficiente de extinción, ϵ (l·mmol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
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

Tabla 4-11. Coeficientes de extinción a 260 nm, 25°C, pH neutro, de cadena sencilla de ADN (Cantor *et al.*, 1970).

Por último, en el cálculo de la concentración de los oligonucleótidos se debe tener en cuenta que los valores de la Tabla 4-11 son para cálculos de coeficientes de cadena simple de ADN; y en nuestro caso, en las disoluciones con las que trabajaremos los oligos formarán doble cadena. Por lo tanto, la concentración calculada se debe de dividir entre dos para obtener la concentración del dúplex de ADN.



4.5 Preparación de fármacos de unión al surco estrecho del ADN

Los fármacos de unión al surco estrecho del ADN con los que realizaremos los ensayos de interacciones con ADN rico en AT son la droga P10 y la droga R05 (ver apartado 3.3.1 y 3.3.2). Estas drogas son comercializadas por *Sigma-Aldrich* y las recibimos en forma de polvo con una pureza del 98%.

Para el desarrollo de los ensayos cristalográficos es necesario preparar disoluciones de los fármacos utilizando como disolvente el DMSO (dimetil sulfóxido), en el cual ambos son solubles a una concentración menor o igual a 10 mg/ml.

Se efectuarán los cálculos para obtener la concentración molar de las disoluciones realizadas.

A pesar de que estos fármacos no son volátiles, es necesario preparar las disoluciones de manera muy cuidadosa y debe evitarse el contacto con la piel.

4.6 Estudios cristalográficos

Tal como se ha comentado anteriormente, en este trabajo se desea estudiar la estructura tridimensional de complejos de proteína-ADN y fármaco-ADN. Para lograrlo es necesario encontrar las condiciones óptimas de cristalización de estos complejos que permitan la obtención de cristales de calidad y posteriormente resolver su estructura.

4.6.1 Fundamentos de la cristalización

La cristalización de cualquier molécula se produce a partir de una solución sobresaturada. El cristal se forma mediante la adición ordenada de moléculas de soluto a un núcleo inicial de cristalización. Por tanto, el objetivo es la obtención de una solución sobresaturada en la cual se generen núcleos de cristalización que posteriormente formen cristales. Se desea la formación de pocos núcleos y que los cristales que surjan sean ordenados y de tamaño adecuado.

Dentro del estado de sobresaturación existen dos fases con características distintas (Fig. 4-12). La primera fase es la metaestabilidad. Un sistema metaestable tiende a evolucionar hacia el



punto de saturación pero es incapaz de hacerlo por requerir energía de activación para el proceso. Por otra parte, si el sistema sobrepasa de forma excesiva el punto de saturación pasa a la segunda fase que es la inestabilidad. En un sistema inestable la probabilidad de formación de núcleos productivos es mucho mayor, por lo que aparecen espontáneamente un gran número de cristales pequeños.

Por otra parte, una solución poco saturada necesita mucho tiempo para la formación de cristales debido a que la solución acepta todo el soluto y tarda mucho tiempo en separarse en forma sólida.

Es importante como se alcanza el punto de sobresaturación. Si se realiza de manera abrupta se produce la precipitación del complejo en forma de agregados amorfos, no ordenados, los cuales no pueden estudiarse por difracción de rayos X. Sin embargo, si se alcanza la sobresaturación poco a poco y se supera ligeramente la frontera de la zona metaestable hacia la zona inestable, es posible obtener cristales ordenados mediante la formación de pocos núcleos de cristalización donde el exceso de soluto se ordene de forma lenta y ordenada engrandeciendo los escasos cristales formados. La estrategia más utilizada para conseguirlo consiste en añadir a una solución concentrada de la molécula sustancias que disminuyan su solubilidad, generalmente disminuyendo la cantidad de solvente.

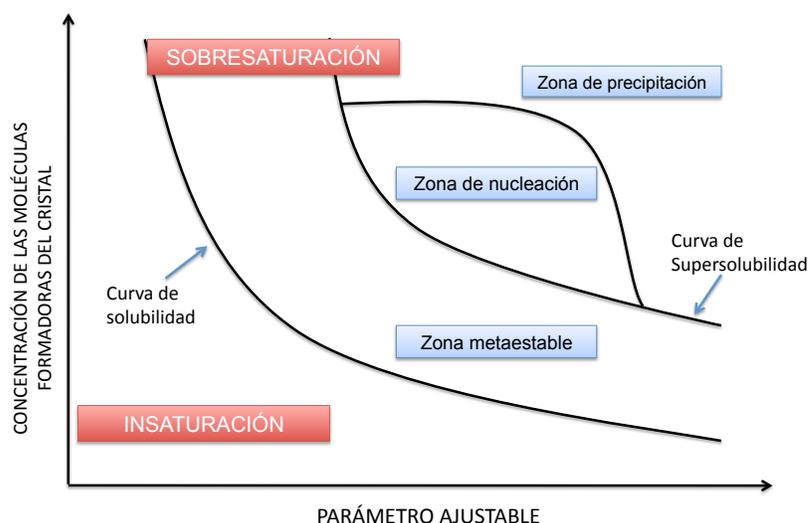


Fig. 4-12. Diagrama de fases. Solubilidad en función de la concentración de las moléculas a cristalizar y de un parámetro ajustable (Adaptado de Chayen, 2004).



En la mayoría de los casos, el proceso de cristalización es largo y difícil. Es necesario realizar un gran número de ensayos para obtener un cristal suficientemente bueno para poder ser estudiado mediante difracción de rayos X.

4.6.2 Condiciones para la cristalización

Para la obtención de cristales es necesario que las muestras (proteína, fármacos y oligonucleótidos en nuestro caso) cumplan con una serie de requisitos. Además, para poder llegar a la zona de sobresaturación es necesario tomar en cuenta los factores que afectan a la solubilidad del complejo.

Los requisitos necesarios para conseguir un buen cristal son:

- *Concentración de las muestras.* Para llegar a la sobresaturación es necesario que tanto el oligonucleótido como la proteína o fármaco de partida se encuentren a una elevada concentración. En el caso de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) humana, se logró la concentración de la muestra mediante ultracentrifugación (ver apartado 4.2.3). En cuanto a los oligonucleótidos y fármacos, se prepararon directamente disoluciones concentradas (ver apartado 4.4 y 4.5).
- *Pureza de la muestra.* Las contaminaciones e impurezas en las muestras del complejo limitan el tamaño, dificultan el crecimiento y aportan irregularidades a los cristales. Es necesario trabajar con muestras muy puras. El grado de pureza obtenido por cromatografía aporta a la proteína la pureza requerida (ver apartado 4.2.2), la cual fue corroborada con las técnicas electroforéticas del apartado 4.3.1 y 4.3.2. La pureza de los oligonucleótidos y de los fármacos la garantiza el proveedor que los suministra.
- *Homogeneidad de la muestra.* Se debe trabajar con muestras homogéneas para asegurar la formación de cristales con repeticiones unitarias prácticamente iguales.
- *Estabilidad.* Se debe de garantizar al máximo posible la estabilidad de las muestras (especialmente en el caso de la proteína y del ADN) durante los ensayos cristalográficos. Para ello, se trabaja a bajas temperaturas y en condiciones que limiten el riesgo de contaminación.



Para alcanzar un sistema de sobresaturación en la muestra es posible aumentar gradualmente la concentración de las moléculas a cristalizar mediante la eliminación de agua e incorporando cambios que disminuyan su solubilidad. En general, los factores que provocan estos cambios son los siguientes:

- Eliminación de agua por evaporación
- Variación del pH
- Variación de la temperatura
- Cambios en la fuerza iónica
- Precipitantes poliméricos.
- Disolventes orgánicos volátiles.
- Disolventes orgánicos poco volátiles
- Ligandos específicos

Es muy importante tener en cuenta la relación de concentraciones entre la proteína HMGA1a(Δ 50-91) o el fármaco y el oligonucleótido para la formación del complejo.

4.6.3 Metodología de cristalización: Cristalización por difusión de vapor

Existen diferentes estrategias para conseguir una correcta cristalización. En este trabajo se utilizará uno de los métodos más comunes: la difusión de vapor.

Esta técnica se basa en la concentración de proteína, péptidos o fármaco y ADN mediante la difusión de las especies volátiles en un sistema cerrado. El sistema está formado por una cámara semihermética que contiene un pozo o depósito donde se encuentra una solución con precipitante a una determinada concentración, y una gota (de mucho menor volumen que el pozo) que contiene las moléculas a cristalizar y el tampón de cristalización. El tampón de cristalización se compone, entre otras sustancias, de la solución precipitante pero en menor concentración que el pozo. La gota y el pozo no están en contacto.

La presión de vapor de agua es mucho mayor en la gota que en el pozo. Por lo tanto, la gota va perdiendo agua poco a poco hasta igualar las concentraciones de precipitante del pozo y de la gota.



En este proyecto se usó como precipitante el MPD (2-metil-2,4 pentanodiol), el cual es menos volátil que el agua, por lo que pasará agua de la gota al pozo provocando la disminución del volumen de la gota y el aumento de la concentración de los componentes que contiene. De esta manera se consigue llegar a la zona de sobresaturación y precipitar las moléculas, idealmente, en forma de cristal.

Existen dos variantes para llevar a cabo la técnica de cristalización por difusión de vapor: la gota colgante y la gota sentada. En este trabajo utilizaremos el método de gota colgante utilizando como soporte cápsulas individuales (Fig. 4-13).

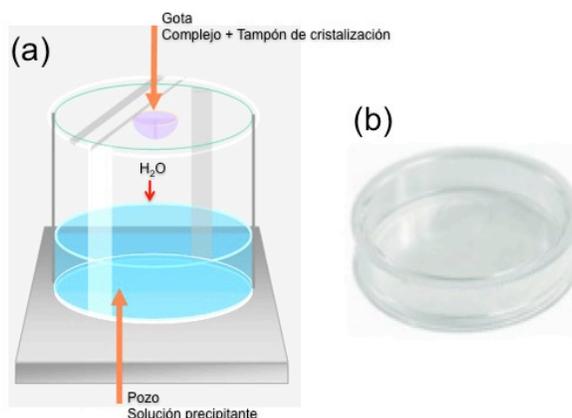


Fig. 4-13. (a) Esquema del sistema de cristalización por difusión de vapor con gota colgante. (b) Cápsulas ETS Cauver que se utilizarán para el desarrollo de los ensayos cristalográficos.

El procedimiento para llevar a cabo el método de gota colgada consiste en pipetear directamente los componentes de la gota sobre la parte interna de la tapa de la cápsula; la gota se mantiene adherida a ella. Asimismo, se pipetea la solución precipitante en el pozo (parte inferior de la cápsula) y se encajan las dos partes de la cápsula formando el sistema cerrado.

Se realizará un gran número de experimentos variando los diferentes factores mencionados en el apartado anterior para encontrar las condiciones óptimas de cristalización.

Para preparar las gotas se utilizará como tampón de cristalización las disoluciones comerciales Matrix-HR2-116 (Hampton Research). Estas disoluciones contienen sales, precipitantes poliméricos y solventes orgánicos a distintos pHs. Además, añadiremos algunos tampones



adaptados, es decir, preparados en el laboratorio con condiciones de concentración de componentes y pH adecuados para nuestra investigación.

El orden de adición de los distintos componentes de la gota es:

1. ADN
2. Tampón de cristalización
3. H₂O (para aforar al volumen final deseado)
4. Proteína o fármaco

El ADN con el tampón de cristalización se deja reposar un par de minutos, se observa la gota en el microscopio y se anotan las observaciones. Después de agregar la proteína o el fármaco, es necesario observar la gota nuevamente en el microscopio, anotar observación, y dejarlas reposar 30 min a temperatura ambiente. En algunos casos, transcurrido este tiempo, las condiciones de temperatura se bajarán gradualmente: 16°C por 10 min, después a 10°C por 20 min y por último se llevan a 4°C donde permanecerán durante el desarrollo del ensayo. En otros casos, se mantendrá la temperatura de las gotas a 10°C o a temperatura ambiente.

La solución del pozo inicial será de 20% MPD para todos los ensayos con proteína. A los ensayos con fármacos, además del 20% MPD se añadirá al pozo 5% de isopropanol. Para disminuir la solubilidad del complejo proteína/fármaco-ADN y así tratar de obtener cristales, aumentaremos gradualmente la concentración de MPD en el pozo.

Las cápsulas se deben inspeccionar periódicamente para observar su evolución, cambiar las condiciones del pozo y detectar la formación de cristales. Esto se hace comprobando la birrefringencia en un microscopio con luz polarizada.

Un cristal es bueno, es decir, se supone que está bien ordenado, cuando tiene los lados rectos, brilla mucho, extingue la luz polarizada, no tiene grietas y es uniforme. En el momento de cumplir con estas características físicas, se pesca el cristal y se congela con nitrógeno líquido hasta su posterior análisis por difracción de rayos X.

La “pesca” consiste en la captura del cristal en la gota donde se ha formado. Esto se realiza a 4°C con la ayuda de un *cryo-pin*, el cual consta de un lazo de nylon muy delgado (*loop*) unido a una varita metálica y sujeto a una base magnética (Fig. 4-14). Inmediatamente después de ser



pescado, el cristal en el *cryo-pin* se inserta en el *cryo-vial* y se coloca en una caña sumergida en nitrógeno líquido para evitar su degradación.

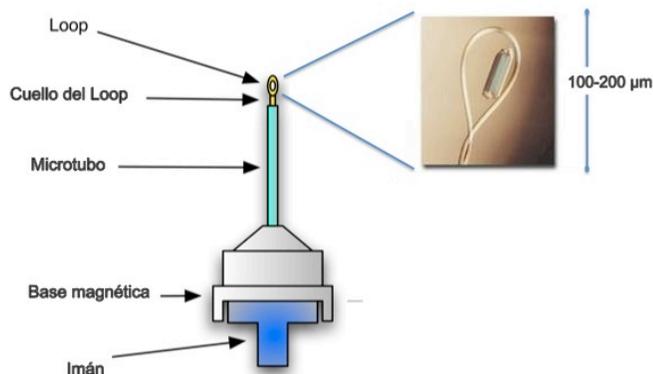


Fig. 4-14. Esquema de *cryo-pin* (izquierda) y detalle de un *loop* con un cristal (derecha).

4.7 La cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X es una técnica experimental para estudiar y analizar moléculas y biomoléculas basada en el fenómeno de difracción de los rayos X de sólidos en estado cristalino para la determinación de su estructura tridimensional. Uno de los pasos más importantes de esta técnica es la obtención de cristales de suficiente calidad para ser difractados (apartado 4.6). El estudio estructural correctamente realizado proporciona la información a escala atómica de la estructura tridimensional del material cristalizado.

4.7.1 Estructura cristalina

Bajo ciertas circunstancias, muchas moléculas, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos, solidifican formando cristales. Al entrar en el estado cristalino desde una solución, las moléculas individuales de la sustancia adoptan una o unas pocas orientaciones idénticas. El cristal resultante es una matriz o red tridimensional ordenada de moléculas, átomos o iones unidas por interacciones no covalentes.



La Fig. 4-15c representa una matriz cristalina de moléculas. Las líneas de la figura dividen el cristal en *celdas unitarias* idénticas. Al conjunto de puntos en las esquinas o vértices de las celdas unitarias se le llama *red*.

La celda unitaria es el elemento más pequeño y más simple volumen que es completamente representativo de todo el cristal. Su tamaño viene determinado por la longitud de sus tres aristas (a , b , c) y la forma por el valor de los ángulos entre dichas aristas (α , β , γ) (Fig. 4-15b). Al conjunto de átomos, moléculas o iones que forman la celda unitaria de la red se le llama *motivo* o *unidad asimétrica* (Fig. 4-15a).

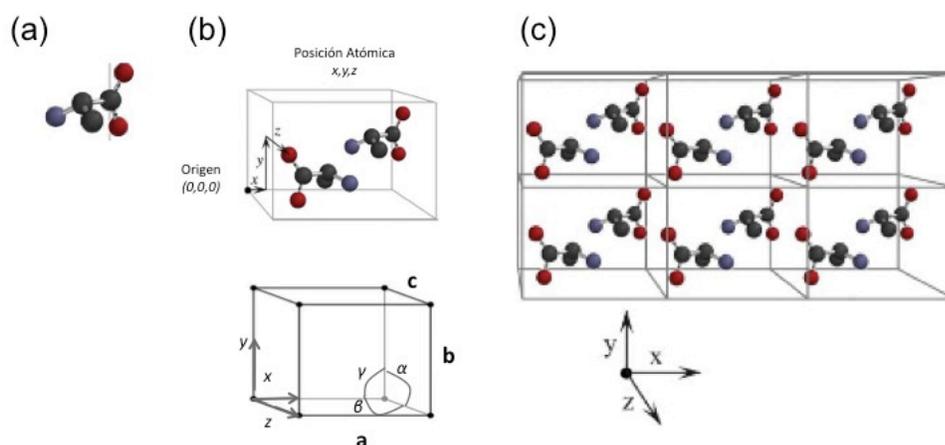


Fig. 4-15. Esquema de las partes que forman una estructura cristalina (a) Unidad asimétrica; (b) celda unitaria y parámetros que la caracterizan; y (c) red cristalina (adaptado de Blinder, 2004)

Se conoce como *grupo espacial* al conjunto de operaciones de simetría que puede presentar la unidad asimétrica para generar la celda unitaria. Según las Tablas Internacionales para Cristalografía de Rayos X (*International Tables for X-Ray Crystallography*, 1969) existen 230 grupos espaciales posibles (también llamados grupos de Laue). Las restricciones de los compuestos orgánicos hacen que el número de grupos espaciales se reduzca a 65.



