UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS fundada en 1551
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estructura y estabilidad de un dominio proteico BRCT

TESIS Para optar el Título Profesional de BIÓLOGO CON MENCIÓN EN GENÉTICA

ALEXANDRA J. I. OBREGÓN MANSILLA

LIMA- PERÚ 2004

. . 1

AGRADECIMIENTOS: . . 3

RESUMEN . 5

SUMMARY . . 7

INTRODUCCIÓN . 9

OBJETIVOS . . 17

ANTECEDENTES . 19

MÉTODOS . 25

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: . . 31

CONCLUSIONES . . 41

BIBLIOGRAFÍA . 43

APÉNDICES . . 47

Apéndice 1. Medios de cultivo . . 47

Apéndice 2. SDS PAGE (33) . . 48

Al Todopoderoso, la luz de mi vida. A Juana Al binagorta, mi mentora de toda la vida, que siempre creyó en mí. A Teodoro Mansilla, por darme la fuerza necesaria para seguir sonriendo. A mis abuelos Fernando y Margarita, por su cariño. A mis padres Fernando y Dolores, A mis hermanos Fernando, Antonio y Luis, a quienes debo todo lo que soy. A Fredy, quien me enseñó a ver la vida de otra manera.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

AGRADECIMIENTOS:

- A la Dra. María Luisa Tasayco, por la acogida en su laboratorio y la oportunidad de desarrollar el presente estudio.
- A la Dra. Beatriz Lizárraga, por todas sus enseñanzas y el apoyo brindado que no se limitan a este trabajo.
- A Raul Tito Tadeo, mi hermano, quien me motiva a no temer a los retos.
- A Martha, Pablo y Aaron, quienes nunca permitieron que me sienta sola.
- Al Dr. Igor Karpichev y a la Dra. Gillian Small, por todo el respaldo que me brindan y por la oportunidad de seguir creciendo profesional y personalmente.
- A mis amigos, por saber que siempre puedo contar con ellos.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

RESUMEN

El conocimiento de la estructura de las proteínas constituye una de las principales aproximaciones hacia el entendimiento de las bases moleculares de las enfermedades humanas; en particular, puede ser usada para racionalizar los efectos de muchas mutaciones causantes de enfermedades, que a menudo son asociadas con cambios en la estabilidad de las proteínas. En este trabajo, se estudia el Dominio BRCT, módulo evolutivo de aproximadamente 95 aminoácidos, con plegamiento autónomo, conservado a través de la mayoría de taxas y encontrado en muchas proteínas relacionadas a la reparación del DNA, recombinación y control del ciclo celular. Una de las características conservadas del plegamiento del dominio BRCT es la estructura formada por dos alfa hélices en una región de la molécula, haciendo frente a la hoja plegada ß central, que contiene dos de las mas conocidas mutaciones relacionadas a cáncer de mama, y que resultan en la introducción de un residuo cargado que desestabiliza la interfase del complejo BRCT-BRCT en la proteína BRCA1. Para este trabajo, elegimos probar la estabilidad del BRCT presente en la enzima DNLJ ligasade una bacteria termófila mediante la remoción de la carga de superficie, “R21”, de esta estructura.

Este es un primer paso para evaluar si la carga de superficie contribuye significativamente a la estabilidad de este dominio termofílico, para profundizar en el posible rol de la estabilidad del BRCT en el desarrollo del cáncer de mama, y por encima de todo, para determinar las bases de la estabilidad de este dominio que dada su frecuencia, se constituye en un hechobiológicamente relevante.

Los resultados preliminares sugieren que la estabilidad del dominio BRCT de la DNLJ ligasa de *Thermus thermophilus*, es tolerante a la remoción de cargas en su superficie, pero es afectado por las variaciones en la hidrofobicidad. Aunque estas mutaciones no muestran variaciones significativas en la estructura y la estabilidad del dominio, si podrían estar afectando la habilidad de interactuar con otras proteínas.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

SUMMARY

The knowledge of protein structure constitutes one of the main approaches towards understanding the molecular basis of human disease, in particular, protein structure can be used to rationalize the effects of many disease-causing mutations, which often are associated with changes of protein stability. In this work, the BRCT domain is studied, an evolutionary protein module with autonomous folding, of approximately 95 aminoacids, found in numerous proteins involved in DNA repair, recombination and cell cycle control. One of the conserved features of the BRCT fold is a two helical bundle located against one side of the central four-stranded ß sheet, which features two of the best known mutations in breast cancer resulting from introducing a distabilizing charge within the interface of the BRCT-BRCT complex in BRCA1. We have chosen to probe the stability of the BRCT of DNLJ ligase in a thermophilic bacteria by removing the surface charge "R21" from this bundle.

This is a first step to test whether this surface charge contributes significantly to the stability of this thermophilic domain, to gain insight about the possible role of BRCT stability on the breast cancer disease, and most of all, to determine the basis for the stability of this frequently found and biologically relevant structural domain.

Our preliminar results suggest that the stability of the BRCT of the DNLJ ligasa of *Thermus thermophilus* BRCT domain is tolerant to the surface charge removal, but is affected by hydrophobicity.

Although these mutations do not show significant variations in the structure and stability of the domain itself, they may affect their ability to interact with other protein modules.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

INTRODUCCIÓN

En la estructura terciaria de las proteínas se pueden distinguir elementos definidos que aparecen como unidades de plegamiento independiente, que son mejor conocidos como dominios. Muchos de estos dominios proteicos son objeto de estudio debido a que presentan funciones específicas de relevancia biológica.

El dominio BRCT, descrito por primera vez como el dominio Carboxi-terminal de la proteína codificada por el gen BRCA1 (**BR** AC1 **C T** erminal), es un módulo conservado de aproximadamente 95 aminoácidos, común a numerosas proteínas involucradas en reparación del DNA, recombinación y control del ciclo celular (1-4) (Figura 1). En este dominio, que es considerado como una unidad de plegamiento autónoma (1-6), aunque la conservación en su estructura primaria es muy baja, las características estructurales se conservan (4, 6-8) (Figura 2).

Las características básicas del plegamiento del BRCT están dadas por unahoja central plegadarodeada por tres alfa hélices: alfa 1 y alfa 3 en un lado de la molécula y alfa 2 en la otra cara (4,6-8). Esta estructura formada por las dos alfa hélices a un lado de la molécula contiene las zonas donde se observa la mayor identidad (2-4), lo cual estaría sugiriendo que se trata de un elemento esencial del dominio (3-7) (Figura3).

Muchos dominios BRCT han sido caracterizados funcionalmente, y median las interacciones BRCT-BRCT o BRCT-no BRCT, en consecuencia, se considera que uno de los roles del dominio BRCT seria el mediar interacciones proteína-proteína (4,6,7,9,10). Inclusive se sugiere una posible función para el dominio BRCT como sensor de quiebres en el DNA (11).

Entre aquellas proteínas que contienen en su estructura dominios BRCT a la que mayor importancia se le da es a BRCA1 (1-4,6-7,11-12). Esta es una fosfoproteína de 220 kDa que actúa en la supresión de tumores, inhibiendo el crecimiento *in vitro* de células cancerosas del ovario y de la mama (13). Aproximadamente el 5% de cáncer de mama es atribuido a mutaciones heredadas en el gen BRCA1, y aproximadamente el 50% de familias con una incidencia anormalmente alta de cáncer de mama, la mutación que causa la enfermedad se encuentra en este gen (11,14,15).

A diferencia de la mayoría de supresores de tumores, este gen presenta una muy baja conservación (4), y esta se presenta justamente en las regiones amino y carboxilo terminal, que coinciden con los dominios de anillo ("Ring Domain" en la zona aminoterminal) y BRCT (en la carboxilo), (Figura 4). Es precisamente en estas regiones donde se localizan la mayoría de las mutaciones sin sentido que se relacionan al cáncer de mama, implicando que estas regiones se encuentran especialmente involucradas en la supresión de tumores mediada por BRCA1 (7,12).

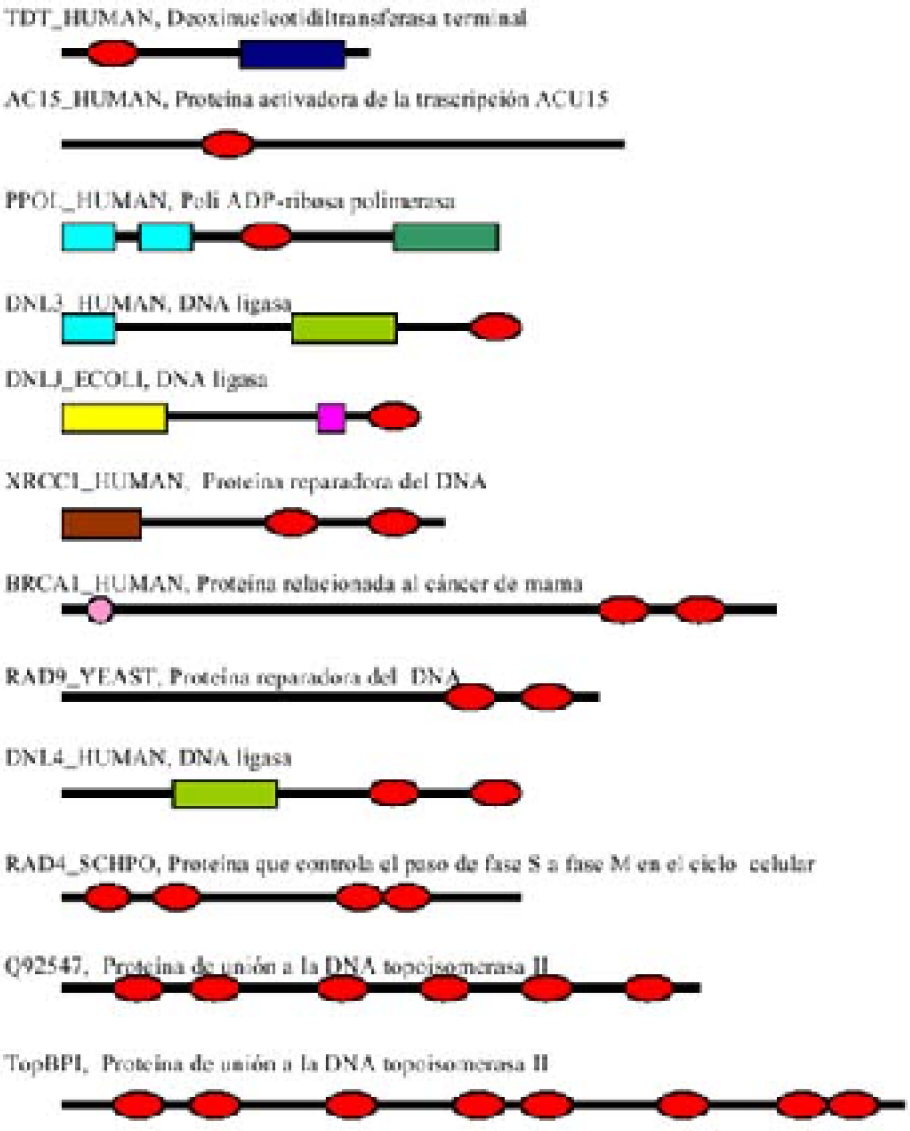


Figura 1.Algunas proteínas con dominios BRCT y que constituyen la superfamilia de