4.7.2 Difracción de rayos X

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas con una longitud de onda comprendida entre 0,1 y 150 Å, longitud comparable con la distancia interatómica de las biomoléculas estudiadas.

La difracción se debe esencialmente a la relación entre las fases de todas las ondas reflejadas por cada celda unitaria del cristal. Los rayos inciden sobre el cristal en una determinada dirección. Los rayos que han atravesado distintos puntos del cristal siguen caminos ópticos de diferente longitud y esta diferencia da lugar a un cambio en la amplitud de la onda resultante. Cuando las ondas están completamente desfasadas se anulan entre sí: interferencia destructiva. Por el contrario, cuando las ondas están en la misma fase, la amplitud de la onda final es la suma de las amplitudes para cada onda: interferencia constructiva. Puesto que un cristal está compuesto de miles de celdas unitarias, la interferencia constructiva entre todas ellas resulta en un haz lo suficientemente intenso para poder ser medido con un detector de rayos X.

Para describir el fenómeno de la difracción se puede hacer uso de modelos físicos y geométricos, basados estos últimos en los modelos de Lawrence Bragg de 1913. Estos modelos establecen que cuando los rayos X interactúan con estructuras cristalinas, se comportan como una reflexión óptica que da lugar a unos planos virtuales de la red cristalina (planos de Bragg). Así, la difracción se produce entre planos paralelos distanciados entre sí un valor d , para un ángulo de incidencia θ , tal que la diferencia del camino recorrido por las dos ondas sea igual a un múltiplo de la longitud de onda λ (Fig. 4-16).

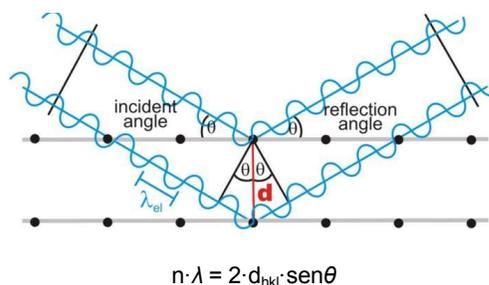


Fig. 4-16. Ley de Bragg. Donde: n = orden de difracción, λ = longitud de onda, d_{hkl} = distancia entre los planos de difracción y θ = ángulo de incidencia de la radiación.



La ley de Bragg requiere la distancia entre los planos de difracción (d_{hkl}), para ello se requieren los *índices de Miller*. Se utilizan para caracterizar e identificar cada familia de planos y están formados por tres números enteros (h,k,l).

Difracción de cristales obtenidos

Como se mencionó anteriormente, los mejores cristales que se obtengan en este trabajo se difractarán en las instalaciones de la Plataforma Cristalográfica del Parc Científic de Barcelona (PCB) y en el Sincrotrón Alba de Barcelona (Fig. 4-17).

En el Parc Científic de Barcelona, los rayos X se producen de manera convencional por un generador de ánodo rotatorio. El ánodo de cobre se bombardea con electrones acelerados que se emiten desde un filamento incandescente. La radiación así generada está formada por un conjunto de radiaciones monocromáticas de longitud de onda de 1,5418 Å sobrepuestas al espectro continuo.

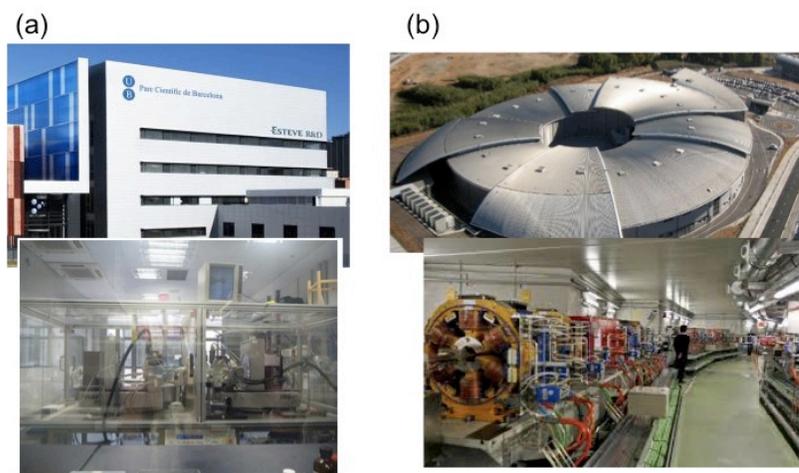


Fig. 4-17. (a) Instalaciones de la Plataforma Cristalográfica del Parc Científic de Barcelona y (b) Sincrotrón Alba de Barcelona.

En cambio, la radiación sincrotrón se genera de manera diferente. Un sincrotrón es un acelerador de partículas en forma de anillos toroidales de gran extensión. Las partículas cargadas eléctricamente circulan a lo largo del gran anillo toroidal a velocidades cercanas a la de la luz. El movimiento de las partículas es posible gracias a campos magnéticos creados por



grandes imanes. Esta energía es la radiación utilizada en las diferentes líneas del sincrotrón, el cual permite trabajar en una amplia gama de longitudes de onda y con un alto grado de energía.

En el momento de difractar el cristal previamente pescado y conservado en nitrógeno líquido (ver apartado 4.6.3), el procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Retirar el vial que guarda al *cryo-pin* con el cristal de la caña con pinzas especiales.
2. Abrir el *cryo-pin* con la ayuda de una varita metálica y colocarlo en el criotrón (un tipo de pinzas que ayudan a mantener el cristal congelado).
3. Ajustar la base del *cryo-pin* al cabezal del goniómetro.
4. Retirar el criotrón, evitando el contacto con el *loop*.
5. Centrar el goniómetro para que los rayos X incidan sobre la muestra a lo largo de los 360° de giro.

El proceso es vigilado desde una cabina de control donde es posible manipular diferentes variables del programa y donde son almacenados los datos obtenidos. Las variables que se controlan son la longitud de onda (en el caso del PCB es única e igual a 1,5418 Å), el tiempo de exposición, la distancia entre el cristal y el detector, el ángulo de rotación en la obtención de cada imagen, el ángulo total que gira durante toda la recogida y el número de imágenes realizadas.

Una vez obtenidos los datos de la difracción y dependiendo de la calidad del cristal, éstos se analizan para encontrar la resolución de la estructura de la molécula difractada. El proceso de análisis de los diagramas de difracción consta de las siguientes fases:

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





5 Resultados y Discusión

5.1 Obtención de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) humana en *Escherichia coli*

La proteína HMGA1a(Δ 50-91) se obtuvo en un cultivo bacteriano mediante la técnica del ADN recombinante. Se utilizó como célula huésped la cepa Rosetta (DE3) pLysS de la bacteria *Escherichia coli* la cual fue transformada con el plásmido pETa-HMGA1a(Δ 50-91) (Fig. 4-3) para que expresara la proteína de interés. El protocolo que se siguió se explica en el apartado 4.1 y se muestra en el esquema de la Fig. 5-1.

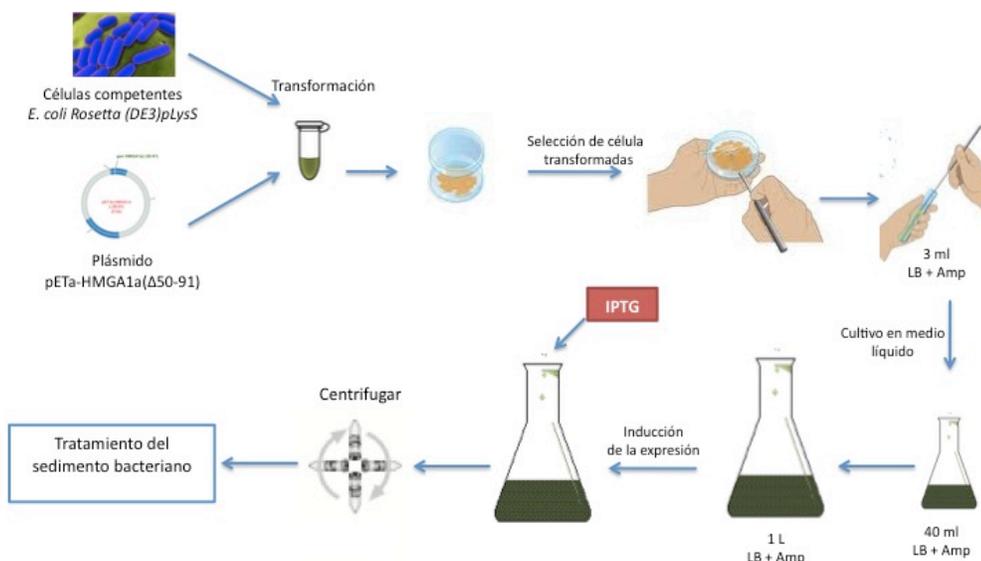


Fig. 5-1. Esquema del proceso de obtención de HMGA1a(Δ 50-91) en *E. coli* mediante la técnica del ADN recombinante.

Las células competentes y el plásmido se sometieron a un proceso de choque térmico para lograr la transformación. La solución de bacterias se cultivó en una placa petri con medio LB y ampicilina donde crecieron únicamente las células transformadas. Una vez seleccionada y picada una colonia de bacterias, ésta fue cultivada en un tubo con 3 ml de medio líquido (LB+Amp) por seis horas a 37°C y con agitación a 250 rpm. Posteriormente, se pasó el contenido del tubo a un matraz con 50 ml de medio fresco y se incubó O.N. en las mismas condiciones. El día siguiente, se inoculó un volumen suficiente de este cultivo sobre 1 litro de



medio líquido fresco para conseguir que la DO_{600} estuviera entre 0,1 y 0,2. Concretamente, se añadió 25 ml del cultivo a 1 L de medio con lo que se obtuvo una DO de 0,1027. Se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6-0,7. Aproximadamente en tres horas, el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0,6540. Este rango de densidad de bacterias nos indica que el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento. La inducción con IPTG para la expresión de la proteína se inicia en este momento.

El cultivo se dejó incubar por tres horas durante las cuales las bacterias expresaron la HMGA1a(Δ 50-91). Tanto en el inicio ($t=0$ h) como durante la inducción ($t=1,5$ h y $t=3$ h) se tomaron alícuotas para control electroforético (Fig. 5-2).

La proteína HMGA1a(Δ 50-91) se produce en el interior de la bacteria y no es secretada al medio. Por lo tanto, es necesario realizar un tratamiento celular para recuperar la proteína. El protocolo utilizado se describe en el apartado 4.2 y permite extraer la proteína de interés del interior celular y eliminar una parte significativa de las impurezas (otras proteínas bacterianas).

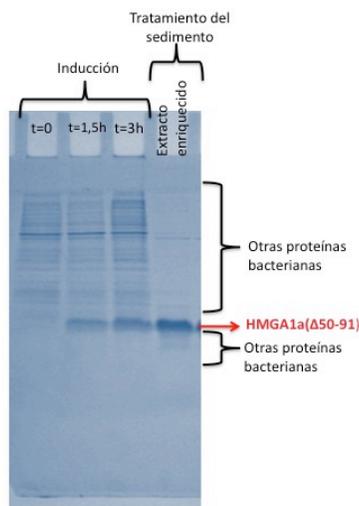


Fig. 5-2. Análisis electroforético en gel SDS-PAGE del proceso de inducción y el tratamiento del sedimento bacteriano para la obtención de HMGA1a(Δ 50-91).

La Fig. 5-2 muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE de la expresión de HMGA1a(Δ 50-91) (pozos 1-3). Se puede observar como la cantidad de proteína aumenta al avanzar el tiempo de inducción, así como la presencia de otras proteínas de origen bacteriano. Asimismo, en el pozo



4 se muestra el resultado final del tratamiento del sedimento bacteriano. Se observa como se ha conseguido un extracto muy enriquecido en la proteína HMGA1a(Δ 50-91) logrando disminuir en gran medida las proteínas propias de la bacteria.

A pesar de haber eliminado muchas impurezas de la muestra de HMGA1a(Δ 50-91), es necesaria la purificación de la misma mediante técnicas cromatográficas.

5.2 Purificación cromatográfica de la proteína

5.2.1 Cromatografía de intercambio catiónico

El proceso de purificación de la HMGA1a(Δ 50-91) se inicia con la técnica de cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna empaquetada con 25 ml de carboximetil celulosa de 1,5 cm de diámetro y 18 cm de longitud (CM52, Whatman) (ver apartado 4.2.1).

El extracto enriquecido proveniente del tratamiento de sedimento de bacterias se disuelve en 10 ml de la solución A (50 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7) y se centrifuga por 10 min a 10000 rpm a 4°C (rotor SS34) para eliminar posibles restos insolubles que pudieran obturar la columna.

El sobrenadante representa la muestra de partida (MP), es decir, la muestra lista para ser cargada en la columna. Se reserva una alícuota de la MP y una del sedimento (ND, muestra no disuelta) para control electroforético.

Para lograr la separación de la HMGA1a(Δ 50-91) de otras proteínas que se encuentran en la MP se utilizaron tres disoluciones que varían en la concentración de cloruro de sodio. Previo a aplicar la muestra de partida en la columna, es necesario lavarla con solución A (50 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7) para equilibrar la columna a las condiciones de trabajo. Posteriormente, cargamos la muestra de partida e iniciamos el programa, previamente configurado en el equipo con el método que se muestra en el diagrama de la Fig. 5-3.



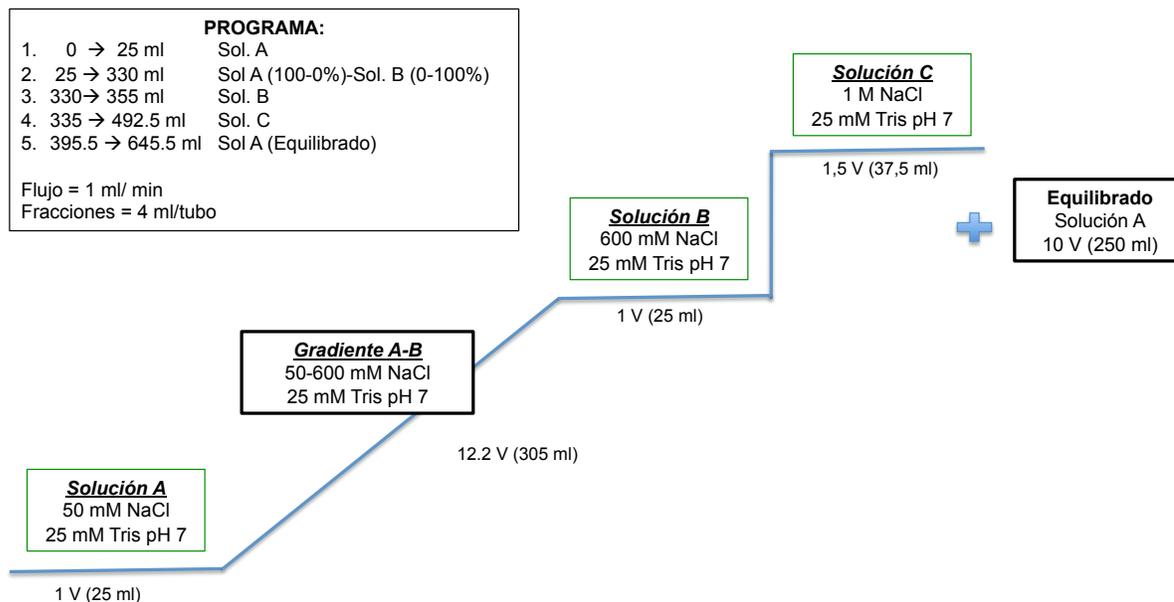


Fig. 5-3. Esquema del programa utilizado para realizar la técnica de cromatografía de intercambio catiónico. El programa aumenta gradualmente el gradiente A-B de manera automática. El volumen V, hace referencia al volumen de la matriz empaquetada.

Tal como se indica en la Fig. 5-3, se hacen circular las soluciones a través de la columna a un flujo constante de 1 ml/min, lo que significa que el tiempo estimado de la cromatografía es de 8,2 horas más aproximadamente 4 horas de equilibrado. La recogida de muestras se realiza del paso 1 al 4 del programa en fracciones de 4 ml y se mide su absorbancia a 220, 260 y 276 nm. Las proteínas absorben a 220 nm (enlace peptídico) y a 276 nm si contienen aminoácidos aromáticos. Es importante señalar que la proteína HMGA1a(Δ 50-91) no contiene aminoácidos aromáticos. La medición de la absorbancia a 260 y 276 se realiza para detectar posibles contaminaciones de ADN y de otras proteínas, respectivamente.

En la Fig. 5-4 se muestra el cromatograma correspondiente a las fracciones obtenidas en la columna de intercambio catiónico. En él se puede observar la presencia de dos picos de absorbancia a 220 nm. El primero es pequeño y corresponde a las primeras fracciones eluidas con la solución A. El segundo pico es mayor y corresponde a las fracciones que eluyeron al final del gradiente (Solución A-B).



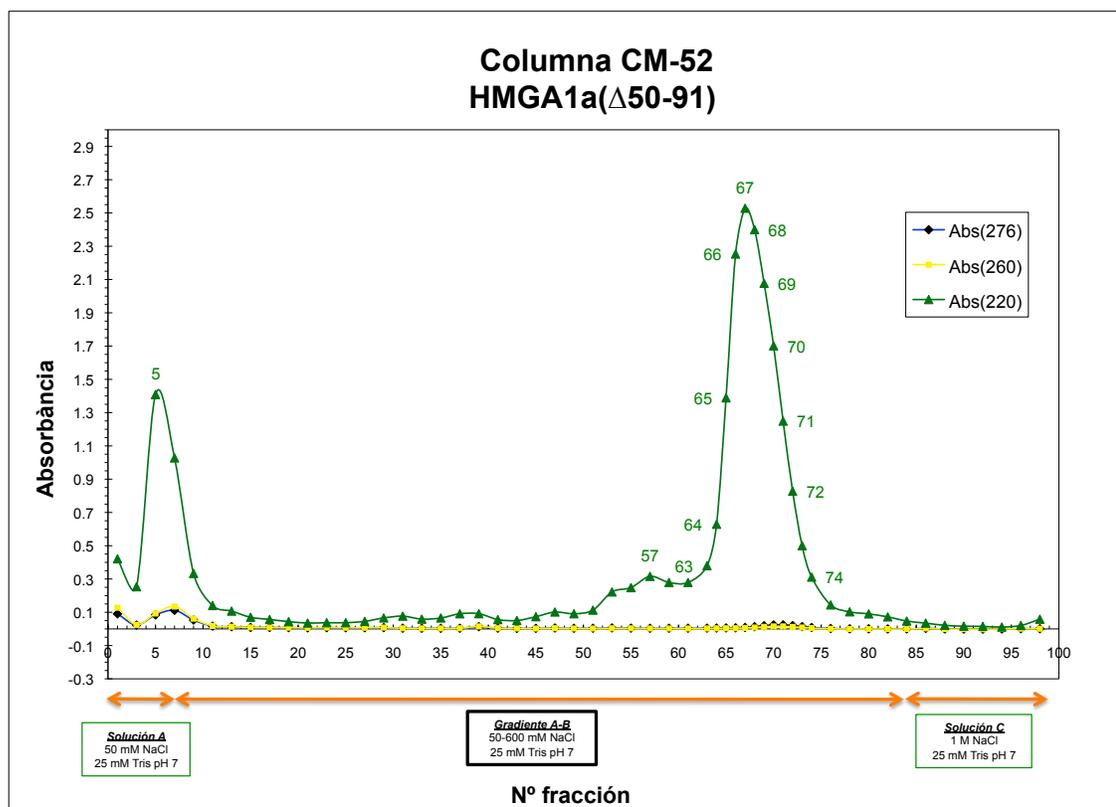


Fig. 5-4. Cromatograma de la columna de intercambio catiónico CM52. Las fracciones marcadas en la curva de absorbancia a 220 nm corresponden a las analizadas electroforéticamente.

Las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia a 220 nm se analizaron electroforéticamente (Fig. 5-5). Las muestras cargadas en el gel AU-PAGE se precipitaron previamente con TCA (25%) para eliminar sales que dificultan la electroforesis (siguiendo el protocolo de preparación de muestras para geles AU-PAGE del apartado 4.3.2).

Tal como se esperaba, las fracciones que formaron el pico principal de absorbancia corresponden a la proteína de interés, la HMGA1a(Δ 50-91) (Fig. 5-5). Se observa también como la centrifugación de la muestra original hizo posible la eliminación de muchas proteínas contaminantes de la muestra de partida que se quedaron en el sedimento (ND).



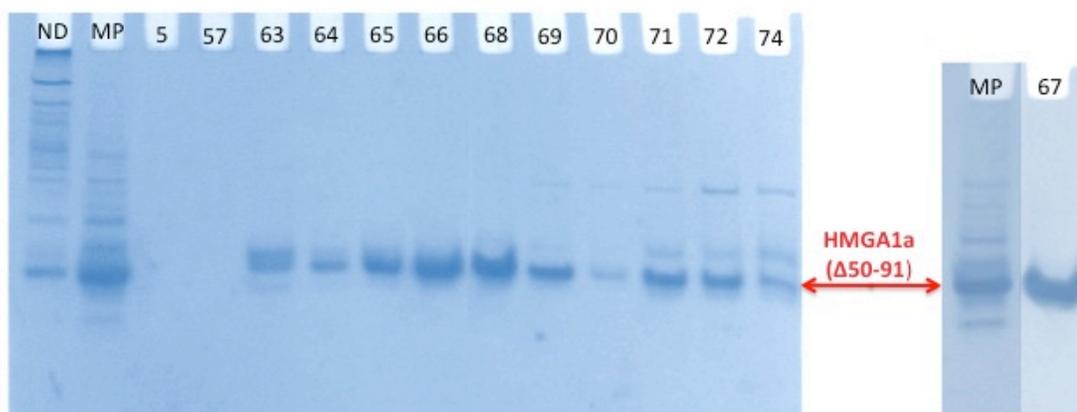


Fig. 5-5. Gel AU-PAGE con las muestras más representativas de la columna de intercambio catiónico CM52. ND: No Disuelto; MP: Muestra de Partida.

Las muestras más puras son de la fracción 65 a la 70. A partir de la fracción 71 se observan también una cierta proporción de otras bandas por encima y debajo de la banda de la HMGA1a(Δ50-91). Por lo tanto, se concentrarán las fracciones 65-70 para continuar con el segundo paso de la purificación, las fracciones 64, 71 y 72 se guardan a -20°C, y el resto de fracciones se descartan.

5.2.1.1 Concentración y cuantificación de la proteína HMGA1a(Δ50-91) obtenida

Las fracciones provenientes de la columna de intercambio catiónico se reunieron según el grado de pureza (Tabla 5-1). Es necesario concentrar las muestras hasta un volumen adecuado para el siguiente paso de purificación. El proceso de concentración de muestras se describe en el apartado 4.2.3.



Columna CM52 Nº Fracción	Volumen	Uso
64	4 ml	Guardar
65, 66, 67	12 ml	Concentrar y seguir purificando
68	4 ml	
69, 70	8 ml	
71-72	8 ml	Guardar

Tabla 5-1. Fracciones de la columna de intercambio catiónico reunidas según el grado de pureza. Las muestras [65,66,67], [68] y [69,70] de 12, 4 y 8 ml respectivamente serán concentradas a volúmenes ≤ 1 ml.

El diagrama de la Fig. 4-8 muestra el proceso de concentración que se llevó a cabo utilizando el dispositivo de concentración Vivaspin® 20 ml MWCO 3000. Cuando el volumen de la muestra fue del orden de 1 ml finalizó el proceso y se procedió a leer la absorbancia de las muestras concentradas para determinar su concentración. También se leyó la absorbancia de las muestras filtradas por el Vivaspin®.

La cuantificación de la proteína HMGA1a($\Delta 50-91$) de las muestras concentradas se calculó haciendo uso de la ecuación de Lambert-Beer (Eq. 4-1) a partir de los valores de absorbancia y del coeficiente de extinción molar de proteína a 220 nm. Así, tenemos que:

$$[HMGA1a(\Delta 50 - 91)] = \frac{A_{220}}{\epsilon_{220} \cdot l} = \frac{A_{220}}{\left(7,99 \frac{ml}{mg \cdot cm}\right)(1 cm)} = \frac{A_{220}}{7,99 \frac{\mu l}{\mu g}}$$

La absorbancia se midió dos veces por muestra. La primera lectura se hizo añadiendo 1 μ l de muestra a 800 μ l de Solución A. Después, se añadió 1 μ l a la misma disolución y se determinó de nuevo la absorbancia. Para obtener la concentración real de la proteína es necesario aplicar el factor de dilución de cada lectura a la ecuación anterior. Las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 5-2 y la Fig. 5-6 muestra el grado de pureza de las muestras concentradas. Los filtrados no absorbieron a 220 nm, lo que significa que no se perdió proteína en el proceso de concentración.



Muestra	Columna CM52	Volumen inicial	Volumen Final	Concentración	
				$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	mM
A	65, 66, 67	12 ml	1 ml	7,356	1,54
B	68	4 ml	650 μl	5,591	1,17
C	69, 70	8 ml	1 ml	3	0,63

Tabla 5-2. Características de las muestras concentradas provenientes de la CM52.

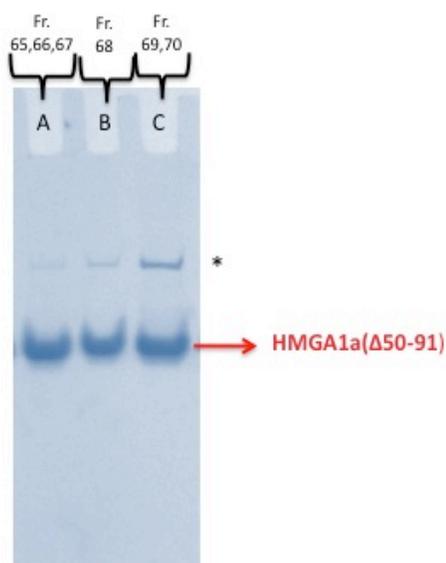


Fig. 5-6. Gel AU-PAGE de muestras concentradas. (*) Banda de menor migración electroforética que la HMGA1a(Δ 50-91).

El análisis electroforético de las muestras concentradas confirma la necesidad de continuar con la purificación de la HMGA1a(Δ 50-91) ya que las tres muestras concentradas contienen (en diferente proporción) trazas de otras proteínas.



5.2.2 Cromatografía de exclusión molecular

El siguiente paso en el proceso de purificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) es la cromatografía de exclusión molecular, que separará las moléculas en función de su tamaño. Esta técnica cromatográfica permitirá obtener fracciones muy puras de la proteína de interés, aptas para su cristalización.

Para llevarla a cabo, se utilizó un sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) con la columna *Superdex™ Peptide 10/300 GL* de GE Healthcare y el equipo el equipo *ÅKTA Purifier 10*.

La columna tiene un volumen empaquetado de 24 ml con un rango óptimo de separación de péptidos de masa molecular entre 100 y 7000. El rango de volumen de la muestra de partida aceptable es entre 25 y 500 μ l y admite una concentración de péptido en la muestra menor o igual a 10 mg.

Las muestras A, B y C (ver Tabla 5-2) se centrifugan por 10 min a 10000 rpm 4°C (microfuga). El sobrenadante representa la muestra de partida (MP) lista para ser cargada en la columna. Se reserva una alícuota de la MP y una del sedimento (ND, muestra no disuelta) para control electroforético.

Debido a que el volumen de las MP supera el máximo volumen de muestra recomendado para la columna (500 μ l), es necesario dividir las en 2 o 3 alícuotas según su volumen.

El proceso es más sencillo que el de la cromatografía de intercambio catiónico. El tampón de equilibrado y de elución es el mismo: 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5. El esquema de la Fig. 5-7 muestra el procedimiento utilizado.



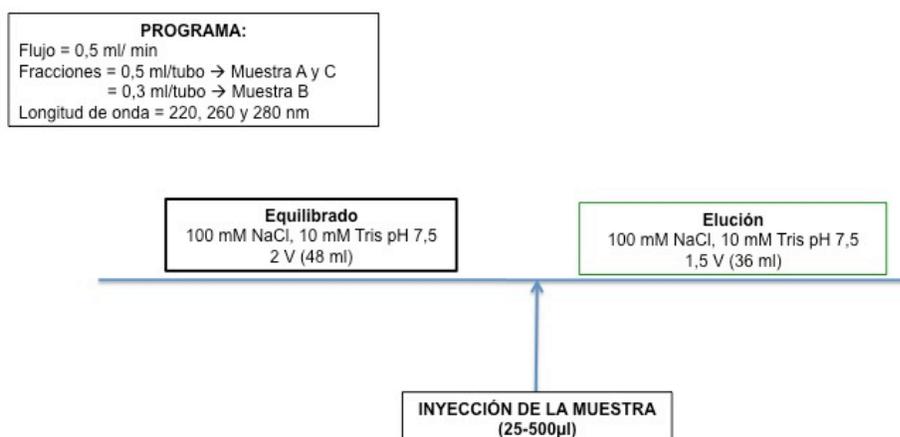


Fig. 5-7. Esquema del programa utilizado para realizar la técnica de cromatografía de exclusión molecular. El volumen V, hace referencia al volumen de la columna.

Iniciamos esta técnica con la muestra A. Una vez preparada la MP, la dividimos en tres alícuotas. Como indica el programa, el tampón correspondiente se hace pasar por la columna a un flujo de 0,5 ml/min. Se recogieron las muestras en fracciones de 0,5 ml por tubo. Al igual que en la cromatografía de intercambio catiónico, se midió la absorbancia a 220, 260 y 280 nm.

La Fig. 5-8, muestra los cromatogramas obtenidos con las tres alícuotas de la muestra A. Las fracciones que forman el pico a 220 nm en el cromatograma fueron analizadas por electroforesis para asegurar la presencia de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) y la pureza de la misma (Fig. 5-9).

Asimismo, el proceso de purificación continuó con las muestras B y C. La muestra B se dividió en dos alícuotas de aproximadamente 300 μ l cada una, y la muestra C se alícuotó en tres, con volúmenes de 100, 500 y 350 μ l. A diferencia de las muestras A y C, el volumen de las fracciones de recogida de B fue de 300 μ l por tubo. Los cromatogramas se muestran en las Fig. 5-10 y Fig. 5-12, para la muestra B y C respectivamente. De la misma manera que la muestra A, las fracciones resultantes de las cromatografías que absorbieron a 220 nm fueron analizadas por métodos electroforéticos para comprobar la presencia y pureza de la HMGA1a(Δ 50-91) (Fig. 5-11 y Fig. 5-13).

Se observa como la fracción contaminante de menor movilidad electroforética, al ser de menor tamaño, eluye antes que la proteína HMGA1a(Δ 50-91).



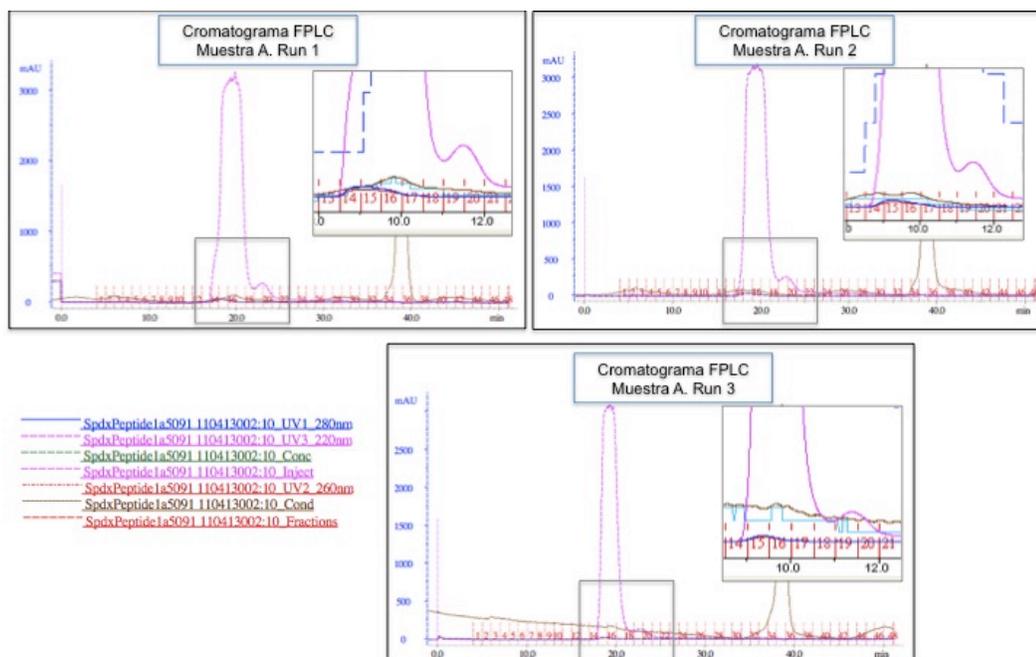


Fig. 5-8. Cromatogramas de las columnas de exclusión molecular de la muestra A. La curva rosa corresponde a la absorbancia a 220 nm. El recuadro de la derecha de cada cromatograma, muestra una ampliación de las fracciones que absorben a esta longitud de onda.