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

proteínas BRCT (4).

El módulo BRCT está representado con elipses rojas, como se observa, se puede presentar en una o más copias, y aunque existe una preferencia por la región carboxiterminal, es posible localizarlas en cualquier otra posición. La DNLJ Ligasa de *T. thermophilus* no se muestra en esta gráfica, pero tiene la misma organización que la DNLJ ligasa de *E. coli*. (5)

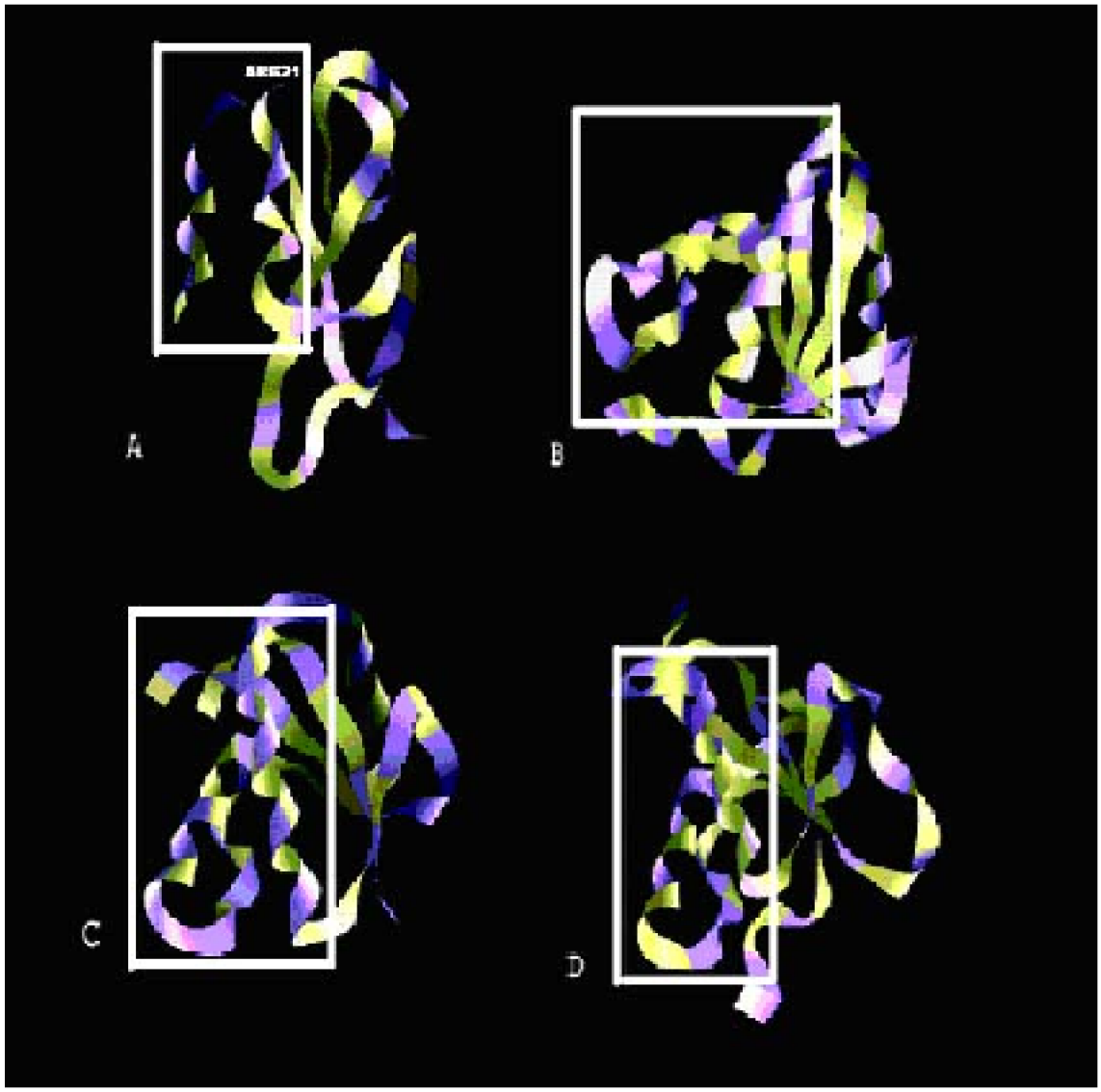


Figura 2. Algunos Dominios BRCT construidos en este trabajo utilizando el programa GRASP(30) en base a las coordenadas publicadas en el PDB.

A. 1L7B (objeto de este estudio) B. 1CDZ (XRCC1 humana) C. y D. BRCA1 BRCT I y II (1JNX). Enmarcada por el rectángulo blanco se encuentra la región mejor conservada de la estructura BRCT, conformada por dos alfa hélices (□ıy□□ a un lado de la molécula.

En base a la estructura secundaria determinada para el dominio BRCT de la proteína humana XRCC1 (primer dominio BRCT estructuralmente descrito, depositado como

XRCC1.pdb en el Protein Data Base, www.pdb.org), se predijo la estructura secundaria de los otros dominios BRCT y en base a las agrupaciones de residuos hidrofóbicos que determinarían el centro hidrofóbico del dominio. Este alineamiento se realizo según los criterios del Pfam (www.sanger.ac.uk/software/Pfam).

Los rectángulos verdes delimitan las alfa hélices y los rectángulos negros las estructuras beta. Si bien se puede observar que la identidad es muy baja, se pueden distinguir algunos grupos de aminoácidos hidrofóbicos dentro de las estructuras beta (coloreados en amarillo), que presentan cierto grado de conservación.

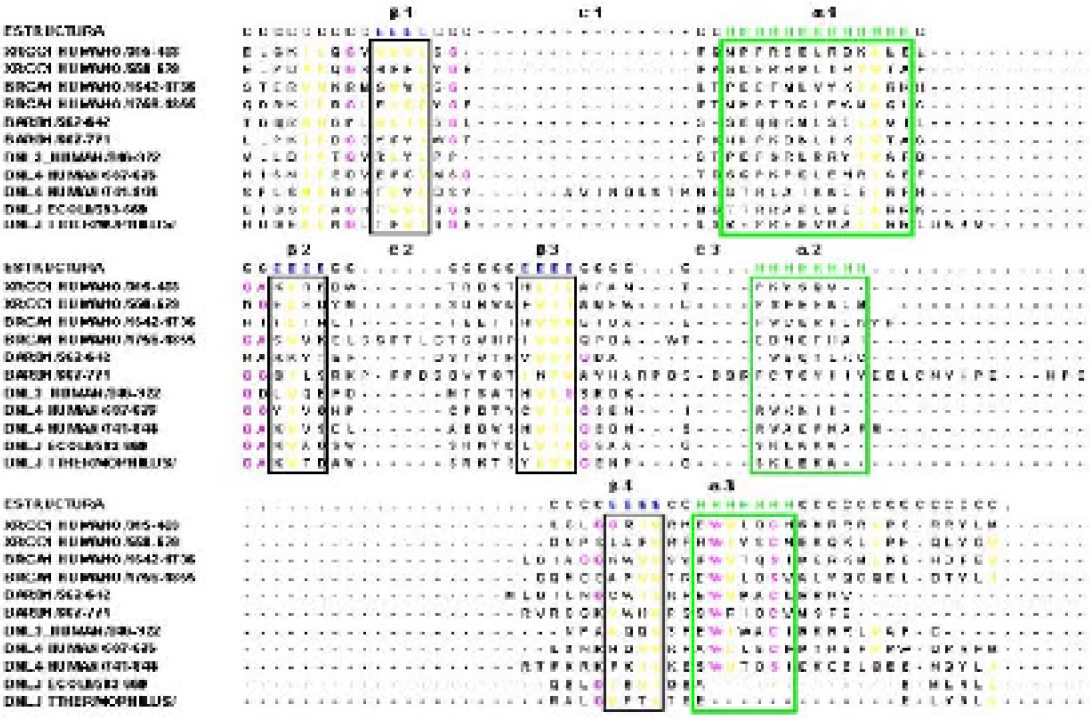


Figura 3. Alineamiento de la estructura primaria de algunas proteínas de la superfamilia BRCT

Existen evidencias que vinculan al BRCA1 con la reparación del ADN, observándose que en células madre de embriones de ratón nulicigotas para BRCA1, la disminución de la reparación al daño oxidativo del ADN (14).

De los 24 exones que codifican para la proteína BRCA1, los 4 últimos corresponden

a los 2 dominios BRCT que ésta presenta (1-5, 7, 12, 16). En la estructura tridimensional de la proteína estos interactúan entre si vía interacciones hidrofóbicas entre alfa-2 del primer dominio con la estructura formada por alfa-1 y alfa-3 del segundo dominio (7,10) (Figura 4B). Es en esta interfase hidrofóbica que se presentan las dos mutaciones mejor caracterizadas en el BRCA1 que se han reportado estar relacionadas al desarrollo del cáncer: A1708E (en la cual la alanina en posición 1708 es cambiada por ácido glutámico y M1775R (en la cual la metionina en posición 1775 es cambiada por una arginina) (6,7-10, 16) (Figura 5, 6).

Es sabido que la substitución de un residuo en una proteína puede resultar en un efecto benigno (polimorfismo) o en enfermedad (17). No cabe duda que las consecuencias que una mutación genere se van a deber a la naturaleza del cambio (el tipo de residuo que se ve afectado) como a la posición que involucra (18, 19). Existen evidencias que sugieren que los residuos polares podrían comprometer la estructura o función de la proteína. Mutaciones que involucran residuos no polares entre ellos tiene efecto mínimo comparado a mutaciones que involucran el cambio de un residuo no polar por uno polar, que presentan fenotipo. Es interesante que el 36% de las mutaciones reportadas que presentan un fenotipo, involucran argininas. (17). Así mismo, muchas veces las enfermedades podrían generarse no solo por la pérdida de interacciones electrostáticas, pueden también deberse a la incorporación de nuevas interacciones no nativas (17). Dado que las dos mutaciones relacionadas al cáncer mencionadas previamente involucran residuos cargados, nos lleva a cuestionarnos acerca de la relevancia de los residuos cargados en este dominio.

Los dominios BRCT del BRCA1 se expresan como una proteína insoluble en *E. coli*,(7) por lo cual se hace necesario trabajar con un dominio homólogo que permita el trabajo experimental. El dominio BRCT de la DNLJ ligasa de *Thermus thermophilus* (1L7B.pdb en www.pdb.org), presenta las mismas características estructurales de los otros dominios BRCT conocidos (4-8) (Figura 6). Esta similitud nos permite emplear este dominio como modelo experimental para este estudio, ya que además se expresa como una proteína soluble en *E. coli*, lo cual permitió el trabajo experimental. Además, este dominio presenta un residuo cargado (arginina 21) al inicio de la primera alfa hélice, posición que es estructuralmente equivalente a la metionina 1775 en el BRCA1, cuya mutación por un residuo cargado (arginina) se ve asociada a malignidad (6,7-10). Dado que esta posición se encuentra en la superficie de la estructura tridimensional, orientando la cadena radical hacia el exterior de la molécula (Figura 5 y 6), era predecible que afectaría la capacidad de interacción del dominio (4-6); sin embargo, se reporto que esta mutación estaría generando moderados defectos estructurales, que conferirían generando moderados defectos estructurales, que conferirían sensibilidad a la actividad de proteasas a un dominio que sin la mutación se muestra estable (7). Si la introducción de un residuo cargado en esta posición genera cambios estructurales, que podrían estar condicionando el desarrollo del cáncer, se hace importante estudiar la estructura y estabilidad del dominio, mas concretamente, evaluar la relevancia del aporte de un residuo cargado en esta posición.

Experimentos preliminares con el dominio BRCT de la DNLJ ligasa de *Thermus thermophilus* mostraron que cuando el dominio soluble es sometido a desnaturación

térmica en una solución acuosa de cloruro de sodio, presenta mayor termoestabilidad (experimentos pilotos desarrollados en el mismo laboratorio) , indicando que la fuerza iónica en el medio estaría anulando las cargas en la superficie de la molécula volviendo más estable el dominio, sugiriendo que las cargas en la superficie del dominio tienen un efecto global desfavorable para la estabilidad del mismo; siendo la arginina 21 homóloga a la posición 1775 del BRCT del BRCA1, que muta a arginina en casos de cáncer, este residuo cargado cobra mayor interés.

Por todo lo antes expuesto, se plantea la pregunta ¿ Cuán significativa es para la estructura y estabilidad del dominio la contribución de un residuo cargado (arginina 21) en la superficie del dominio BRCT de *Thermus thermophilus*?

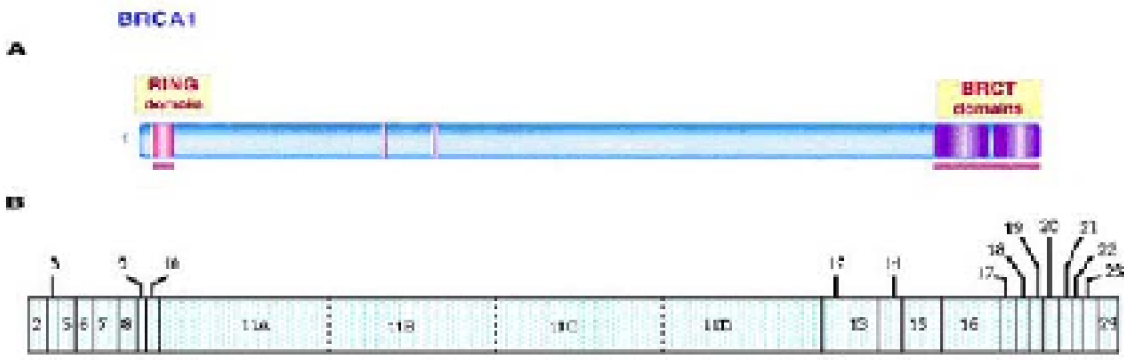


Figura 4. BRCA1

A. Estructura de la fosfoproteína, en el gráfico se pueden apreciar el Dominio de anillo en la zona aminoterminal y los dos dominios BRCT hacia la zona carboxiterminal.

B. Orden y disposición de los exones que codifican la proteína. La zona codificante de BRCT es la correspondiente a los exones 16 al 24, que a su vez es la que contiene un número significativo del total de mutaciones halladas en este gen relacionadas a cáncer de mama. (http://www.nhgri.nih.gov)

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

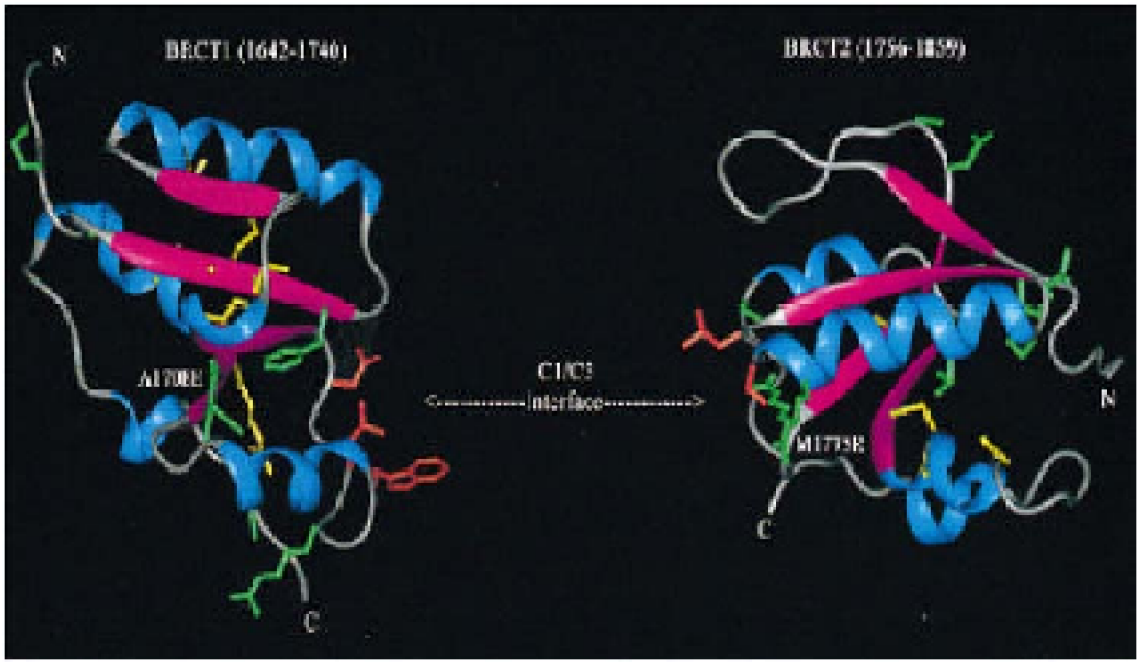


Figura 5. Dominios BRCT del gen BRCA1

Obsérvese que el residuo M1775 (que muta a arginina en casos patológicos), se encuentra cercano al área de interacción entre ambos, lo cual podría originar un empaque imperfecto entre ambos dominios (4).

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la contribución de un residuo cargado en la superficie del Dominio BRCT a la estructura y la estabilidad del dominio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Evaluar los efectos que produce la substitución de la arginina 21 por metionina en la estructura del dominio BRCT de la DNLJ ligasa de *Thermus thermophilus*.

Evaluar los efectos que produce la substitución de la arginina 21 por una metionina en la estabilidad del dominio BRCT de la DNLJ ligasa de *Thermus thermophilus*.

Evaluar los efectos que produce la substitución de la arginina 21 por una alanina en la estructura del dominio BRCT de la DNLJ ligasa de *Thermus thermophilus*.

Evaluar los efectos que produce la substitución de la arginina 21 por una alanina en la estabilidad del dominio BRCT de la DNLJ ligasa de *Thermus thermophilus*.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

ANTECEDENTES

Frecuentemente se observa alteraciones en la abundancia de proteínas reguladoras críticas en células cancerosas (20). La pérdida de proteínas supresoras de tumores o el incremento en función de los oncogenes es el mecanismo central a través del cual las células escapan del control regular en su proliferación y número. Entre los principales mecanismos que las células usan para ajustar la concentración de proteínas están el dosaje de genes, abundancia de ARN mensajero, y la estabilidad de las proteínas. Los dos primeros son conocidos por ser afectados frecuentemente por las células cancerosas para elevar los niveles de proteínas; en muchos tumores la amplificación de genes es observada, y comúnmente una transcripción inapropiada de genes es responsable de los efectos oncogénicos. Muchos menos se conoce acerca del rol de la estabilidad de proteínas en el proceso de cáncer (16).