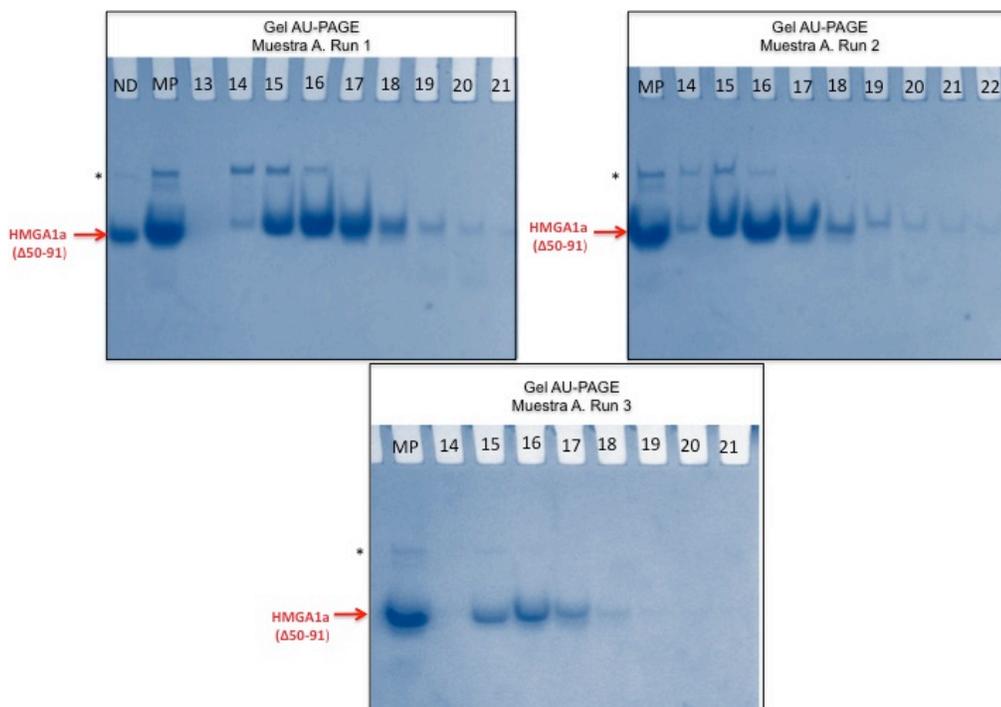


Fig. 5-9. Geles AU-PAGE de las fracciones representativas de la cromatografía de exclusión molecular de la muestra A. (*) Banda de menor velocidad electroforética que la HMGA1a(Δ 50-91).



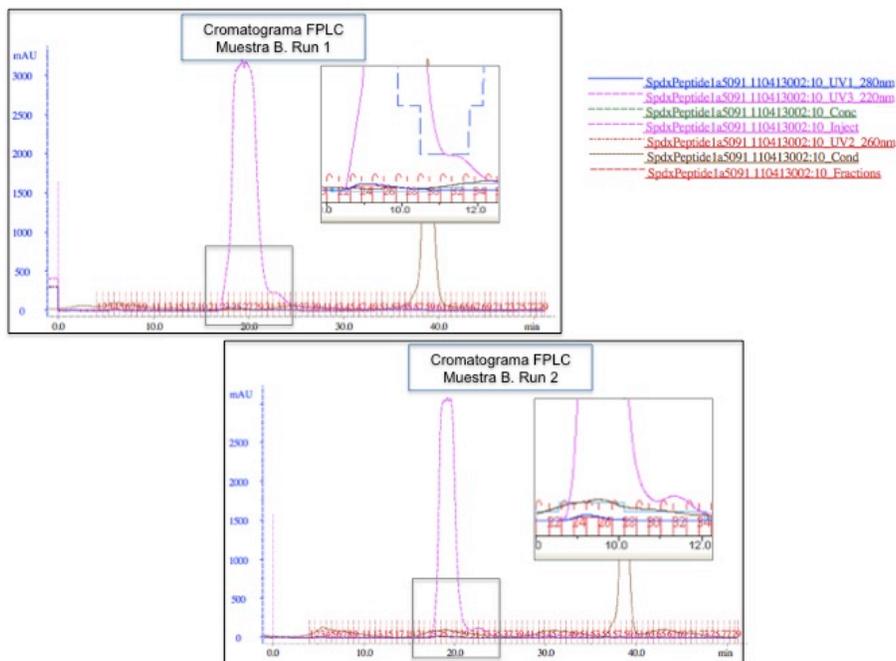


Fig. 5-10. Cromatogramas de las columnas de exclusión molecular de la muestra B. La curva rosa corresponde a la absorbancia a 220 nm. El recuadro de la derecha de cada cromatograma, muestra una ampliación de las fracciones que absorben a esta longitud de onda.

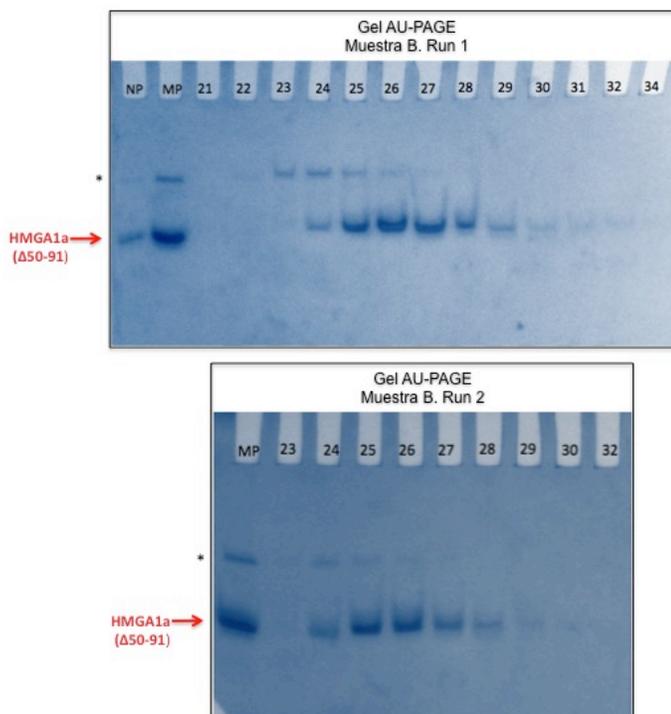


Fig. 5-11. Geles AU-PAGE de las fracciones representativas de la cromatografía de exclusión molecular de la muestra B. (*) Banda de menor velocidad electroforética que la HMGA1a(Δ 50-91).



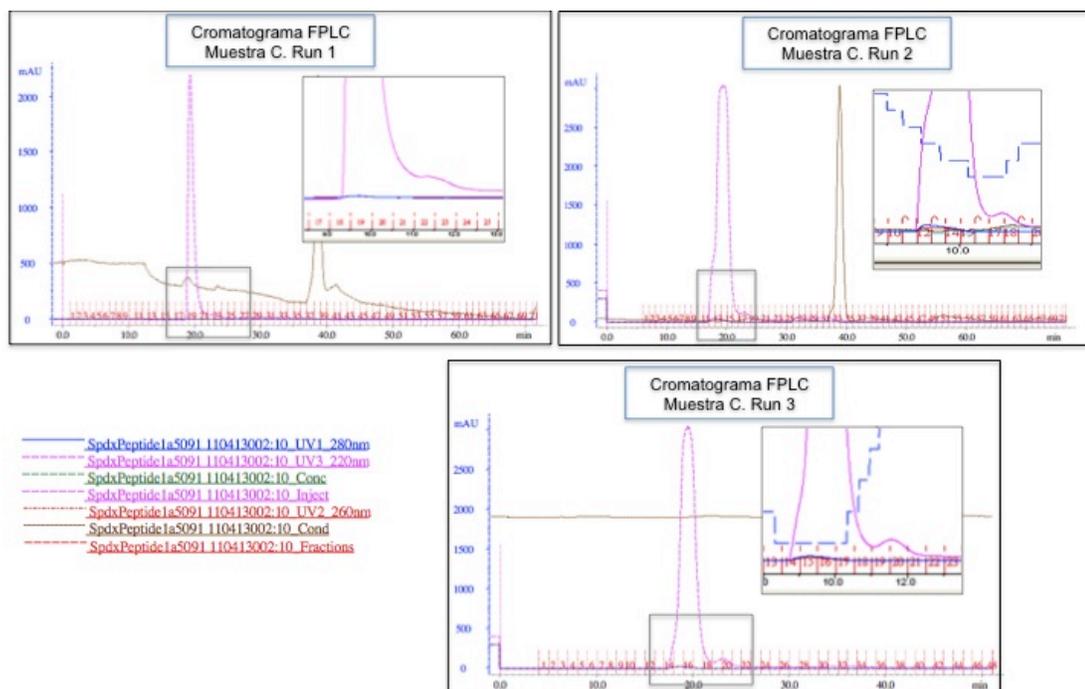


Fig. 5-12. Cromatogramas de las columnas de exclusión molecular de la muestra C. La curva rosa corresponde a la absorbancia a 220 nm. El recuadro de la derecha de cada cromatograma, muestra una ampliación de las fracciones que absorben a esta longitud de onda.

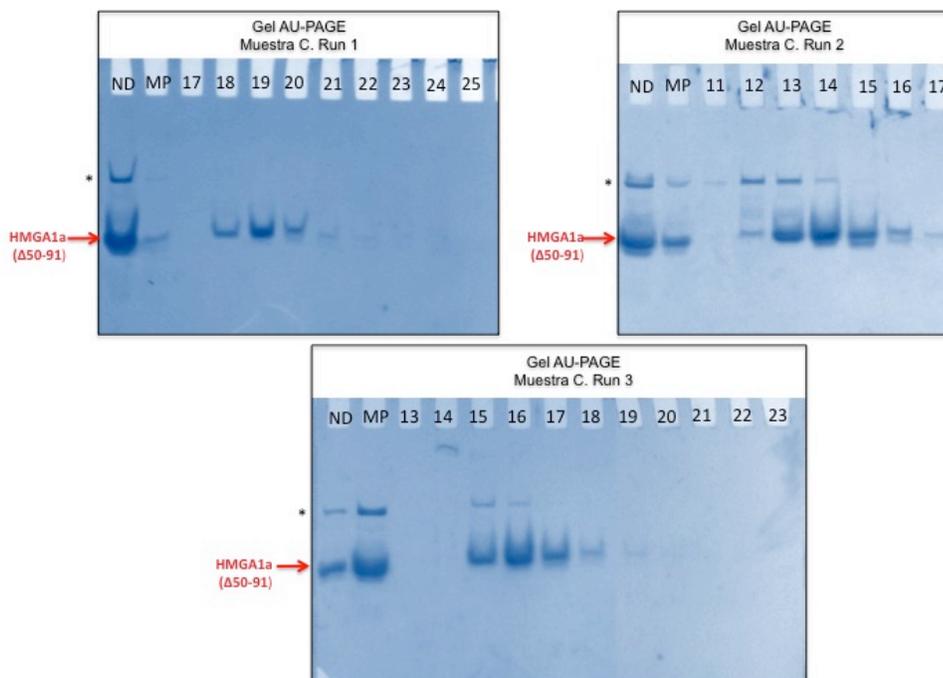


Fig. 5-13. Geles AU-PAGE de las fracciones representativas de la cromatografía de exclusión molecular de la muestra C. (*) Banda de menor velocidad electroforética que la HMGA1a(Δ50-91).



5.2.2.1 Diálisis, concentración y cuantificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) obtenida

Analizando los resultados obtenidos en el proceso de purificación de la HMGA1a(Δ 50-91), se reunieron las fracciones de las cromatografías de exclusión molecular según su grado de pureza de la siguiente manera:

Fr. Columna FPLC	Muestra (Run)	Nº muestra	Volumen	Fr. Columna FPLC	Muestra (Run)	Nº muestra	Volumen
15	A(1)	M1	2,1 ml	17,18	A(1)	M3	4,2 ml
15	A(2)			17,18	A(2)		
15	A(3)			17,18	A(3)		
25	B(1)			28,19	B(1)		
25	B(2)			28,19	B(2)		
16	A(1)	M2	2,7 ml	13	C(2)	M4	1 ml
16	A(2)			15	C(3)	M5	1 ml
16	A(3)			14	C(2)		
26,27	B(1)			16	C(3)	M6	2 ml
26,27	B(2)			15,16	C(2)		
				17,18	C(3)		

Tabla 5-3. Fracciones de las columnas de cromatografía de exclusión molecular reunidas según el grado de pureza.

El proceso de diálisis y concentración de muestras se describe en el apartado 4.2.3. En este momento, las muestras reunidas 1-6 (Nº muestra de la Tabla 5-3) se encontraban disueltas en el tampón de elución de la última cromatografía realizada: 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5.

Mediante el proceso descrito en el diagrama de la Fig. 4-9, utilizando concentradores Vivaspín® 6 ml MWCO 3000, se realizó la diálisis y concentración de las muestras. Cuando el volumen de las muestras era de aproximadamente 100 μ l, se realizó el primer lavado con el tampón final de trabajo: 80 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7,5. En total, se hicieron dos lavados de 6 ml con el tampón final. Finalmente, se concentraron las muestras hasta volúmenes del orden de 100 μ l y se determinó su absorbancia a 220 nm por duplicado de la misma manera que en el apartado 5.2.1.1. También se determinó la absorbancia a 220 nm de los filtrados.



La cuantificación de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) de las muestras concentradas se calculó nuevamente con la ecuación de Lambert-Beer (Eq. 4-1) a partir de los valores de absorbancia y del coeficiente de extinción molar de proteína a 220 nm.

Las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 5-4 y en la Fig 5-14 se muestra el grado de pureza de las muestras concentradas.

Muestra	Volumen inicial	Volumen final	Concentración	
			$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	mM
M1	2,1 ml	75 μl	8,7602	1,8321
M2	2,7 ml	108 μl	19,9704	4,1765
M3	4,2 ml	100 μl	1,6023	0,3351
M4	1 ml	80 μl	4,8149	1,0070
M5	1 ml	102 μl	7,1325	1,4917
M6	2 ml	113 μl	0,3863	0,0808

Tabla 5-4. Características de muestras reunidas después de la cromatografía de exclusión molecular.

En cuanto a las muestras filtradas, el análisis espectrofotométrico indicó una elevada absorbancia a 220 nm, lo que significa que se ha perdido proteína en el proceso de diafiltración. Las muestras filtradas se guardaron a -20°C para otros usos.

En el gel de electroforesis AU-PAGE de las fracciones concentradas se cargaron dos cantidades distintas de cada una de las muestras: 3 μg y 6 μg de proteína HMGA1a(Δ 50-91). De esta manera se puede observar más claramente si existe alguna banda contaminante minoritaria.



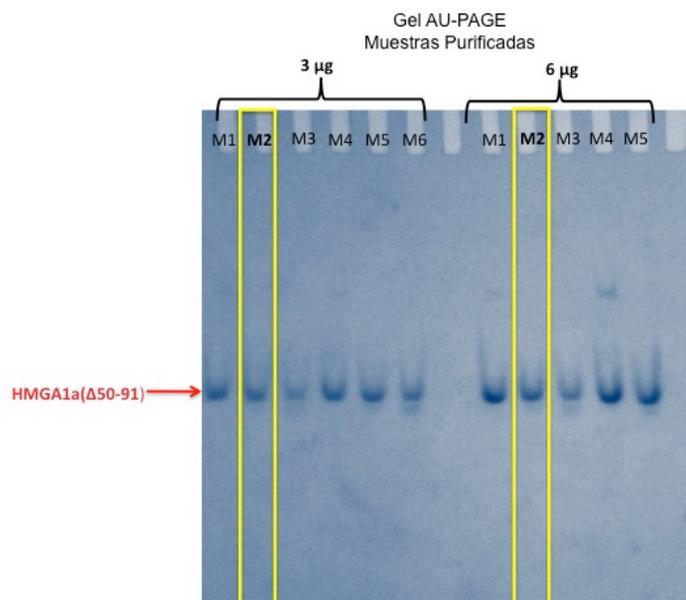


Fig. 5-14. Gel AU-PAGE de muestras reunidas al final de la cromatografía de exclusión molecular. La muestra más pura, la M2 (en el recuadro amarillo), es la que se usó para los ensayos cristalográficos.

En resumen, con los resultados obtenidos es posible considerar lo siguiente:

- **M1.** La muestra tiene una concentración suficiente para llevar a cabo los ensayos cristalográficos, sin embargo, su calidad no es la requerida para ello ya que al cargar 6 μg es posible observar trazas de una banda contaminante. Sería necesario repurificar para aumentar su pureza.
- **M2.** La muestra tiene excelente concentración para fines cristalográficos y el grado de pureza es muy bueno.
- **M3.** La concentración de esta muestra es muy baja debido a pérdidas de proteína durante el proceso de diálisis y concentración. Además, es posible apreciar la presencia de una banda por debajo de la banda de la HMGA1a(Δ50-91) que disminuye su pureza.
- **M4.** Al igual que la M1, esta muestra tiene relativamente buena concentración y su pureza puede ser mejorada con técnicas cromatográficas.
- **M5.** Esta muestra tiene buena concentración y pureza, aunque no la suficiente para fines cristalográficos.



- **M6.** No fue posible cargar 6 µg de proteína de esta muestra en el gel debido a la baja concentración que posee. Además, se puede observar una banda por debajo de la HMGA1a(Δ50-91). No es apta para cristalografía.

Por lo anterior, concluimos que la muestra **M2** es la que se utilizará para los ensayos cristalográficos que realizaremos en este proyecto.

5.3 Preparación y cuantificación de las muestras de oligonucleótido

En este proyecto se determinó la concentración del oligonucleótido CCAATTATCGCGATT-ATTGG según el procedimiento explicado en el apartado 4.4. Las disoluciones de otros dos oligonucleótidos utilizados [A(AT)₅T y C(AT)₄T] estaban previamente preparadas y su concentración ya había sido calculada.