El conocimiento de la estructura de las proteínas constituye una de las principales aproximaciones hacia el entendimiento de las bases moleculares de la enfermedad en los humanos (20-22). Aproximadamente, el 47% de las mutaciones reportadas como causantes de enfermedades genéticamente determinadas son mutaciones sin sentido, y la mayoría de estas parecen estar afectando mas frecuentemente la estructura que la función de las proteínas (23-24), comprometiendo el plegamiento y disminuyendo la estabilidad de estas (23). Es claro que el conocimiento de la estructura de proteínas puede ser usada para comprender los efectos fenotípicos de muchas mutaciones que causan enfermedades (20,23), por tanto, un mejor conocimiento de la estructura y la estabilidad del dominio BRCT permitiría establecer, si existiera, las bases de la relación mutación-malignidad; para ello, es necesario conocer a profundidad los factores que

determinan la estabilidad del dominio, a fin de poder evaluar las variaciones en la estabilidad de las proteínas mutantes respecto a la proteína nativa.

Si el dominio BRCT es capaz de mediar interacciones proteína-proteína (10) o de trabajar como un sensor de quiebres en cadenas del ADN (25), los estudios en la superficie de la molécula se hacen relevantes. Mas aun, conociendo que la estructura formada por dos alfa hélices (□1 y □3, Figura 6) en un lado de la molécula constituye un elemento esencial del plegamiento del dominio BRCT (4-8), siendo estas regiones las de mayor conservación tanto en la estructura primaria (2-4) como en el plegamiento de todos los dominios BRCT conocidos estructuralmente(4), y que muchas de las mutaciones conocidas en el gen BRCA1 (relacionadas al desarrollo de cáncer de mama) se localizan en los dominios BRCT de esta proteína (4,7,9,10), especialmente en la interfase hidrofóbica que se forma entre el BRCT I y BRCT II (que involucran la estructura alfa1-alfa3) (4,5,7). Entre estas mutaciones, las dos mejor descritas involucran cambios electrostáticos en esta interfase, en este sentido se plantea como objetivo de la presente investigación evaluar los efectos que tendrían las modificaciones electrostáticas en la superficie del dominio sobre la estructura y la estabilidad del dominio.

El dominio BRCT, objeto de estudio, pertenece a la DNLJ-ligasa de la bacteria *Thermus thermophilus*; y la posición elegida es arginina 21, que de acuerdo a la estructura descrita por Montelione (1L7B en www.pdb.org), se localiza al inicio de la primera alfa hélice del dominio. Corresponde a una de las mutaciones mejor descritas relacionadas a cáncer de mama en el gen BRCA1, M1775R (6,7,9,10), que en la estructura terciaria del dominio 1JNX (en www.pdb.org), se ubica en la superficie de interacción.

Dado que la estabilización de una proteína es la resultante del efecto acumulativo de pequeñas contribuciones favorables, desfavorables y de los residuos que la componen (27), este trabajo considera tanto la contribución de las fuerzas hidrofóbicas como electrostáticas que previamente han sido sugerida ser la fuerza determinante de la estabilidad de una proteína (28-29). El residuo objeto del estudio (arginina 21) además de involucrar ambos tipos de contribución (dada la naturaleza de su cadena lateral), es estructuralmente equivalente a la posición que ocupa una de las dos mejor caracterizadas mutaciones en el BRCA1: M1775R, relacionada con el desarrollo del cáncer (Figura 7).

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

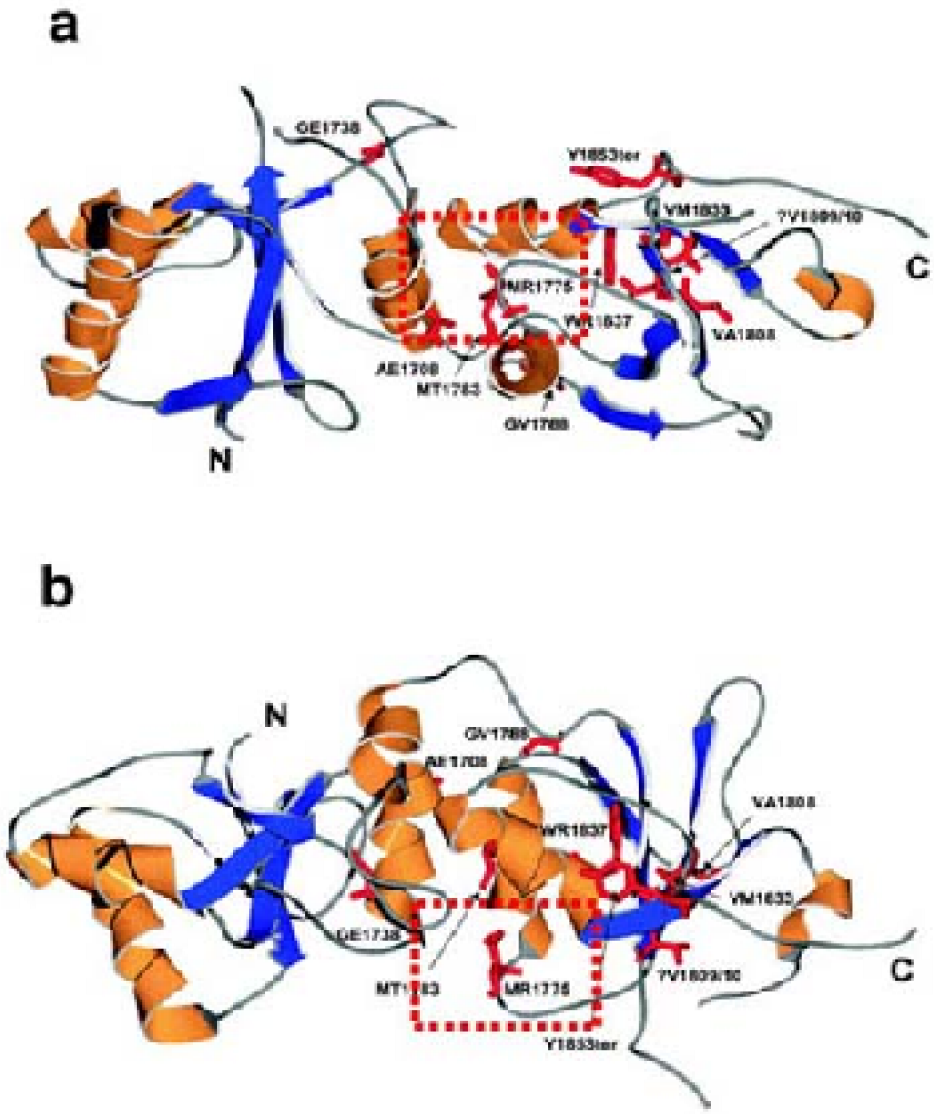


Figura 6. Dos vistas del complejo formado por los dominios BRCT de la proteína BRCA1

Dada la orientación del residuo metionina 1775, hacia el exterior del segundo dominio, conformando la interfase del complejo que se forma con el primero (rectángulo rojo), se podría esperar que la introducción de un residuo cargado (arginina en la mutación M1775R) afectase la interacción hidrofóbica entre ambos dominios, generando un plegamiento imperfecto de la proteína.

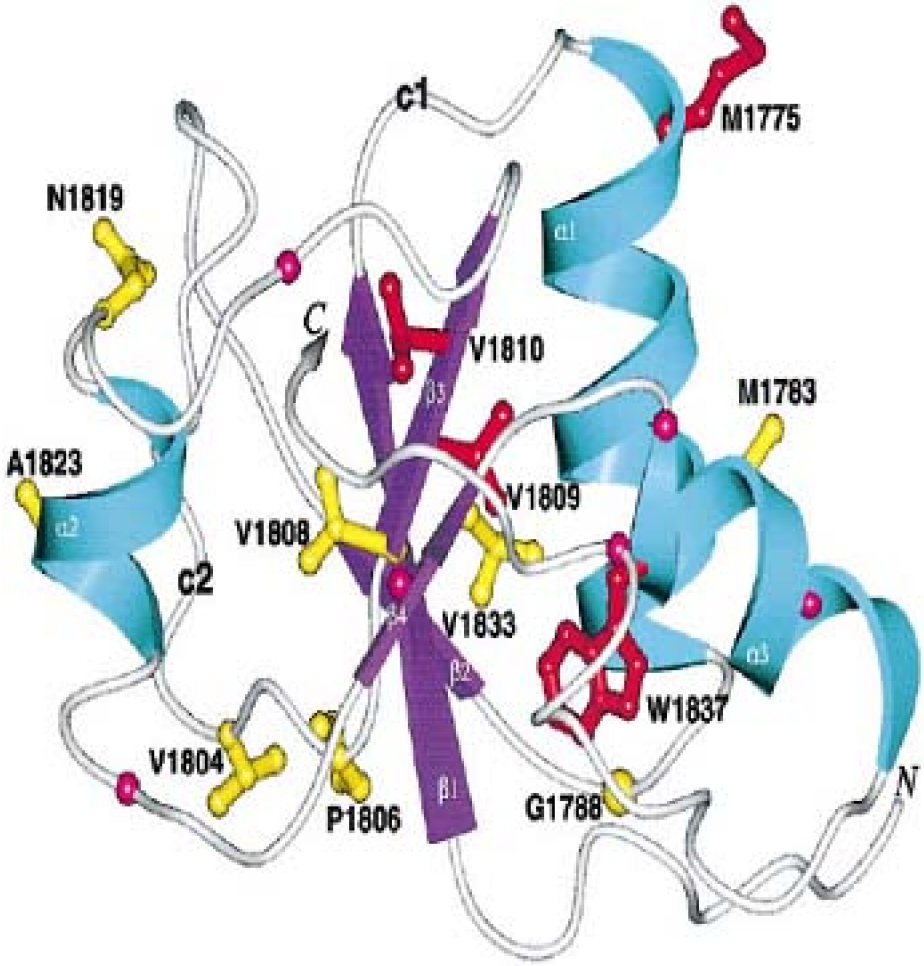


Figura 7. Dominio BRCT II de la proteína BRCA1

En la figura anterior, se puede observar el residuo M1775 (metionina 1775), que es la posición que frecuentemente muta a arginina en pacientes que presentan cáncer de mama. Esta posición es similar a la R21 (arginina 21) en el dominio BRCT de la DNLJ Ligasa de *Thermus thermophilus*. Este residuo se ubica en la primera Alfa hélice.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