Para el caso del oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG, utilizando los factores de la Tabla 4-11, se calculó el coeficiente de extinción a partir de la ecuación de Cantor (Eq. 4-2):

$$\begin{aligned} \epsilon_{\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}} &= 2 \cdot (2 \cdot \epsilon_{ApA} + 4 \cdot \epsilon_{ApT} + 2 \cdot \epsilon_{TpA} + 2 \cdot \epsilon_{TpT} + 1 \cdot \epsilon_{TpC} + 1 \cdot \epsilon_{TpG} + 1 \cdot \epsilon_{CpA} + 1 \cdot \epsilon_{CpC} \\ &\quad + 2 \cdot \epsilon_{CpG} + 1 \cdot \epsilon_{GpA} + 1 \cdot \epsilon_{GpC} + 1 \cdot \epsilon_{GpG}) - 6 \cdot \epsilon_A - 6 \cdot \epsilon_T - 3 \cdot \epsilon_C - 3 \cdot \epsilon_G \\ &= 2 \cdot (2 \cdot 13,7 + 4 \cdot 11,4 + 2 \cdot 11,7 + 2 \cdot 8,4 + 8,1 + 9,5 + 10,6 + 7,3 + 2 \cdot 9 + 12,6 + 8,8 + 10,8 \\ &\quad = \underline{196,5 \text{ l/mmol} \cdot \text{cm}} \end{aligned}$$

La disolución madre de este oligonucleótido se preparó disolviendo 0,55 mg de oligonucleótido en 25 µl de agua milliQ® estéril. Para la lectura de absorbancia se hace una dilución 1:1000 de esta disolución: se agregan 0,5 µl de solución madre a 500 µl de agua milliQ® estéril y se lee en el espectrofotómetro a 260 nm. El procedimiento se realizó dos veces. La absorbancia media obtenida a 260 nm fue de 0,31385.



A partir de este valor y conociendo el coeficiente de extinción molar previamente calculado, es posible calcular la concentración de la solución del oligonucleótido mediante la ley de Lambert-Beer (Eq. 4-1):

$$[\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{dilución } 1 : 1000} = \frac{A_{260}}{\epsilon_{260} \cdot l} = \frac{0,31385}{(196,5 \text{ l/mmole} \cdot \text{cm})(1 \text{ cm})}$$

$$[\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{dilución } 1 : 1000} = 1,5972 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$$

Tomando en cuenta el factor de dilución (F), la concentración real de la solución es:

$$[\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{cadena simple}} = [\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{dilución } 1 : 1000} \cdot F$$

$$[\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{cadena simple}} = 1,5972 \cdot 10^{-3} \text{ mM} \cdot \frac{500,5 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l}} = 1,59 \text{ mM}$$

Por último, la concentración del oligonucleótido de cadena doble de la muestra madre es:

$$[\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{cadena doble}} = \frac{[\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{cadena simple}}}{2}$$

$$[\text{CCAATAATCGCGATTATTGG}]_{\text{cadena doble}} = 0,8 \text{ mM}$$

En resumen, las concentraciones de los oligonucleótidos utilizados en el presente proyecto se detallan en la Tabla 5-5.

OLIGONUCLEÓTIDOS		
Secuencia	Masa Molecular M_w (g/mol)	Concentración (mM)
CCAATAATCGCGATTATTGG	12226,0	0,8
A(AT) ₅ T	7286,0	3,38
C(AT) ₄ G	6052,0	2,726

Tabla 5-5. Resumen de las concentraciones de los stocks de los oligonucleótidos utilizados.



5.4 Preparación de las muestras de fármacos

Las disoluciones de los fármacos de unión al surco estrecho del ADN que utilizaremos para los ensayos cristalográficos se prepararon diluyendo la droga en DMSO. Las concentraciones de las disoluciones madre de los fármacos se muestran en la Tabla 5-6:

<i>MGBDs</i>		
Fármaco	Masa Molecular M_w (g/mol)	Concentración (mM)
P10	392,9	10,18
R05	357,43	27,97

Tabla 5-6. Resumen de las concentraciones de los *stocks* iniciales de los fármacos de unión al surco estrecho del ADN (MGBDs) utilizados. A partir de éstas se realizan las diluciones necesarias para la realización de los ensayos cristalográficos.

5.5 Estudios cristalográficos con HMGA1a(Δ 50-91)

Una vez obtenida una muestra muy pura de proteína, es posible iniciar los ensayos cristalográficos. El objetivo buscado es conseguir cristalizar complejos de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) con el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG.

La razón por la cual se seleccionó esta secuencia específica de ADN para formar complejos con la proteína se explica a continuación.

El fragmento de la proteína HMGA1a del aminoácido 50 al 91 (HMGA1a(Δ 50-91)) contiene el segundo y el tercer *AT-hook* de la proteína, lo que significa que tiene dos sitios de unión al ADN ricos en ATs. El oligo CCAATAATCGCGATTATTGG tiene en su secuencia dos regiones ATs separadas por una región CG. Así, se pretende unir cada uno de los dos *AT-hooks* de la HMGA1a(Δ 50-91) con cada región AT del oligonucleótido (Fig. 5-15).



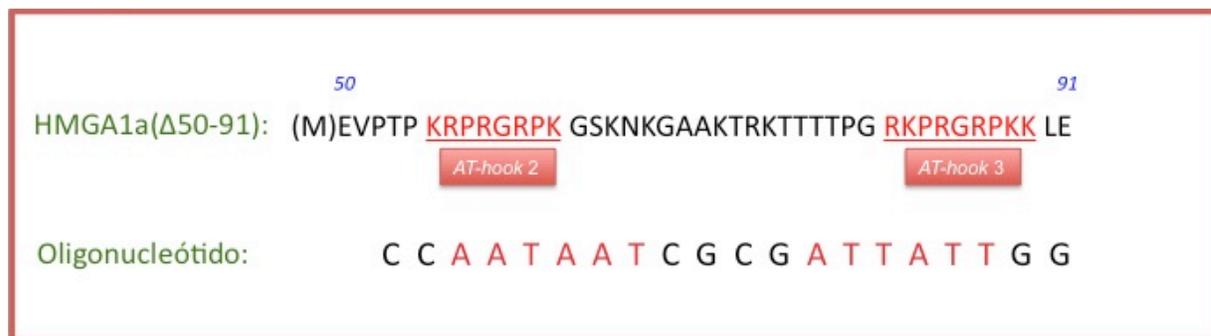


Fig. 5-15. Secuencia de aminoácidos de la HMGA1a(Δ50-91) y secuencia de nucleótidos del oligo utilizado para los ensayos cristalográficos. Se muestran las dos regiones AT (en rojo) del oligonucleótido que podrían unirse a los *AT-hooks* 2 y 3 de la proteína.

Antes de iniciar los ensayos cristalográficos, analizaremos la interacción de estas dos biomoléculas por medio de geles EMSA.

5.5.1 Análisis de la interacción HMGA1a(Δ50-91)-CCAATAATCGCGATTATTGG mediante gel EMSA

Como se mencionó en el apartado 4.3.3, este tipo de electroforesis se basa en la disminución de la movilidad electroforética de los complejos ADN-proteína en comparación con el ADN libre.

Las muestras para el gel EMSA se prepararon manteniendo una concentración constante de ADN y variando la concentración de proteína.

Una vez preparadas las muestras siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.3.3, éstas se incubaron por 1 hora a 8°C y en hielo. La electroforesis se realizó en la cámara fría a un voltaje constante de 125 V durante 45 min. El resultado se muestra en la Fig. 5-16.

Con los resultados obtenidos es posible asegurar que el oligonucleótido analizado forma un complejo al estar en contacto con la proteína HMGA1a(Δ50-91). El gel mostrado fue teñido inicialmente con *SYBR® Gold* (Fig. 5-16, izquierda). Posteriormente se realizó la tinción en plata mencionada en el apartado 4.3.3 y se confirmó que la banda de menos movilidad electroforética contenía proteína (Fig. 5-16, derecha).



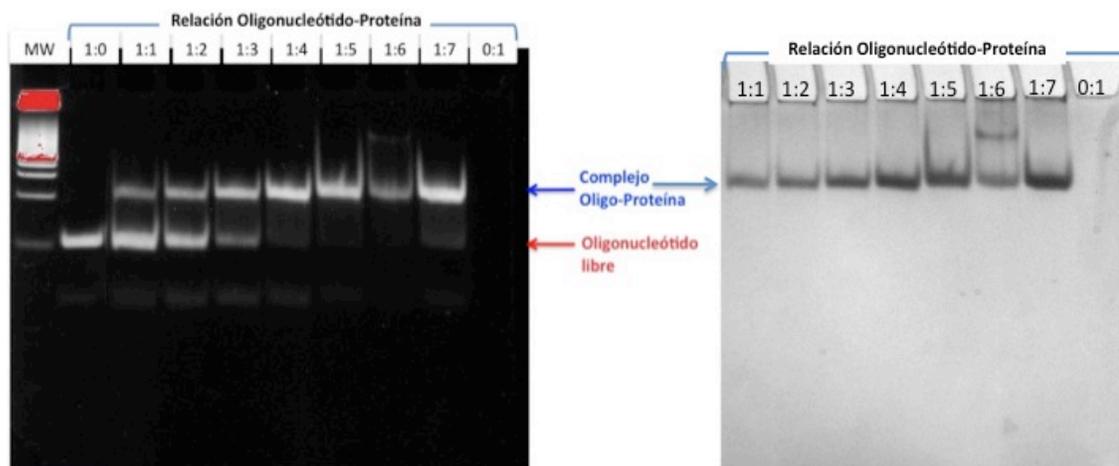


Fig. 5-16. Gel EMSA de la proteína HMGA1a(Δ 50-91) y el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG teñido con SYBR® Gold (a la izquierda) y con SilverQuest™ (a la derecha). MW: marcador de masa molecular 20 Base Pair DNA ladder Bayou Biolabs.

La formación del complejo se da desde la relación 1:1 oligonucleótido-proteína y aumenta la proporción del complejo al aumentar la concentración de proteína. La banda de relación 0:1 (sólo proteína) no aparece en el gel ya que la carga de la proteína es positiva, y no migra en la dirección del campo eléctrico de este gel. En cambio, cuando la proteína forma parte del complejo ADN-proteína sí es posible detectarla.

Una vez analizada y confirmada la unión CCAATAATCGCGATTATTGG-HMGA1a(Δ 50-91) es posible realizar los ensayos cristalográficos correspondientes.

5.5.2 Ensayos cristalográficos del oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG con la proteína HMGA1a(Δ 50-91)

Estudios anteriores realizados por el grupo MACROM han determinado algunas condiciones de partida óptimas para la cristalización del complejo HMGA1a-ADN. Así, de ensayos previos se obtuvieron cristales del complejo con el oligonucleótido CGCAT₂A₂TGCG, aunque no fue posible determinar la estructura que adoptaba la proteína a partir del diagrama de difracción obtenido. Otros estudios han encontrado las condiciones para cristalizar el tercer AT-hook de la



HMGA1a con el oligonucleótido CGAATTAATTCG, con lo que se ha conseguido obtener un cristal muy bueno y así, resolver la estructura del complejo.

Tomando en cuenta éstos y otros ensayos ya realizados, en este proyecto se intenta encontrar las condiciones de cristalización óptimas para conseguir cristalizar el complejo formado por la proteína HMGA1a(Δ 50-91) y el oligo CCAATAATCGCGATTATTGG a partir de las siguientes condiciones de cristalización:

- **Relación oligonucleótido-proteína.** Hemos probado diferentes relaciones de oligonucleótido:proteína: (1:2), (1:4), (1:6) y (1:8).
- **pH.** Trabajamos con un amplio rango de pH, desde 5,4 hasta 8,5.
- **Sales.** Utilizamos mayormente $MgCl_2$ en distintas concentraciones que van desde 2,5 mM hasta 20 mM. También se realizaron ensayos con acetato de magnesio 20 mM y $MgSO_4$ 2,5 mM.
- **Precipitante.** El precipitante utilizado fue MPD. Iniciamos los ensayos siempre con una concentración de 20% de MPD en el pozo y aumentamos gradualmente la concentración.
- **Temperatura.** Hemos trabajado a bajas temperaturas para evitar la degradación de la proteína y del oligonucleótido. Todos los ensayos se iniciaron a temperatura ambiente y se fue bajando la temperatura gradualmente hasta 4°C donde permanecen durante su desarrollo.

Se han utilizado tampones de la casa comercial *Hampton Research* (Natrix HR2-116) (ver Anexo A.1) y uno extra elaborado en el laboratorio (llamado Casero 1, de composición 25 mM ácido cítrico, 25 mM citrato sódico, pH 5,4). La selección de los tampones utilizados se hizo tomando en cuenta concentraciones bajas de sales, para evitar la competencia de estas sales con los grupos positivos de la proteína en la unión con el oligonucleótido; y además, para evitar la formación de cristales de sal.

Se hicieron tres series de gotas con el complejo HMGA1a(Δ 50-91) y el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTG variando las condiciones de cristalización antes mencionadas (Tabla 5-7). Para información sobre los tampones utilizados y mayor detalle de cada gota ver Anexo A.2.



ENSAYOS CON HMGA1a(Δ 50-91)-CCAATAATCGCGATTATTG				
Gotas	Fecha de inicio	Relación Molar Oligo-Proteína	Tampón	Precipitante
CCM1-CCM12	16-Nov-12	1:2 (0,1 mM:0,2 mM) 1:4 (0,1 mM:0,4 mM)	Natrix N°: 7, 15, 31,42 y 43 Casero 1	MPD
CCM13-CCM18	27-Feb-13	1:4 (0,2 mM:0,8 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)	Natrix N°: 15, 43 y 46	MPD
CR1-CR8	23-Abril-13	1:6 (0,2 mM:1,2 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)	Natrix N°: 7, 16, 43 y 46	MPD

Tabla 5-7. Resumen de las condiciones de cristalización de gotas con el complejo HMGA1a(Δ 50-91) y el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTG.

El protocolo de preparación de las gotas se describe en el apartado 4.6.3.

Gotas CCM1-CCM12

El volumen final de las gotas fue 4 μ l. Las concentraciones molares fueron 0,1 mM de oligo y 0,2-0,4 mM de proteína. La proteína HMGA1a(Δ 50-91) utilizada corresponde a un *stock* purificado anteriormente, el cual se encontraba a una concentración de 1,161 mM en 10 mM Tris, pH 7,5.

A la muestra de proteína, se le añadió NaCl hasta alcanzar una concentración de 80 mM. El cloruro de sodio ayuda a evitar la agregación de la proteína.

Se elevó gradualmente la concentración de MPD en el pozo hasta más de 60% en un periodo de 4 meses de monitoreo.

Todas las gotas presentaron separación de fases. No se presentó una evolución favorable ni se observó la presencia de cristales en esta serie de gotas.

Gotas CCM13-CCM18

El volumen final de las gotas fue 4 μ l. Las concentraciones molares fueron 0,2 mM de oligo y 0,8-1,6 mM de proteína.



La proteína HMGA1a(Δ 50-91) utilizada corresponde a un *stock* purificado anteriormente el cual se encontraba a una concentración de 5,805 mM en 50 mM Tris, pH 7,5. Agregamos a la solución NaCl hasta alcanzar una concentración de 80 mM.

La concentración del precipitante se elevó en algunos casos hasta el 55%.

Las gotas presentaron separación de fases.

Actualmente, esta serie de gotas se siguen vigilando. No se ha observado la formación de cristales.

Gotas CR1-CR8

El volumen final de las gotas fue 4 μ l. Las concentraciones molares fueron 0,2 mM de oligo y 1,2-1,6 mM de proteína.

La proteína HMGA1a(Δ 50-91) utilizada corresponde a la **M2**, purificada durante la realización de este proyecto (ver apartado 5.2). Se encuentra en una solución 80 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5 y tiene una concentración de 4,1765 mM (Tabla 5-4).

Actualmente, estas gotas se encuentran en desarrollo. El precipitante se ha estado aumentando gradualmente 4% por semana.

Algunas gotas presentan separación de fases. No hay cristales hasta este momento.

5.6 Estudios cristalográficos con fármacos de unión al surco estrecho del ADN

Una vez preparadas y cuantificadas las soluciones de oligonucleótidos y fármacos, es posible continuar con los ensayos cristalográficos. Para lograr cristalizar el complejo oligonucleótido-droga, se realizaron varias series de gotas variando las siguientes condiciones de cristalización:

- **Relación oligonucleótido-droga.** Hemos probado diferentes relaciones de oligo:droga: (1:0,1), (1:0,5), (1:1), (1:2), (1:4), (1:6) y (1:8).
- **pH.** En todos los ensayos trabajamos a pH 6,0.
- **Sales.** Utilizamos MgCl₂.



- **Precipitante.** Los precipitantes utilizados fueron MPD e isopropanol. Iniciamos los ensayos siempre con una concentración de 20% de MPD en el pozo y aumentamos gradualmente la concentración. La concentración de isopropanol se mantiene constante a 5%.
- **Temperatura.** Los ensayos se realizaron a distintas temperaturas, desde temperatura ambiente hasta 4°C dependiendo de la composición de la gota.

A continuación se describen los ensayos realizados para intentar cristalizar el complejo de oligonucleótidos ricos en AT con la droga P10 y la droga R05.

5.6.1 Ensayos cristalográficos de los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G con la droga P10

Realizamos ensayos cristalográficos con la droga P10 y dos secuencias de oligonucleótidos ricos en AT para intentar formar un complejo ADN-droga.

ENSAYOS CON LA DROGA P10						
Fecha de inicio	Gotas	Oligo	Relación Molar Oligo-Droga	Tampón	Temperatura	Precipitante
25-Feb-13	DCM4 DCM5 DCM6	A(AT) ₅ T	1:4 (0,2 mM:0,8 mM) 1:6 (0,2 mM:1,2 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)	Natrix N° 7 20 mM MgCl ₂ , 50 mM MES pH 6,0, 15% Isopropanol	Temp. Ambiente (TA)	MPD + 5% Isopropanol
	FCM4* FCM5 FCM6	A(AT) ₅ T	1:4 (0,2 mM:0,8 mM) 1:6 (0,2 mM:1,2 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)		TA→16°C→4°C TA TA	MPD + 5% Isopropanol
	FCM10 FCM11 FCM12*	C(AT) ₅ G	1:4 (0,2 mM:0,8 mM) 1:6 (0,2 mM:1,2 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)		TA TA TA→16°C→4°C	MPD + 5% Isopropanol
27-Feb-13	FCM13* FCM15	A(AT) ₅ T	1:1 (0,5 mM:0,5 mM) 1:2 (0,2 mM:1,0 mM)		TA→16°C→10°C TA	MPD + 5% Isopropanol
	FCM14 FCM16	C(AT) ₅ G	1:1 (0,5 mM:0,5 mM) 1:2 (0,2 mM:1,0 mM)		TA	MPD + 5% Isopropanol
8-Abr-13	FCM17 FCM19	A(AT) ₅ T	1:0,5 (0,5 mM:0,25 mM) 1:0,1 (0,5 mM:0,05 mM)		4°C	MPD + 5% Isopropanol
	FCM18 FCM20	C(AT) ₅ G	1:0,5 (0,5 mM:0,25 mM) 1:0,1 (0,5 mM:0,05 mM)	4°C	MPD + 5% Isopropanol	

Tabla 5-8. Resumen de las condiciones de cristalización de gotas con la droga P10 y los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G. (*) Gotas de las que se han pescado cristales.



Se realizaron tres series de gotas variando las condiciones de cristalización antes mencionadas. La Tabla 5-8 muestra un resumen de las gotas realizadas con la droga P10. Para conocer detalladamente las condiciones y las observaciones de estos ensayos ver Anexo A.3.

DCM4-DCM6 y FCM4-FCM6/FCM10-FCM12

El volumen final de cada gota de esta serie fue de 6 μ l. Las muestras DCMs se realizaron utilizando directamente la solución madre de la droga P10. Se aforó al volumen final de la gota con H₂O milliQ®. En cambio, las muestras FCMs se prepararon utilizando una dilución de la muestra madre de la droga P10 en DMSO y no se añadió agua a la gota.

En el momento de la preparación de las DCMs, el fármaco precipitó en la gota (por ser insoluble en agua) formando cristalitas en forma de varitas. Se mantuvieron a temperatura ambiente y se incrementó gradualmente el porcentaje de MPD en el pozo, siempre manteniendo 5% de isopropanol. Después de pocos días se añadió una pequeña cantidad de DMSO a la gota para lograr disolver la droga. Se formaron agujitas finas y pequeñas. Posteriormente, formaron precipitado cristalino muy poco prometedor.

Por otro lado, las muestras FCMs formaron pequeñas agujas de cristales en el momento de su preparación. En la gota FCM4 los cristales formados en el inicio fueron creciendo y mejoraron su aspecto al ir aumentando la concentración de MPD en el pozo. La gota fue llevada a 4°C donde se pescó un cristal en forma de aguja larga (Fig. 5-17a).

Asimismo, en la gota FCM12 aparecieron cristales en forma de agujas alargadas enganchadas unas con otras. La cápsula fue llevada a 4°C para favorecer el proceso de cristalización y posteriormente se pescó un cristal en forma de aguja larga. La Fig. 5-17b muestra imágenes de los cristales de la gota FCM12.



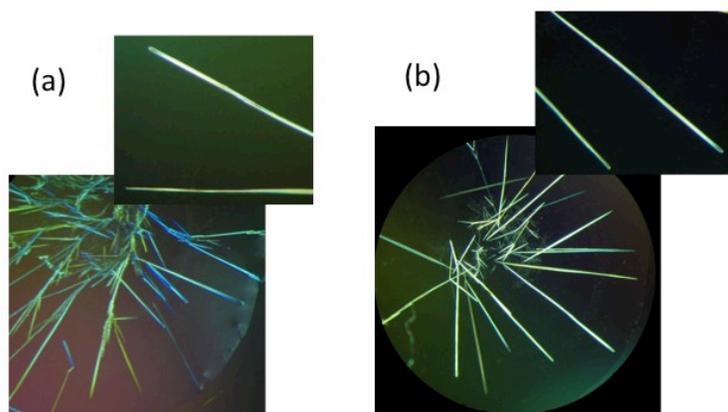


Fig. 5-17. (a) Imágenes de los cristales obtenidos del complejo A(AT)₅T-P10, relación 1:4 (cápsula FCM4). (b) Imágenes de los cristales obtenidos del complejo C(AT)₄G-P10, relación 1:8 (cápsula FCM12). Ambos ensayos muestran cristales en forma de agujas alargadas muy delgadas y brillantes.

FCM13-FCM16

Analizando los resultados obtenidos en la primera serie de gotas con la droga P10, decidimos realizar nuevos ensayos disminuyendo la concentración de fármaco en la gota. Por lo anterior se probaron las relación oligo-fármaco 1:1 y 1:2. Las gotas se mantuvieron a temperatura ambiente. El volumen final de las gotas de esta serie fue 4 μ l.

En los ensayos con relación molar 1:2 (FCM15 y FCM16) ocurrió lo mismo que en los ensayos anteriores. Adicionamos DMSO a la gota para disolver el fármaco cristalizado en forma de agujitas. Lamentablemente, estas gotas no evolucionaron de manera satisfactoria y sólo se obtuvo un precipitado cristalino amorfo.

En las gotas con relación 1:1 (FCM13 y FCM14), a diferencia de los ensayos anteriores, el fármaco no precipitó en la gota en el momento de preparación, por lo contrario, se obtuvieron gotas claras al inicio del ensayo. Sin embargo, después de un par de días, en ambas gotas empezaron a formarse agujitas. Se añadió DMSO para diluir los cristales de fármaco.

Durante la evolución de la gota FCM13 se formaron cristales con la misma morfología que los formados en las gotas FCM4 y FCM12, pero en ese caso eran un poco más anchos. Ésta se llevó gradualmente a una temperatura de 4°C donde se pescaron dos cristales.



Se difractó en la Plataforma de Cristalografía del PCB el cristal de la gota FCM12 y uno de los cristales pescados de la gota FCM13. En la difracción se observó que ambos cristales estaban formados únicamente por la droga P10 (ver apartado 5.6.3).

FCM17-FCM20

Una vez más, analizando los resultados de los ensayos anteriores, realizamos nuevas gotas con relación oligo-droga 1:0,5 y 1:0,1 y a concentraciones menores a las estudiadas en la segunda serie de gotas. A diferencia de las anteriores, esta serie de gotas fueron llevadas a 4°C el día en que se realizaron. El volumen final de las gotas de esta serie fue 4 µl.

Estos ensayos siguen en observación pero hasta ahora todas las gotas son claras. La concentración de MPD en el pozo ha sido incrementada paulatinamente y actualmente es de alrededor del 40%.

5.6.2 Ensayos cristalográficos de los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G con la droga R05

Realizamos ensayos cristalográficos con la droga R05 y dos secuencias de oligonucleótidos ricos en AT para intentar formar un complejo ADN-droga.

Se realizó una serie de gotas variando las condiciones de cristalización antes mencionadas. La Tabla 5-9 muestra un resumen de las gotas realizadas con la droga R05. Para conocer detalladamente las condiciones utilizadas en estos ensayos ver Anexo A.4.

ENSAYOS CON LA DROGA R05						
Fecha de inicio	Gotas	Oligo	Relación Molar Oligo-Droga	Tampón	Temperatura	Precipitante
25-Feb-13	DCM1 DCM2* DCM3*	A(AT) ₅ T	1:4 (0,2 mM:0,8 mM) 1:6 (0,2 mM:1,2 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)	Natrix N° 7 20 mM MgCl ₂ , 50 mM MES pH 6,0, 15% Isopropanol	4°C	MPD + 5% Isopropanol
25-Feb-13	FCM1 FCM2 FCM3	A(AT) ₅ T	1:4 (0,2 mM:0,8 mM) 1:6 (0,2 mM:1,2 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)		4°C	MPD + 5% Isopropanol
25-Feb-13	FCM7 FCM8 FCM9	C(AT) ₅ G	1:4 (0,2 mM:0,8 mM) 1:6 (0,2 mM:1,2 mM) 1:8 (0,2 mM:1,6 mM)		4°C	MPD + 5% Isopropanol

Tabla 5-9. Resumen de las condiciones de cristalización de gotas con la droga R05 y los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G. (*) Gotas de las que se han pescado cristales.



DCM1-DCM3

El volumen final de cada gota de esta serie fue 6 μ l y relaciones oligo-droga 1:4, 1:6 y 1:8.

Estas muestras se realizaron con una dilución de la muestra madre de la droga R05 en H₂O. Además, se añadió H₂O en la gota para llegar al volumen final.

La dilución del fármaco mencionada presentó aspecto turbio y después de un momento de reposo la droga precipitaba en la solución. A pesar de la insolubilidad del fármaco en esta solución, se realizaron ensayos para analizar el comportamiento del fármaco en solución acuosa.

En el momento de la preparación de las gotas se formaron puntos negros concentrados en el centro de la gota. Se mantuvieron a 10°C.

En las gotas DCM2 y DCM3 aparecieron cristales pequeños cuando en el pozo había 30% MPD y 5% isopropanol. Ambos ensayos se repitieron cinco veces. La DCM1 no evolucionó satisfactoriamente y sólo presentó precipitado cristalino amorfo.

La Fig. 5-18 muestra los cristales que se formaron en la gota DCM2. Un par de días después de la formación de estos cristales pequeños, la gota fue llevada a 4°C para tratar de mejorarlos. Sin embargo, los cristales se fundieron poco tiempo después.

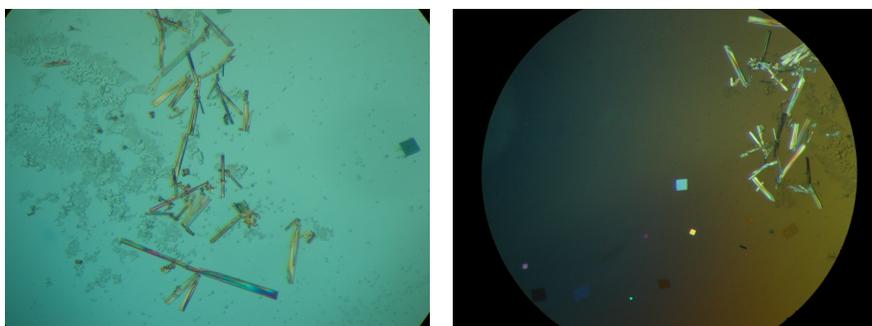


Fig. 5-18. Imágenes de los cristales obtenidos del complejo A(AT)₅T-R05, relación 1:6 (cápsula DCM2).

Siguiendo exactamente el mismo procedimiento, realizamos cinco repeticiones de esta gota. Se obtuvieron cristales en dos de ellas: DCM2-R2 y DCM2-R3 (Fig. 5-19).



En la gota DCM2-R2 se formaron unos pocos cristales grandes en forma de barras con grietas en su interior que afectan el arreglo del mismo (Fig. 5-19 a). Pasamos de 10°C a 4°C en el momento en que aparecieron los cristales. Actualmente estamos intentando mejorar los cristales formados.

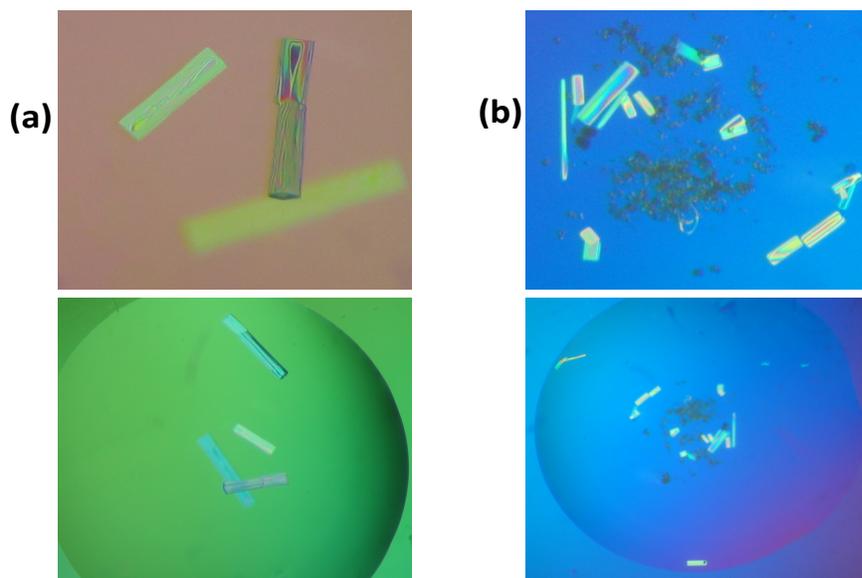


Fig. 5-19. Imágenes de los cristales obtenidos del complejo A(AT)₅T-R05, relación 1:6 (repeticiones de la cápsula DCM2). **(a)** Cristales rectangulares grandes (cápsula DCM2-R2). **(b)** Cristales pequeños muy brillantes y precipitado cristalino (cápsula DCM2-R3).

La gota DCM2-R3 se pasó a 4°C cuando la concentración de MPD en el pozo era de 30% y habían aparecido cristales de buen aspecto pero pequeños (Fig. 5-19 b). Para mejorarlos y hacerlos crecer se aumentó el precipitante poco a poco. Se pescaron cuatro cristales de esta gota. Hasta ahora, se han difractado dos de ellos. Los resultados de las difracciones muestran la presencia de ADN desordenado y no aparece el fármaco en estos cristales (apartado 5.6.3). Dos cristales más están pendientes de ser difractados.

Las repeticiones DCM2-R1, R4 y R5 presentaron precipitado amorfo.

Por otro lado, la muestra DCM3 dio lugar a cristales muy pequeños y de distintas morfologías (Fig. 5-20). La gota se llevó a 4°C y se fue aumentando la concentración del precipitante hasta llegar a 54%. Durante la evolución de la gota, se pescaron cinco cristales. Se ha difractado uno de estos cristales y se observó la presencia de ADN un poco desordenado. No se observa la



presencia de fármaco en este cristal. Los cuatro cristales restantes, están congelados en espera de ser difractados.

La gota se repitió en cinco ensayos más siguiendo exactamente el mismo procedimiento. Estas repeticiones no presentaron la misma evolución que la gota de partida. Sin embargo, tiempo después, la repetición DCM3-R2 presentó tres cristales muy distintos entre sí y de mal aspecto. Posiblemente se ha cristalizado únicamente el fármaco.

Hasta ahora no se ha observado evolución favorable en las repeticiones de la DCM3.

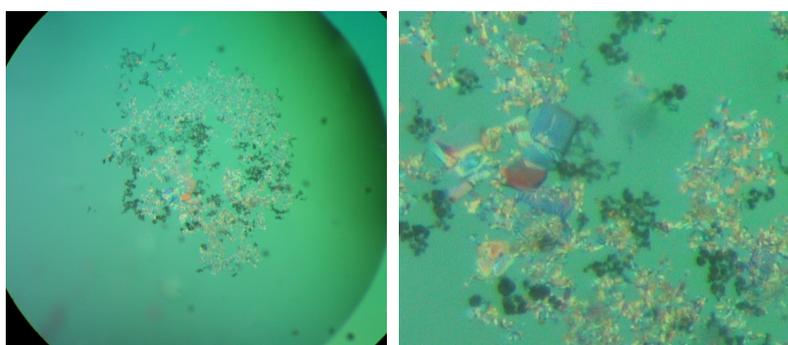


Fig. 5-20. Imágenes de los cristales obtenidos del complejo A(AT)₅T-R05, relación 1:8 (cápsula DCM3). Se observa precipitado cristalino y pequeños cristales de distintas morfologías.

FCM1-FCM3 y FCM7-FCM9

Esta serie de gotas se hicieron con un volumen de 6 μ l. Las gotas FCM1-FCM3 se realizaron con el oligonucleótido A(AT)₅T y las gotas FCM7-FCM9 con el oligo C(AT)₄G, ambas series se realizaron variando la relación oligo-droga de 1:4 a 1:8.

En todas las gotas se aumentó la concentración de precipitante hasta 40%, 50% o 64% (ver Anexo A.4). Algunas de ellas presentan la formación de pequeñas aglomeraciones en forma de erizos sin brillo.

Después de tres meses de la fecha de inicio y con concentración de precipitante en el pozo igual a 64% MPD y 5% isopropanol, en la FCM1 aparecieron cristales de distintas morfologías, muy pequeños y no muy brillantes.