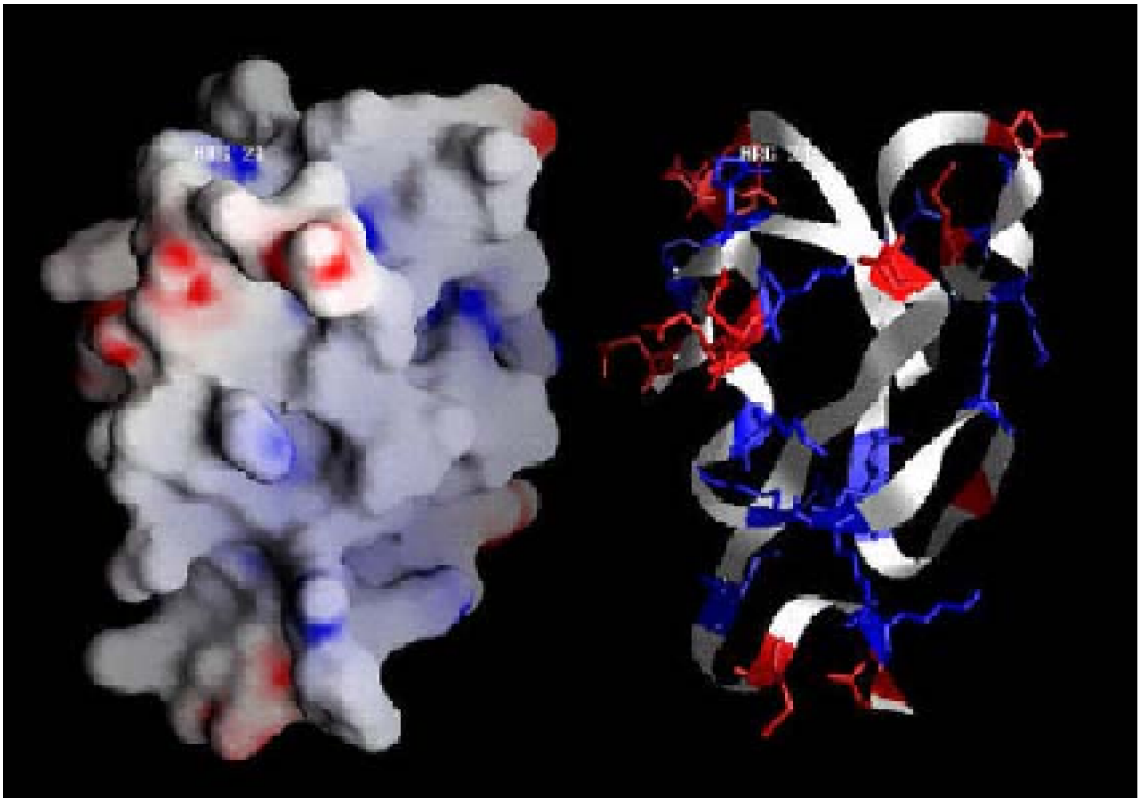


Figura 8.Representación gráfica de la estructura de la superficie y la estructura terciaria del Dominio BRCT de la DNLJ ligasa de Thermus thermophilus.

Empleando el programa GRASP (30) y las coordenadas registradas en el Protein Data Base (www.pdb.org). El color rojo representa los residuos cargados negativamente y el azul los positivos. Nótese que la arginina 21 se encuentra al inicio de la primera alfa hélice y su cadena lateral esta orientada hacia la superficie de la molécula.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

MÉTODOS

Obtención de mutantes:

1 µg del plásmido PL189 (gentilmente proporcionado por Gaetano Montelione) conteniendo la región codificante para el dominio BRCT de la DNLJ Ligasa de *T. thermophilus* clonado entre los sitios de restricción *Nco*I y *BamH*I, fue transformado en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) según las instrucciones del fabricante, e incubado por 18 horas en placas con medio sólido 2xYT (Apéndice 1) conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Una colonia fue inoculada en 3 ml de caldo Luria Bertrani conteniendo 100 µg/ml de ampicilina, incubada 18 horas a 37°C, en agitación de 300 rpm. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 5000 g por 5 minutos, usando tubos descartables Falcon de 50 ml. El plásmido fue purificado empleando el sistema Miniprep (Qiagen). Una dilución de la muestra resultante fue cuantificada por espectrofotometría ultravioleta, empleando cubetas de cuarzo de 1 ml. La pureza de la muestra fue calculada mediante la relación de la absorbancia a 260 y 280 nm.

Una alícuota del plásmido fue enviada a la Unidad de Secuenciamiento de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva Jersey (EEUU), a fin de verificar la secuencia de la región codificante.

Una vez verificada la región codificante, usando el sistema Quick Change (Stratagene) se realizó mutagénesis dirigida a fin de sustituir la arginina 21 por una metionina para formar el mutante R21M y por una alanina para el mutante R21A.

Los pares de iniciadores mutagénicos (Integrated DNA Technologies) empleados

fueron:

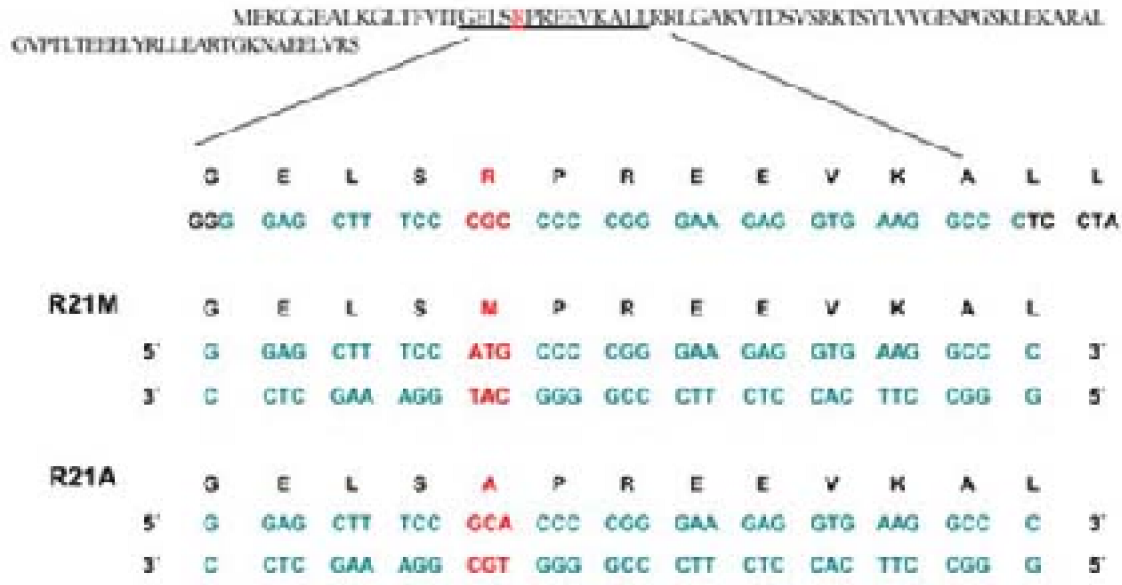
R21M: GGAGCTTTCCATGCCCCGGGAAGAGGTGAAGGCCCT

CACCTCTTCCCGGGGCATGGAAAGCTCCCCGG

R21A: GGAGCTTTCCGCACCCCGGGAAGAGGTGAAGGCCC

CACCTCTTCCCGGGGTGCGGAAAGCTCCCCGGT

Diseño de iniciadores: Secuencia aminoacídica del Dominio BRCT objeto del estudio.



Se amplia la parte subrayada, que corresponde al entorno del residuo R21 (arginina 21). Se señala la secuencia de ADN que codifica para cada residuo, el codón que será afectado por las mutaciones se presenta en rojo. En azul se presenta el par de iniciadores elegido para cada mutación.

El programa de PCR usado fue: 1 minuto 95ºC, 16 ciclos con 90 segundos de desnaturación a 95ºC, 1 minuto de alineamiento a 57ºC, y 12 minutos de extensión a 68º C.

Los productos de PCR digeridos con la enzima *DpnI* por 1 hora a 37ºC. Alícuotas de estos productos, antes y después de la digestión enzimática, fueron visualizados mediante electroforesis en agarosa al 1% con TBE. Los productos, digeridos por *DpnI*, fueron transformados en células competentes *E. coli* XL-Blue (Stratagene) usando el método descrito por los proveedores. Los plásmidos mutantes fueron extraídos mediante el kit Miniprep Spin (Qiagen)(32) , para luego ser secuenciados de la misma manera que fue el plásmido parental. Una vez verificadas las secuencias, el plásmido PL189 mutado fue transformado en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y los mutantes (R21M y R21A) fueron mantenidos en medio sólido selectivo Luria Bertrani.

Expresión de proteínas:

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

Las cepas mutantes se cultivaron en 4 litros de caldo TB (Apéndice 1) a 37º C, 300 rpm, hasta alcanzar la densidad óptima de 0.6 o 0.8 medida a una longitud de onda de 600 nm, punto en el que se realizó la inducción de la expresión usando IPTG (isopropil -D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1mM. Luego de cuatro horas de incubación las células fueron recuperadas por centrifugación por 10 minutos a 5000 g.

El paquete celular fue resuspendido en 3 volúmenes de buffer TE pH 8, 0.1% azida de sodio. Las células fueron sometidas a sonicación, y los ácidos nucleicos fueron precipitados agregando 0.25 volúmenes de sulfato de estreptomicina 10% por goteo a 4ºC con agitación muy ligera. El sobrenadante, conteniendo la proteína de interés, fue recuperado por centrifugación por 30 minutos a 18000 g para ser purificado inmediatamente o de lo contrario, ser almacenado a -20ºC.

Purificación de proteínas:

Las proteínas fueron purificadas empleando dos tipos de cromatografía: cromatografía de filtración y cromatografía de fase reversa FPLC.

a) Cromatografía de filtración:

Los sobrenadantes conteniendo en promedio 120 mg de proteína fueron cargados en una columna preparativa de 2 litros de Sephacryl H-100 (Pharmacia), pre-equilibrada con Acetato de amonio 300 mM pH 6.8. La corrida se realizó con un flujo de 6 ml/minuto, colectándose 72 fracciones de 24 ml cada una. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (33), se determinaron las fracciones en las que la proteína fue eluyó.

b) Cromatografía de fase reversa FPLC:

Dada la naturaleza termoestable de estas proteínas, un paso de calentamiento precedió a la cromatografía de fase reversa, la muestra fue calentada por 30 minutos a 80º C, y luego centrifugada 10 minutos a 18000 g. El sobrenadante conteniendo la proteína fue sometido a cromatografía de fase reversa.

Hasta 10 mg de proteína se inyectaronen una columna preparativa Pep 16/10 (Pharmacia), empleando gradientes de 100 a 0% de Buffer A (20% acetonitrilo, 0.01% ácido trifluoroacético) y de 0 a 100% de buffer B (60% acetonitrilo, 0.01% ácido trifluoroacético). Fracciones de 2.5 ml fueron colectadas, congeladas en hielo seco y luego liofilizadas, a -40 C utilizando vacío (Savant) (37).

Cuantificación de proteínas:

Las proteínas liofilizadas fueron resuspendidas en hidrocloruro de guanidina 8M ultrapura, y congeladas a –70º C. Alícuotas de estas resuspensiones fueron sometidas a espectroscopía de masas a fin de verificar la pureza de la muestra. Se verificó que el mayor componente de cada muestra era la proteína deseada.

Las mediciones fueron realizadas con un espectrofotómetro empleando cubetas de cuarzo de 0.5 ml con 1cm de paso de luz. Los coeficientes de extinción utilizados para los cálculos fueron: 2900 para el dominio nativo y el mutante R21A; y 2810 para R21M, calculados a partir de la secuencia primaria utilizando el programa Protparam (http://us.expasy.org/tools/protparam.html) (34).

Preparación de muestras:

Las pruebas biofísicas fueron realizadas en buffer fosfato 10 mM pH 7. Las muestras fueron dializadas en hidrocloruro de guanidina 8M frente a buffer fosfato 10mM, utilizando membranas con un limite de exclusión de 1000 Daltons. Posteriormente la muestra, en buffer fosfato, fue concentrada usando Ym-3 Centriprep, mediante 4 ciclos de centrifugación a 7000 g por 30 minutos a 4ºC. Después de cada ciclo de centrifugación, el estado de agregación de la muestra fue verificada mediante cromatografía de filtración analítica, empleando una columna Superdex-75. Se confirmó un estado de agregación monomérico aún a altas concentraciones de proteína (hasta 300µM), lo cual permitió las evaluaciones de dicroismo circular (37).

Evaluación de la estructura terciaria:

a) Resonancia magnética nuclear unidimensional (1D NMR):

Diluciones de 200 a 300 µM de proteína en buffer fosfato, fueron preparadas con deuterio para ser sometidas al espectrómetro Varían de 500MHz. El perfil resultante fue procesado utilizando el programa Felix 6.0 (37).

b) Dicroísmo Circular en el espectro ultravioleta cercano :

Se emplearon cubetas de 2 mm de paso de luz. Las lecturas fueron registradas cada 0.2 nm, entre 250 y 320 nm, empleando un espectropolarímetro AVIV-60. Los datos fueron procesados empleando el programa Sigma Plot, y el perfil fue normalizado en referencia a la concentración de la muestra(37).

Evaluación de la estructura secundaria:

Dicroísmo circular en el espectro ultravioleta lejano:

Se emplearon cubetas de 1 mm de paso de luz y las concentraciones de proteína que se señalan en la Tabla Nº1. Las lecturas fueron registradas cada 0.2 nm entre 190 y 250 nm, usando el espectropolarímetro AVIV-60.

Como blanco, se realizó una corrida empleando buffer fosfato 10mM en la misma cubeta. Las medidas obtenidas de la corrida blanco fueron substraídas de las medidas obtenidas con las muestras, y los datos resultantes fueron normalizados empleando la fórmula (35):

$$\Phi\eta = (\Phi\lambda)\ \frac{1}{(M_{(dM)})\,(l_{(cm)})(Aa)} =$$

Donde:

Φη: es la medida de elipcicidad normalizada a una determinada longitud de onda.

Φλ : es la medida de elipcicidad a una determinada longitud de onda.

l: es la longitud que la luz atraviesa la cubeta expresada en centímetros

Aa: es el número de aminoácidos del dominio.

Evaluación de la estabilidad:

Se utilizóla Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en la evaluación de la

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

estabilidad de las proteínas empleándose las concentraciones de proteína señaladas en la Tabla Nº2. Las medidas de línea base o blanco, se realizaron con buffer fosfato 10 mM pH 7 y fueron sustraídas de las mediciones experimentales. Los datos fueron procesados empleando los programas Mlab para calcular el calor específico y la temperatura de desnaturación, y Sigma Plot para graficar los resultados(37).

Tabla Nº 1. Muestras empleadas para las mediciones de Dicroismo Circular (CD)

	Para el Espectro		**Para el Espectro**	
	Ultravioleta lejano		**Ultravioleta cercano**	
	mg/ml	**Molaridad (10^{-5})**	**Mg/ml**	**Molaridad (10^{-4})**
BRCT	0.2103	2.101	3.655	3.650
BRCT/R21M	0.317	3.176	6.583	6.590
BRCT/R21A	0.263	2.651	4.863	4.89

Tabla Nº2. Muestras empleadas para las mediciones de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

	Concentración (mg/ml)	**Molaridad (10^{-5})**
BRCT	0.81	8.092297
BRCT/R21M	0.97	9.71836
BRCT/R21A	0.43	4.334335

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Análisis de la estructura del dominio BRCT:

El análisis de la estructura secundaria del dominio, mediante dicroísmo circular en el espectro ultravioleta lejano, reflejó un perfil idéntico para la proteína nativa como para las mutantes (Figura9). Este perfil corresponde a una proteína de estructura alfa-beta, que se confirmó con los resultados obtenidos del análisis con el programa K2D (36), que muestra una proteína con 36% de hélice alfa y 42 % de hoja beta.

La invariabilidad del perfil nos estaría indicando que a nivel de la estructura secundaria, las mutaciones realizadas no generan ningún efecto en el contenido alfa-helical del dominio que podría verse afectado debido a que la posición de las mutaciones corresponde al inicio de la primera alfa hélice. Aparentemente, a nivel de la estructura secundaria, el intercambio de una arginina por una metionina o por una alanina es fácilmente tolerado por este dominio.

La estructura terciaria del dominio BRCT fue evaluada mediante dicroísmo circular en el espectro ultravioleta cercano, encontrando dos condiciones: primero, que el plegamiento no se ha alterado y segundo que la señal que se obtiene de los residuos aromáticos se mantiene inalterable. No se distingue ninguna variación generada por las mutaciones (Figura 10), que han sido hechas en la superficie de la molécula y no involucran cambios en la composición de residuos aromáticos, aun más, la posición 21 no se encuentra en el entorno físico de éstos. Así mismo, la elevada similitud de los perfiles de las tres proteínas demuestra que no existen diferencias significativas en cuanto a la proporción de la población de proteína plegada y la de proteína desplegada, por tanto, a

temperatura ambiente, el equilibrio entre ambos estados se mantendría inalterado.

Los resultados obtenidos de 1D-NMR muestran, similarmente a lo observado en los experimentos de dicroísmo circular, un perfil que se ve casi inalterado por las mutaciones, lo cual sugiere que la estructura global del dominio no se ve afectada (Figura 11). En la región superior a cero (campo alto) se observan claramente los picos correspondientes a una estructura terciaria bien definida (Figura 12), observándose que el empaque de los grupos metilo contra las cadenas laterales aromáticas dentro de las regiones hidrofóbicas, como se puede observar en la superposición de los perfiles, mantiene el mismo patrón de plegamiento que no se ve afectado por las mutaciones.

Los resultados de cromatografía de filtración (Figura 13), verifican que el estado de agregación del dominio se mantiene inalterado por la mutaciones, observándose en solución como un monómero tanto en la proteína nativa como en las mutantes. El cromatograma refleja un pico único con volumen de elusión constante, independiente de la concentración de la muestra, lo cual confirma una estructura compacta inalterada por las mutaciones.

Todos estos resultados estarían sugiriendo que el dominio presenta una estructura definida y estable, con la capacidad de tolerar las mutaciones realizadas. Esto indica que el primer residuo de la primera alfa hélice del dominio no constituye un residuo clave para la estructura del dominio, por tanto la mutación es bien asimilada y cualquier efecto menor a este nivel es contrarrestado por las posiciones claves que dirigen la formación de la estructura. El hecho de que el tamaño de la cadena lateral sea irrelevante para el dominio (arginina y metionina presentan cadenas laterales mas grandes que alanina), estaría confirmando que esta se encuentra orientada hacia el exterior de la molécula, que podría ser la razón por la que la estructura del dominio puede tolerar las mutaciones, y mantenerse en estado monomérico, teniendo todas las proteínas el mismo nivel de exposición del centro hidrofóbico del dominio que se mantiene compacto.