El resto de los ensayos de esta serie no resultó exitoso en cuanto a la formación de cristales.



5.6.3 Análisis de los diagramas de difracción

Después de realizar los estudios de cristalización, se pudieron congelar 13 cristales de un total de 52 ensayos realizados. Los 13 cristales congelados corresponden a los ensayos con fármacos: 4 cristales con la droga P10 y 9 cristales con R05. Lamentablemente, no ha sido posible hasta el momento obtener cristales en los ensayos con la proteína HMGA1a(50-91).

La difracción de los cristales se realizó por completo en la Plataforma Cristalográfica del Parc Científic de Barcelona. Por motivos ajenos a nosotros, no fue posible realizar la difracción en las instalaciones del Sincrotrón Alba de Barcelona antes de la presentación de esta memoria. La fecha probable de visita al Sincrotrón Alba es a finales de julio. Entonces se difractarán los cristales pendientes.

Los cristales difractados en el Parc Científic de Barcelona correspondientes a los ensayos con la droga P10 fueron dos:

- FCM12 → 0,2 mM C(AT)₄G; 1,6 mM droga P10. Relación 1:8, Natrinx N° 7.
- FCM13 → 0,5 mM A(AT)₅T; 0,5 mM droga P10. Relación 1:1, Natrinx N° 7.

Los resultados obtenidos muestran que no existía orden alguno en estos cristales. En la Fig. 5-21 se muestra el diagrama de difracción de un cristal tomado de la gota FCM13. Se observa pocos puntos muy espaciados lo que indica la presencia de moléculas pequeñas. El cristal pudiera estar formado únicamente por el fármaco P10.

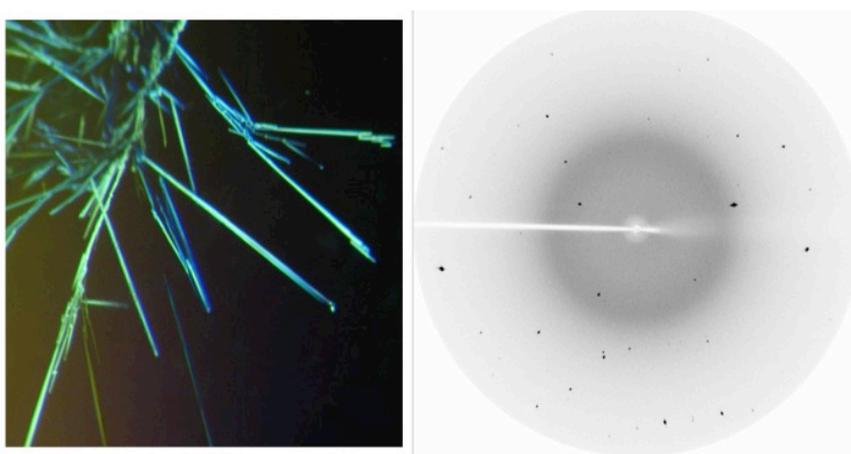


Fig. 5-21. Imagen de los cristales obtenidos en la cápsula FCM13 [A(AT)₅T - droga P10, relación 1:1] y diagrama de difracción de un cristal de este ensayo.



El resultado fue el mismo en la difracción del cristal FCM12. Ambos se descartaron.

Por otro lado, se difrataron tres cristales de los ensayos con la droga R05 que provenían de las siguientes gotas:

- 1 cristal de DCM3→0,2 mM A(AT)₅T; 1,6 mM droga R05. Relación 1:8, Natrix N° 7.
- 2 cristales de DCM2-R3→0,2 mM A(AT)₅T; 1,2 mM droga R05. Relación 1:6, Natrix N° 7.

Los diagramas de difracción se tomaron a distintos ángulos, con un ángulo de oscilación de 5° y a un tiempo de exposición de 10 min. La distancia al detector era de 250 mm. Los datos de la difracción se observan en la Fig. 5-22.

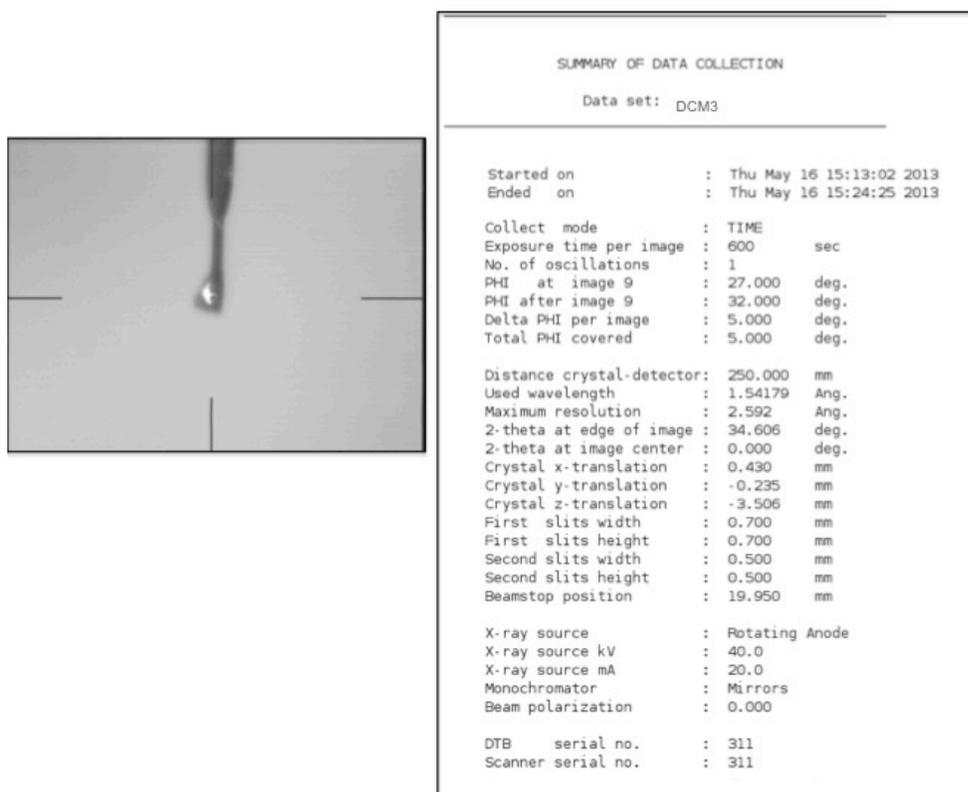


Fig. 5-22. A la izquierda se muestra el cristal de DCM3 en el *loop* en el momento de la difracción. A la derecha los datos de la difracción del cristal.



El diagrama de difracción del cristal de DCM3 se muestra en la Fig. 5-23. En él podemos ver cómo las difracciones no están bien definidas, lo que indica que el cristal no está correctamente ordenado. Es posible detectar las difracciones correspondientes a la distancia entre pares de bases y al diámetro de la molécula de ADN. No es posible observar la presencia del fármaco. Por tanto, el diagrama de difracción nos muestra la baja calidad del cristal analizado, sin las reflexiones suficientes para ser procesado.

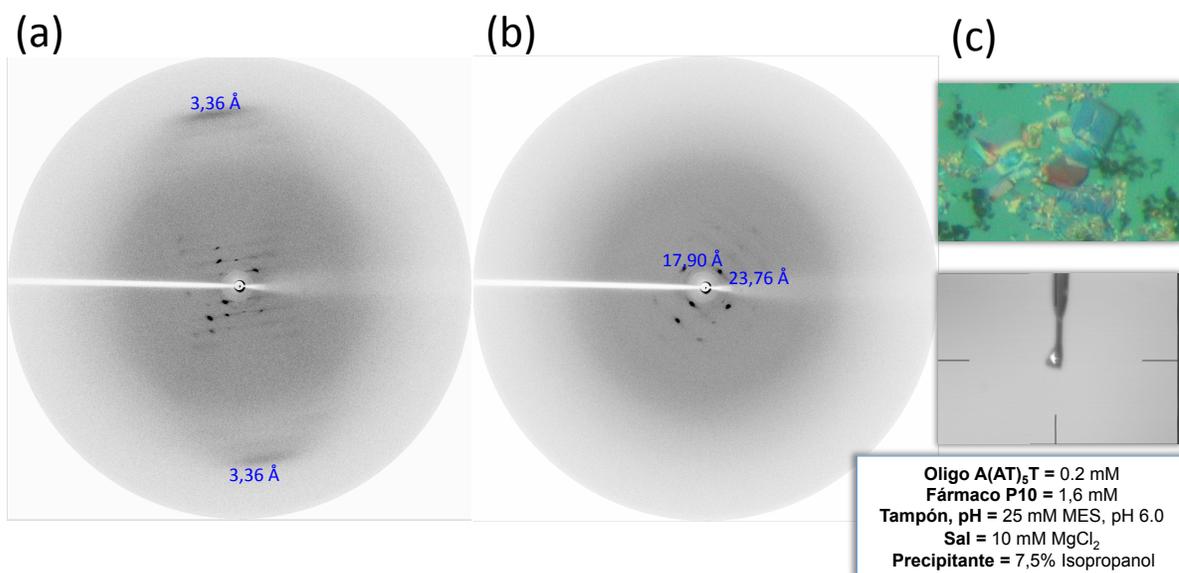


Fig. 5-23. Diagrama de difracción de un cristal del ensayo DCM3 (complejo A(AT)₅T - droga R05). **(a)** Ángulo de giro 35-40°. Se indica la distancia 3,36 Å, distancia entre pares de bases. **(b)** Ángulo de giro 30-35°. Se indican las distancias correspondientes al diámetro del ADN. No es posible detectar la presencia del fármaco. **(c)** Detalles de la gota, el cristal en el momento de ser difractado y las condiciones de cristalización del ensayo DCM3.

Asimismo, los resultados de los diagramas de difracción de los dos cristales del ensayo DCM2-R3 nos muestran la presencia de ADN con poco orden. Por consiguiente, tampoco fue posible detectar el fármaco en estos cristal.



6 CONCLUSIONES

Con la realización de este proyecto y los resultados obtenidos es posible extraer diversas conclusiones que se exponen a continuación.

Primeramente, se ha podido expresar de manera satisfactoria la proteína HMGA1a(Δ 50-91) humana con la técnica del ADN recombinante en un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* y el plásmido pET3a-HMGA1a(Δ 50-91).

Por otro lado, mediante los procesos de purificación y concentración de la HMGA1a(Δ 50-91) fue posible obtener una muestra concentrada y con alto grado de pureza de la proteína de interés, apta para ensayos cristalográficos.

En el análisis de interacción ADN-proteína mediante el gel EMSA se observó una buena unión entre la proteína HMGA1a(Δ 50-91) y el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTG. Sin embargo, después de realizar un total de veintiséis ensayos cristalográficos con este complejo no ha sido posible obtener cristales hasta ahora.

Por otro lado, se realizaron un total de treinta y seis ensayos cristalográficos con dos fármacos de unión al surco estrecho del ADN derivados de las tiazolidinedionas: P10 y R05, y dos oligonucleótidos: A(AT)₅T y C(AT)₄G. Se congelaron cuatro cristales de los ensayos con la droga P10 y nueve cristales de los ensayos con la droga R05. Algunos cristales se difractaron en el Parc Científic de Barcelona.

Los resultados de la difracción de rayos X obtenidos de los cristales con la droga P10 nos revelaron que éstos estaban constituidos únicamente de fármaco. No fue posible cristalizar el complejo ADN-droga P10, ni tampoco ADN libre en estos ensayos.

Por otro lado, se han podido difractar tres cristales de los ensayos con la droga R05. En este caso, los diagramas de difracción obtenidos nos indican la presencia de ADN en el cristal. Sin embargo, el oligonucleótido cristalizó de manera desordenada siendo imposible detectar la droga R05 en el cristal. No fue posible procesar los datos obtenidos debido a que el cristal no mostró la calidad suficiente.



Hay seis cristales congelados de los ensayos A(AT)₅T-droga R05 pendientes de ser difractados. Éstos se difractarán en el Sincrotrón Alba de Barcelona.

Los resultados obtenidos con la droga P10 nos hacen reevaluar sus características potenciales como droga de unión al ADN. Es posible que el hecho de tener un donador de puente de hidrógeno menos que la droga R05 limite la formación del complejo ADN-droga. Además, la poca solubilidad que presenta es otro factor limitante para su estudio cristalográfico.

Es necesario seguir buscando las condiciones óptimas de cristalización de la proteína HMGA1a(50-91) con el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTG y con otros oligonucleótidos con distintas características para así obtener cristales de calidad que nos permitan estudiar la estructura que adopta esta proteína al formar el complejo con el ADN.

Asimismo, es necesario optimizar las condiciones de cristalización de los complejos ADN-droga R05 para lograr obtener un cristal de alta calidad y así resolver la estructura tridimensional del complejo.



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a las personas que me han acompañado de una u otra forma durante el desarrollo de este proyecto que hoy termina.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de proyecto. A la Dra. Lourdes Campos por su entera disponibilidad, su paciencia y apoyo. Gracias por compartir conmigo una parte de sus conocimientos e introducirme en la cristalografía. A la Dra. Núria Saperas, por la dedicación en la supervisión de este trabajo, por su gran ayuda, compromiso y motivación. Muchas gracias por darme la oportunidad de entrar en el grupo MACROM. Ha sido un placer trabajar con ustedes.

A todos mis compañeros del grupo por el trato tan bueno que recibí desde el inicio, gracias por hacerme parte de un grupo tan unido y positivo. Especialmente a Raquel Sánchez por la cantidad de horas invertidas en este proyecto, su gran disponibilidad y apoyo. Muchas gracias por todo.

Quiero dedicar este trabajo a mi familia. A mis padres y hermanas por su apoyo, confianza y amor. Porque a pesar de la distancia, siempre los siento cerca de mí. Gracias por motivarme y ayudarme tanto a seguir superándome. Son lo más importante en mi vida.





7 BIBLIOGRAFÍA

7.1 Referencias bibliográficas

- Abrescia, N.G.A., González, C., Gouyette, C., Subirana, J.A., 2004. X-ray and NMR Studies of the DNA Oligomer d(ATATAT): Hoogsteen Base Pairing in Duplex DNA. *Biochemistry* 43, 4092-4100.
- Beckerbauer, L., Tepe, J.J., Cullison, J., Reeves, R., Williams, R.M., 2000. FR900482 class of anti-tumor drugs cross-links oncoprotein HMG I/Y to DNA in vivo. *Chem Biol* 7, 805-812.
- Belton, A., Gabrovsky, A., Bae, Y.K., Reeves, R., Iacobuzio-Donahue, C., Huso, D.L., Resar, L.M.S., 2012. HMGA1 Induces Intestinal Polyposis in Transgenic Mice and Drives Tumor Progression and Stem Cell Properties in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE* 7, e30034.
- Bustin, M., 1999. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Molecular and cellular biology* 19, 5237-5246.
- Campos, L., Valls, N., Urpí, L., Gouyette, C., Sanmartín, T., Richter, M., Alechaga, E., Santaolalla, A., Baldini, R., Creixell, M., Ciurans, R., Skokan, P., Pous, J., Subirana, J.A., 2006. Overview of the Structure of All-AT Oligonucleotides: Organization in Helices and Packing Interactions. *Biophysical Journal* 91, 892-903.
- Cantor, C.R., Warshaw, M.M., Shapiro, H., 1970. Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* 9, 1059-1077.
- Cleynen, I., van de Ven, W.J.M., 2008. The HMGA proteins: A myriad of functions (Review). *International Journal of Oncology* 32, 289-305.
- Degtyareva, N.N., Wallace, B.D., Bryant, A.R., Loo, K.M., Petty, J.T., 2007. Hydration Changes Accompanying the Binding of Minor Groove Ligands with DNA. *Biophysical Journal* 92, 959-965.
- Fedele, M., Fusco, A., 2010. HMGA and Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1799, 48-54.



- Fedele, M., Fusco, A., 2010. HMGA and Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1799, 48–54.
- Fonfría-Subirós, E., Acosta-Reyes, F., Saperas, N., Pous, J., Subirana, J.A., Campos, J.L., 2012. Crystal Structure of a Complex of DNA with One *AT-hook* of HMGA1. *PLoS ONE* 7, e37120.
- Fusco, A., Fedele, M., 2007. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer* 7, 899-910.
- Geierstanger, B.H., Volkman, B.F., Kremer, W., Wemmer, D.E., 1994. Short peptide fragments derived from HMG-I/Y proteins bind specifically to the minor groove of DNA. *Biochemistry* 33, 5347-5355.
- Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T., Bustin, M., 2007. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends in Cell Biology* 17, 72-79.
- Hoogsteen, K., 1959. The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Cryst.* 12, 822-823.
- Hurley, C.K., 1977. Electrophoresis of histones: A modified Panyim and Chalkley system for slab gels. *Analytical Biochemistry* 80, 624-626.
- Huth J.R., Bewley C.A., Nissen M.S., Evans J.N., Reeves R., Gronenborn A.M., Clore G.M. 1997. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nature Struct. Biol.* 4, 657-665.
- International Union of Crystallography. *International Tables for X-Ray Crystallography*, Vol. 1, 3^a Ed., Kynoch Press, Birmingham England, 1969.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-688.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409, 860-921.



- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Moreno, T., Pous, J., Subirana, J.A., Campos, J.L., 2010. Coiled-coil conformation of a pentamidine-DNA complex. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66, 251-257.
- Panyim, S., Chalkley, R., 1969. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys* 230, 337-346.
- Reeves, R., 2001. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277, 63-81.
- Reeves, R., 2003. HMGA proteins: flexibility finds a nuclear niche? *Biochemistry and Cell Biology* 81, 185–195.
- Reeves, R., Nissen, M.S., 1999. Purification and assays for high mobility group HMG-I(Y) protein function. *Methods Enzymol.* 304, 155-188.
- Shah, S.N., Resar, L.M.S., 2012. High mobility group A1 and cancer: Potential biomarker and therapeutic target (review). *Histology and Histopathology* 27, 567-579.
- Sheng, J., Gan, J., Huang, Z., 2013. Structure-Based DNA-Targeting Strategies with Small Molecule Ligands for Drug Discovery. *Med Res Rev.* doi: 10.1002/med.21278.
- Tallini, G., Dal Cin, P., 1999. HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors. *Adv Anat Pathol* 6, 237-246.
- Thomas, J.O., Kornberg, R.D., 1978. The study of histone-histone associations by chemical cross-linking. *Methods Cell Biol* 18, 429-40.
- Viswamitra, M.A., Shakked, Z., Jones, P.G., Sheldrick, G.M., Salisbury, S.A., Kennard, O., 1982. Structure of the deoxytetranucleotide d-pApTpApT and a sequence-dependent model for poly (dA-dT). *Biopolymers* 21, 513-533.
- Watson, J.D., Crick, F., 1953. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737-964.



Wemmer, D.E., Dervan, P.B., 1997. Targeting the minor groove of DNA. *Current opinion in structural biology* 7, 355-361.

Wilson, W.D., Tanious, F.A., Mathis, A., Tevis, D., Hall, J.E., Boykin, D.W., 2008. Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie* 90, 999-1014.

Yki-Järvinen, H., 2004. Thiazolidinediones. *New England Journal of Medicine* 351, 1106-1118.

7.2 Bibliografía complementaria

LIBROS

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Introducción a la Biología Celular (2ª ed.), Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2006.

Blinder, S.M., 2004. Introduction to quantum mechanics: in chemistry, materials science, and biology. Academic Press.

Chan, W.C., White, P., 2000. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford University Press on Demand.

Gómez-Moreno, C., Sancho Sanz, J. Estructura de proteínas. Ed. Ariel, Barcelona, 2003.

Pierce, B.A., 2002. Genetics: A Conceptual Approach. (3ª ed.) W. H. Freeman Publishers Chapter18: Recombinant DNA Technology.

Sinden, R. DNA Structure and Function. Academic Press, INC. Londres, 1994.

TRABAJOS DE FIN DE MÁSTER CONSULTADOS

Rodríguez, S. Pèptids i proteïna HMGA1a(Δ 50-91) humana. Expressió, purificació i cristallització amb oligonucleòtids. Barcelona, ETSEIB, 2009.

Sánchez, R. Estudis estructurals dels complexos de les proteïnes HMGA1 i pèptids sintètics amb oligonucleòtids rics en ATs. Barcelona, ETSEIB, 2007.



8 ANEXO: Ensayos cristalográficos realizados

A.1. Tampones Natrix HR2-116

A continuación se detalla la composición de los tampones Natrix HR2-116 de la marca comercial *Hampton Research* utilizada para la realización de los ensayos cristalográficos.

Tampones Natrix HR2-116	
Nº	Composicion
1	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES pH 5.6, 2.0 M Lithium Sulfate
2	0.01 M Mg Acetate, 0.05 M MES pH 5.6, 2.5 M Ammonium Sulfate
3	0.1 M Mg Acetate, 0.05 M MES pH 5.6, 20% MPD
4	0.2 M K Chloride, 0.01 M Mg Sulfate, 0.05 M MES pH 5.6, 10% PEG 400
5	0.2 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES pH 5.6, 5% PEG 8000
6	0.1 M Ammonium Sulfate, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES pH 5.6, 20% PEG 8000
7	0.02 M Mg Chloride, 0.05 M MES pH 6.0, 15% iso-Propanol
8	0.005 M Mg Sulfate, 0.1 M Ammonium Acetate, 0.05 M MES pH 6.0, 0.6 M NaCl
9	0.1 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M MES pH 6.0, 10% PEG 400
10	0.005 M Mg Sulfate, 0.05 M MES pH 6.0, 5% PEG 4000
11	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0, 1.0 M Lithium Sulfate
12	0.01 M Mg Sulfate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0, 1.8 M Lithium Sulfate
13	0.015 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0, 1.7 M Ammonium Sulfate
14	0.1 M K Chloride, 0.025 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0, 15% iso-Propanol
15	0.04 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0, 5% MPD
16	0.04 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0, 30% MPD
17	0.2 M K Chloride, 0.01 M Ca Chloride, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0, 10% PEG 4000
18	0.01 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 1.3 M Lithium Sulfate
19	0.01 M Mg Sulfate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 2.0 M Ammonium Sulfate
20	0.1 M Ammonium Acetate, 0.015 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 10% iso-Propanol
21	0.2 M K Chloride, 0.005 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 10% 1,6 Hexanediol
22	0.08 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 15% PEG 400
23	0.2 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 10% PEG 4000
24	0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Ca Chloride, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 10% PEG 4000
25	0.08 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 30% PEG 4000
26	0.2 M K Chloride, 0.1 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 10% PEG 8000
27	0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Mg Acetate, 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5, 30% PEG 8000
28	0.05 M Mg Sulfate, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 1.6 M Lithium Sulfate
29	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 4.0 M Lithium Chloride
30	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 1.6 M Ammonium Sulfate
31	0.005 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 25% PEG Monomethyl Ether 550
32	0.2 M KCl, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 20% 1,6 Hexanediol
33	0.2 M Ammonium Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 30% 1,6 Hexanediol
34	0.1 M K Chloride, 0.005 M Mg Sulfate, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 15% MPD
35	0.1 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 5% PEG 400
36	0.1 M K Chloride, 0.01 M Ca Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 10% PEG 400
37	0.2 M K Chloride, 0.025 M Mg Sulfate, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 20% PEG 200
38	0.2 M Ammonium Acetate, 0.15 M Mg Acetate, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 5% PEG 4000
39	0.1 M Ammonium Acetate, 0.02 M Mg Chloride, 0.05 M HEPES - Na pH 7.0, 5% PEG 8000
40	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Tris HCl pH 7.5, 1.6 M Ammonium Sulfate
41	0.1 M KCl, 0.015 M Mg Chloride, 0.05 M Tris HCl pH 7.5, 10% PEG Monomethyl Ether 550
42	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Tris HCl pH 7.5, 5% iso-Propanol
43	0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Ammonium Acetate, 0.05 M Tris HCl pH 7.5, 10% MPD
44	0.2 M K Chloride, 0.05 M Mg Chloride, 0.05 M Tris HCl pH 7.5, 10% PEG 4000
45	0.025 M Mg Sulfate, 0.05 M Tris HCl pH 8.5, 1.8 M Ammonium Sulfate
46	0.005 M Mg Sulfate, 0.05 M Tris HCl pH 8.5, 35% 1,6 Hexanediol
47	0.1 M K Chloride, 0.01 M Mg Chloride, 0.05 M Tris HCl pH 8.5, 30% PEG 400
48	0.01 M Ca Chloride, 0.2 M Ammonium Chloride, 0.05 M Tris HCl pH 8.5, 30% PEG 4000

Tabla A. 1. Composición de los tampones Natrix HR2-116.



A.2. Ensayos cristalográficos realizados con la proteína HMGA1a(Δ 50-91) y el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG.

Serie	Cápsula	Condiciones de la proteína	Condiciones de la gota										Pozo (% MPD)		Observaciones
			Proporción (Oligo-Proteína)	[Proteína] mM	[Oligo] mM	Tampón de cristalización							Inicial	Final	
						Nombre	pH	Sal	Tampón	Precipitante					
1	CCM1	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:2	0,2	0,1	Natrix 7	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	64	Separación de fases		
	CCM2	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:2	0,2	0,1	Natrix 15	6,0	20 mM MgCl ₂	25 mM Na Cacodilato	2,5% MPD	20	64	Separación de fases		
	CCM3	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:2	0,2	0,1	Natrix 31	7,0	2,5 mM MgCl ₂	25 mM HEPES	17,5% PEG	20	64	Separación de fases		
	CCM4	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:2	0,2	0,1	Natrix 42	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Tris-HCl	2,5% Isopropanol	20	64	Separación de fases		
	CCM5	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:2	0,2	0,1	Natrix 43	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Acetato Amonio 25 mM Tris-HCl	5% MPD	20	64	Separación de fases		
	CCM6	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:2	0,2	0,1	Casero 1	5,4	-	25 mM Ácido Citrico, 25 mM Na Citrato	-	20	64	Separación de fases		
	CCM7	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:4	0,4	0,1	Natrix 7	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	64	Separación de fases		
	CCM8	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:4	0,4	0,1	Natrix 15	6,0	20 mM MgCl ₂	25 mM Na Cacodilato	2,5% MPD	20	64	Separación de fases		
	CCM9	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:4	0,4	0,1	Natrix 31	7,0	2,5 mM MgCl ₂	25 mM HEPES	17,5% PEG	20	64	Separación de fases		
	CCM10	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:4	0,4	0,1	Natrix 42	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Tris-HCl	2,5% Isopropanol	20	64	Separación de fases		
	CCM11	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:4	0,4	0,1	Natrix 43	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Acetato Amonio 25 mM Tris-HCl	5% MPD	20	64	Separación de fases		
	CCM12	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:4	0,4	0,1	Casero 1	5,4	-	25 mM Ácido Citrico, 25 mM Na Citrato	-	20	69	Separación de fases (atrasado)		
2	CCM13	80 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5	1:4	0,8	0,2	Natrix 15	6,0	20 mM MgCl ₂	25 mM Na Cacodilato	2,5% MPD	20	43	Separación de fases		
	CCM14	80 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5	1:4	0,8	0,2	Natrix 43	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Acetato Amonio 25 mM Tris-HCl	5% MPD	20	43	Separación de fases		
	CCM15	80 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5	1:4	0,8	0,2	Natrix 46	8,5	2,5 mM MgSO ₄	25 mM Tris-HCl	17,5% 1,6-Hexanodiol	20	55	Separación de fases		
	CCM16	80 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5	1:8	1,6	0,2	Natrix 15	6,0	20 mM MgCl ₂	25 mM Na Cacodilato	2,5% MPD	20	55	Separación de fases		
	CCM17	80 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5	1:8	1,6	0,2	Natrix 43	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Acetato Amonio 25 mM Tris-HCl	5% MPD	20	55	Separación de fases. Inicio de cristal líquido		
	CCM18	80 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5	1:8	1,6	0,2	Natrix 46	8,5	2,5 mM MgSO ₄	25 mM Tris-HCl	17,5% 1,6-Hexanodiol	20	55	Separación de fases *Prometedora		
3	CR1	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:6	1,2	0,2	Natrix 7	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	43	Gota clara		
	CR2	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:6	1,2	0,2	Natrix 16	6,0	20 mM Mg Acetato	25 mM Na Cacodilato	15% MPD	20	43	Separación de fases		
	CR3	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:6	1,2	0,2	Natrix 43	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Acetato Amonio 25 mM Tris-HCl	5% MPD	20	43	Separación de fases		
	CR4	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:6	1,2	0,2	Natrix 46	8,5	2,5 mM MgSO ₄	25 mM Tris-HCl	17,5% 1,6-Hexanodiol	20	43	Separación de fases		
	CR5	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:8	1,6	0,2	Natrix 7	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	43	Gota clara		
	CR6	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:8	1,6	0,2	Natrix 16	6,0	20 mM Mg Acetato	25 mM Na Cacodilato	15% MPD	20	43	Separación de fases *Formación 1 cristal		
	CR7	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:8	1,6	0,2	Natrix 43	7,5	5 mM MgCl ₂	25 mM Acetato Amonio 25 mM Tris-HCl	5% MPD	20	43	Gota clara		
	CR8	80 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5	1:8	1,6	0,2	Natrix 46	8,5	2,5 mM MgSO ₄	25 mM Tris-HCl	17,5% 1,6-Hexanodiol	20	43	Separación de fases		

Tabla A. 2. Detalles de las gotas realizadas con la proteína HMGA1a(Δ 50-91) y el oligonucleótido CCAATAATCGCGATTATTGG.



A.3. Ensayos cristalográficos realizados con la droga P10 y los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G.

ENSAYOS CON LA DROGA P10													
Serie	Cápsula	Oligonucleótido	Condiciones de la gota							Pozo (% MPD + 5% Isopropanol)		Observaciones	
			Relación (Oligo-Fármaco)	[Oligo] mM	[Fármaco] mM	Temp.	Tampón de cristalización Matrix N° 7				Inicial		Final
							pH	Sal	Tampón	Precipitante			
1	DCM4	A(AT) ₅ T	1:4	0,2	0,8	TA	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	30	Agujas muy pequeñas
	DCM5	A(AT) ₅ T	1:6	0,2	1,2	TA					20	50	Agujas largas
	DCM6	A(AT) ₅ T	1:8	0,2	1,6	TA					20	30	Agujas largas
	FCM4	A(AT) ₅ T	1:4	0,2	0,8	4°C					20	50	Agujas largas muy brillantes. Se congeló un cristal
	FCM5	A(AT) ₅ T	1:6	0,2	1,2	TA					20	25	Precipitado cristalino
	FCM6	A(AT) ₅ T	1:8	0,2	1,6	TA					20	25	Precipitado cristalino
	FCM10	C(AT) ₅ G	1:4	0,2	0,8	TA					20	50	Precipitado cristalino
	FCM11	C(AT) ₅ G	1:6	0,2	1,2	TA					20	30	Precipitado cristalino
	FCM12	C(AT) ₅ G	1:8	0,2	1,6	4°C					20	50	Agujas largas muy delgadas. Se congeló un cristal
2	FCM13	A(AT) ₅ T	1:1	0,5	0,5	10°C	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	54	Pocas agujas cortas. Se congelaron 2 cristales
	FCM14	C(AT) ₅ G	1:1	0,5	0,5	TA					20	30	Gota clara y algunas varitas muy pequeñas
	FCM15	A(AT) ₅ T	1:2	0,5	1,0	TA					20	30	Precipitado cristalino
	FCM16	C(AT) ₅ G	1:2	0,5	1,0	TA					20	30	Precipitado cristalino
3	FCM17	A(AT) ₅ T	1:0,5	0,5	0,25	4°C	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	45	Gota clara
	FCM18	C(AT) ₅ G	1:0,5	0,5	0,25	4°C					20	40	Separación de fases
	FCM19	A(AT) ₅ T	1:0,1	0,5	0,05	4°C					20	35	Gota clara
	FCM20	C(AT) ₄ G	1:0,1	0,5	0,05	4°C					20	40	Gota clara

Tabla A. 3. Detalles de las gotas realizadas con la droga P10 y los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G.



A.4. Ensayos cristalográficos realizados con la droga R05 y los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G.

ENSAYOS CON LA DROGA R05												
Cápsula	Oligonucleótido	Condiciones de la gota				Tampón de cristalización = Matrix N° 7				Pozo (% MPD + 5% Isopropanol)		Observaciones
		Relación (Oligo-Fármaco)	[Oligo] mM	[Fármaco] mM	Temp.	pH	Sal	Tampón	Precipitante	Inicial	Final	
DCM1	A(AT) ₅ T	1:4	0,2	0,8	4°C	6,0	10 mM MgCl ₂	25 mM MES	7,5% Isopropanol	20	64	Precipitado cristalino
DCM2	A(AT) ₅ T	1:6	0,2	1,2	4°C					20	64	Se formaron cristales pequeños, se fundieron. Se repitió el ensayo 5 veces. R2: cristales de forma rectangular con grietas. R3 cristales pequeños muy brillantes, de distintas morfologías. Se congelaron 4 cristales de la rep. DCM2-R3.
DCM3	A(AT) ₅ T	1:8	0,2	1,6	4°C					20	54	Cristales pequeños de distintos tamaños. Mucho precipitado cristalino. Se congelaron 5 cristales. Se repitió el ensayo 5 veces R2: se formaron 3 cristales grandes y con defectos.
FCM1	A(AT) ₅ T	1:4	0,2	0,8	4°C					20	50	Cristales muy pequeños de distintas morfologías.
FCM2	A(AT) ₅ T	1:6	0,2	1,2	4°C					20	64	Separación de fases + 1 erizo
FCM3	A(AT) ₅ T	1:8	0,2	1,6	4°C					20	40	Gota clara
FCM7	C(AT) ₅ G	1:4	0,2	0,8	4°C					20	64	Gota clara + 1 erizo
FCM8	C(AT) ₅ G	1:6	0,2	1,2	4°C					20	64	Precipitado amorfo
FCM9	C(AT) ₅ G	1:8	0,2	1,6	4°C					20	64	Gota clara + 3 erizos

Tabla A. 4. Detalles de las gotas realizadas con la droga R05 y los oligonucleótidos A(AT)₅T y C(AT)₄G.