Extrapolando lo observado a la mutación, que por su relevancia clínica genera este estudio, M1775R en el BRCA1, homóloga a R21M, los resultados estarían sugiriendo que el efecto estructural de esta mutación, si existiera, seria mínimo, lo cual parecería indicar que el fenotipo observado por esta (desarrollo de cáncer de mama en la población que presenta dicha mutación), se debería mas a variaciones en la estabilidad que en la estructura del dominio. Múltiples estudios demuestran que la mayoría de posiciones en una proteína pueden ser mutadas sin obtener efectos significativos en la estructura o función de la misma (17-18, 38-41), sin embargo, cuando estos efectos ocurren, la tendencia es a comprometer mayormente el plegamiento y por tanto afectar la estabilidad de la proteína (42-45).

Partiendo de lo observado hasta este punto, se esperaría que la mutación de la arginina 21, al no generar ningún efecto en la estructura ni en el estado de agregación del dominio, debe presentaruna variación significativa en la estabilidad del dominio, que seria la responsable de la malignidad que esta genera (4,6,24).

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

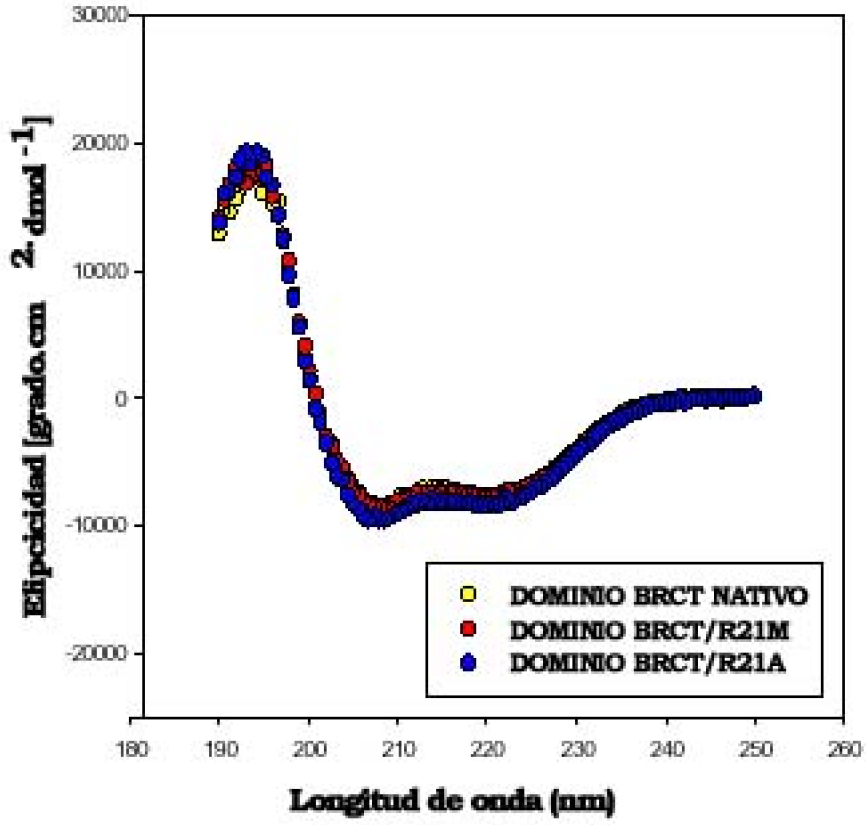


Figura 9. Dicroísmo Circular en el Espectro Ultravioleta Lejano.

La superposición de los perfiles obtenidos en la evaluación de la estructura secundaria del Dominio BRCT nativo y sus mutantes (R12A y R21M) estaría indicando que la estructura secundaria del dominio se mantiene inalterada a pesar de las mutaciones.

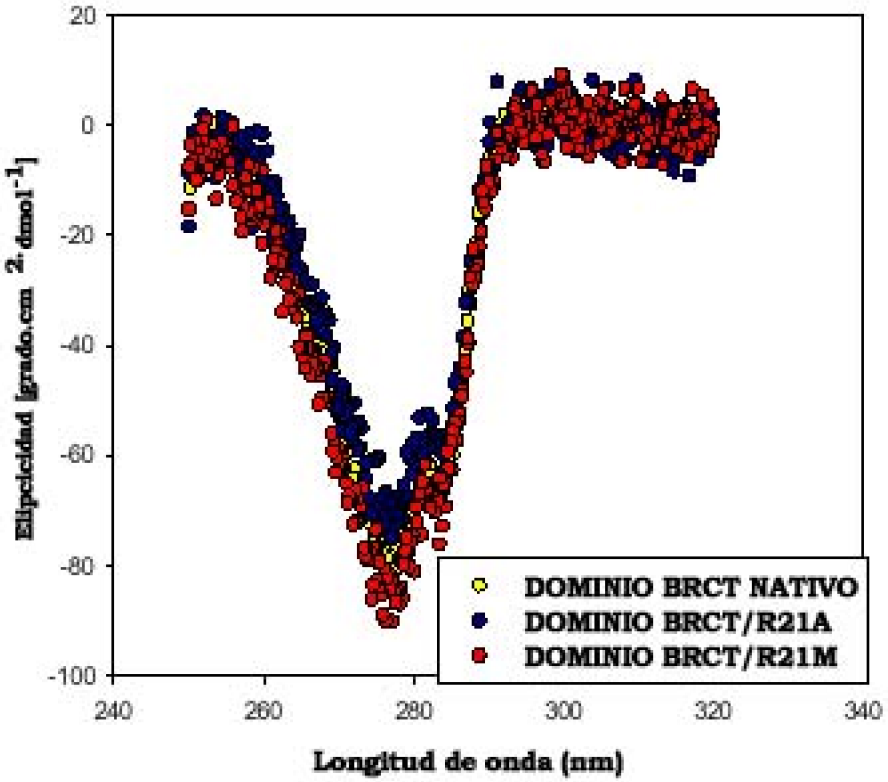


Figura 10. Dicroísmo Circular en el Espectro Ultravioleta Cercano.

La superposición de los perfiles obtenidos en la evaluación de la estructura terciaria del dominio BRCT nativo y sus mutantes (R21A y R21M) muestra que los dominios plegados presentan el mismo grado de exposición de los grupos aromáticos, lo que significa que el empaque de estos se mantiene constante.

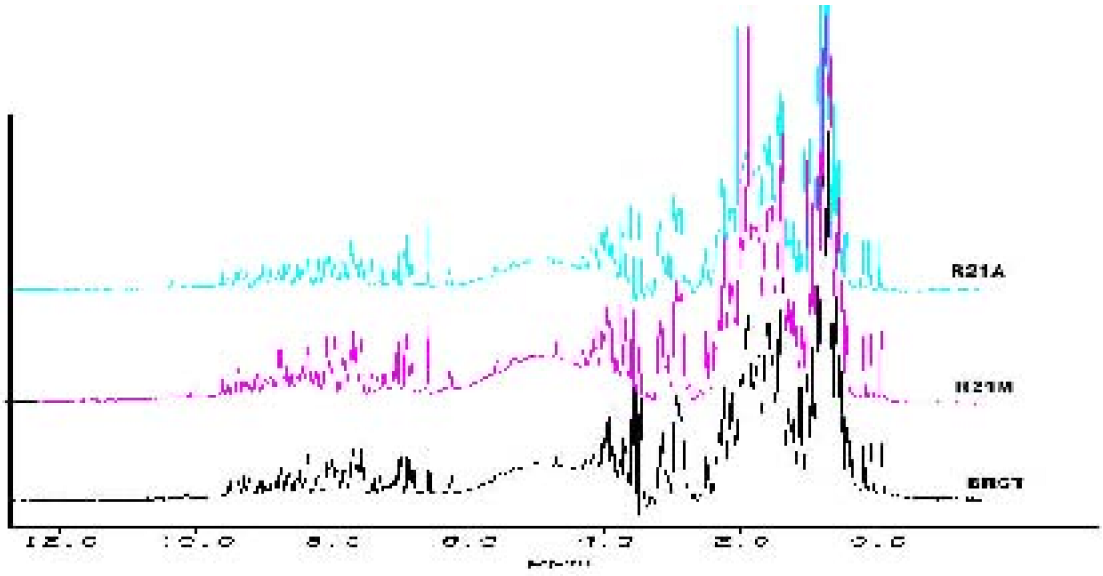


Figura 11.Perfil obtenido mediante Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (1D-NMR)

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

Demuestra que la estructura general de la proteína se mantiene casi invariable.

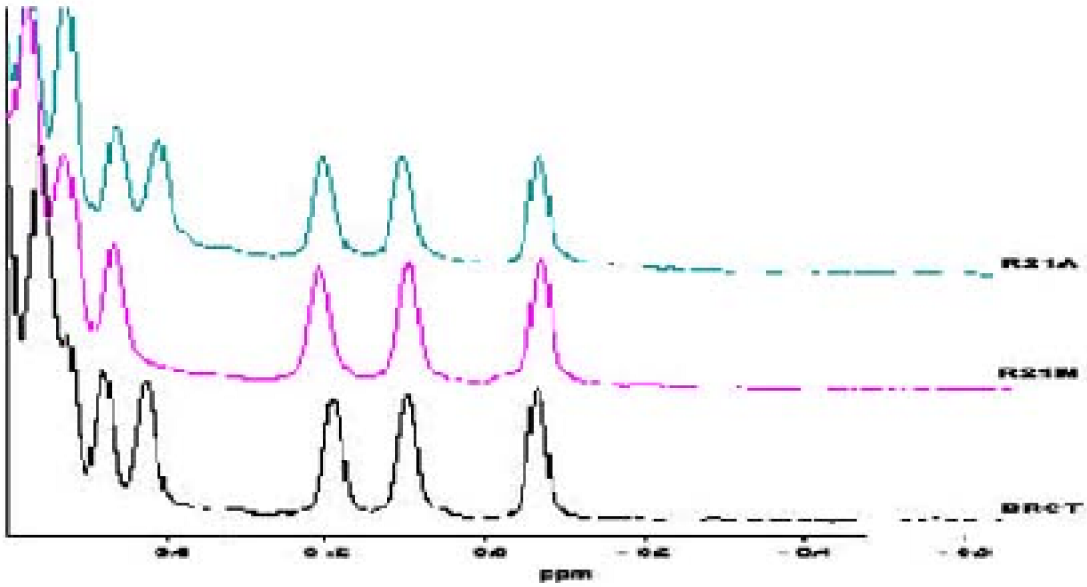


Figura 12. Perfil obtenido como resultado de 1D-NMR en el campo alto

Muestra que el pico que se encuentra entre 0.0 y –0.2 se mantiene invariable, y representa que la estructura espacial de la proteína no ha sido alterada.

La bibliografía reporta el efecto estabilizante de la alanina cuando esta se incorpora en una alfa hélice (17-18,38,42) considerándose que esta favorece la formación de las mismas (18,38). Se esperaba que la mutación R21A mostrase cierta variación en la estructura secundaria, ya que la alanina 21 al contribuir favorablemente a la formación de la hélice en la cual se ubica, podría contrarrestar las distorsiones generadas por la prolina 22, al ser la prolina un aminoácido reconocido por generar quiebres e irregularidades en el ángulo de torsión de la alfa hélice (45). Al mantenerse inalterada la composición alfa-beta del dominio, se estaría observando que debido a la gran estabilidad que el dominio posee, este no es sensible a pequeñas variaciones, y que la posición mutada no representa un residuo crucial para la estructura del dominio.

Análisis de la Estabilidad:

En vista que el dominio BRCT empleado en este estudio, proviene de un organismo termofílico, se esperaría un incremento en elnúmero de residuos cargados (48), partiendo de la premisa que la elevada termoestabilidad de las proteínas en organismos termofílicos estaría determinada por las contribuciones estabilizantes generadas por las interacciones electrostáticas de los residuos cargados, que parecen ser mas frecuentes en proteínas de esta naturaleza (49); sin embargo, el análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de algunos dominios BRCT demuestra que no existe una diferencia significativa en la proporción de residuos cargados de este dominio, con respecto a otras proteínas de la superfamilia, por tanto, lo significativo del aporte electrostático en este dominio estaría de acuerdo con la aseveración que seria la interacción que se establece entre estas la que determinarían la estabilidad de la proteína (27).

La arginina que se encuentra en la posición 21 en este dominio, se encuentra considerada en el grupo de aminoácidos cargados positivamente, pero su cadena radical posee además cierta naturaleza hidrofóbica; por tanto, al evaluar la contribución de la arginina a la estabilidad del dominio, es necesario distinguir dos componentes: el componente hidrofóbico y el componente electrostático. Considerando que la introducción de una metionina en el lugar de la arginina estaría anulando el componente electrostático, dejando casi inalterado el hidrofóbico, la mutación R21M nos permite evaluar la importancia del aporte electrostático a la estabilidad del dominio, sin embargo, es necesaria una mutación mas que nos permita evaluar el aporte hidrofóbico del residuo, por tanto se planteó R21A, que reduce ambas contribuciones. Estas dos mutaciones nos permiten desligar ambos componentes: las diferencias observadas entre el dominio nativo y R21M se atribuirían a la contribución electrostática de la arginina, y las diferencias entre R21M y R21A, estarían dadas por la diferencia en el aporte hidrofóbico de sus cadenas laterales. Además de desligar los dos aspectos de la contribución de la Arginina 21 (hidrofóbico y electrostático), hace posible evaluar independientemente que tan favorables o desfavorables constituyen estas contribuciones.

Experimentalmente se observa que las mutaciones alteran la termoestabilidad del dominio: El Tm (Temperatura de desnaturación) mostrado por el dominio nativo se ve disminuido por las mutaciones, apreciándose un efecto mas dramático en R21A que R21M (Figura14).

Considerando que la termoestabilidad es el efecto acumulativo de pequeñas contribuciones favorables y desfavorables (27), dado que el efecto observado en este estudio es la disminución y no aumento de la estabilidad, se considera que el aporte global de arginina 21 a la estabilidad del dominio es favorable. Ahora es necesario desligar la contribución hidrofóbica y electrostática del residuo, a fin de poder evaluar independientemente y poder establecer la relevancia de cada uno de los componentes. Los resultados que podrían observarse, dependiendo de la relevancia del efecto de cada contribución, serían:

A. Si el aporte de Arginina 21 se limita solo a su contribución electrostática, se esperaría una diferencia entre la proteína nativa y ambos mutantes y ambos deberían tener aproximadamente la misma variación en el Tm, ya que el componente hidrofóbico no afectaría el resultado.

B. Si la contribución electrostática e hidrofóbica de la arginina 21 no son significativas para la estabilidad del dominio, las mutaciones en esta posición deberían generar proteínas que reflejen exactamente la misma Tm, es decir, las mutaciones no deberían afectar la entalpía de desplegamiento del dominio.

C. Si la contribución hidrofóbica de la Arginina 21 es determinante para la estabilidad del dominio, los resultados reflejarían las diferencias en contribución hidrofóbica de cada uno de los residuos. Por tanto, considerando que metionina tiene una contribución hidrofóbica muy similar a la de la arginina, y la alanina posee una contribución hidrofóbica mínima, se observaría que el mutante R21A sería el mas afectado con una disminución significativa de la Tm. Además, la introducción de metionina no debería generar diferencias en la Tm del mutante (R21M), y en caso que hubiera alguna diferencia, la Tm

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

seria aun ligeramente mas alto dado que metionina posee un radical ligeramente mas hidrofóbico que arginina. En consecuencia, la Tm de R21M seria igual a ligeramente mayor al de la proteína nativa, y R21A sería menor que ambos.

D. Si la contribución de la Arginina 21 a la estabilidad del dominio esta dada por la adición de las contribuciones hidrofóbica y electrostática de su cadena lateral: se observaría disminución de estabilidad para ambos mutantes, siendo menos estable R21A que R21M y ambos menos estables que el dominio nativo.

Los resultados muestran este último caso (Figura 14), en que la Tm se ve disminuida en ambos mutantes, siendo mas afectado R21A, en el cual la contribución hidrofóbica de la cadena radical de la arginina se ve disminuida al mismo tiempo que se elimina la carga de este, a diferencia de R21M, en el cual si bien se elimina la carga, la contribución hidrofóbica no se ve tan afectada. Por tanto, se estaría observando que si bien la contribución de la carga de la arginina es favorable para la estabilidad del dominio, esta es aditiva a la contribución también favorable de la hidrofobicidad que aporta la misma.

La bibliografía reporta abundante información acerca del efecto estabilizante de la alanina cuando esta es incorporada en alfa hélices o en la superficie de la molécula (45-46, 49), y la mutación R21A estaría cumpliendo con ambas condiciones, en teoría podría esperarse un aumento en la estabilidad del dominio, pero como ya fue discutido, mutaciones en esta posición no afectan la estructura, y aparentemente el efecto estabilizante de la alanina estaría dado por su capacidad de favorecer la formación de estructuras alfa hélice (**α**); en el caso de nuestro dominio, la primera alfa hélice objeto del estudio parece estar muy bien estructurada, a pesar de este contar con una prolina en posición 22, siendo este aminoácido conocido por generar quiebres en las estructuras alfa (**α**).(50)

Se realizaron experimentos de recalentamiento a todas las muestras, obteniéndose como resultado una temperatura de desnaturación constante (Figura 15), lo cual estaría demostrando la reversibilidad del plegamiento del dominio después de ser desnaturado, es decir, la capacidad de volver a plegarse con una estructura similar después de haber sido desplegado por efecto térmico, por tanto, se puede considerar que es un proceso de desnaturación reversible.

Es interesante ver que la estabilidad de este dominio si bien se ve afectada, mantiene la reversibilidad del proceso. Se ha observado en otras proteínas también relacionadas al cáncer, cuyas mutaciones reportan disminución en la estabilidad (como en este caso), que la capacidad de replegarse se ve afectada, es el caso del dominio central de la proteína p53, asociada con el 50% de cáncer en humanos, y se observa que la mayoría de mutaciones solo desestabilizan la proteína (24). De modo similar a lo que sucede con nuestra proteína, la estabilidad se ve disminuida, y los perfiles de desnaturación muestran la curva típica de dos estados plegado-desplegado sin estados intermedios; sin embargo, se observa que este dominio de la p53 no se vuelve a plegar, a diferencia del BRCT, que mantiene la capacidad de repliegarse en ambos mutantes. Entre las variantes mutagénicas más comunes del dominio central de la p53, frecuentemente se encuentra involucrada la arginina, y la tendencia es a afectar la estabilidad del dominio.

El hecho que la capacidad de replegarse se mantenga en el BRCT estaría sugiriendo que si bien el residuo arginina 21 contribuye significativamente a la estabilidad del dominio, las fuerzas que dirigen el plegamiento del dominio se mantienen. Esto se observa claramente al comparar los mutantes R21M y R21A, los cuales demuestran que tanto el aporte electrostático, evaluado con la remoción de la carga en R21M; y el aporte hidrofóbico, evaluando el mutante R21A que remueve la carga y además reduce el aporte hidrofóbico, son favorables para la estabilidad del dominio.

Partiendo de estas observaciones, podríamos inferir que el mutante M1775R estaría alterando la estabilidad mas no la estructura del dominio, por tanto, el desarrollo de la enfermedad estaría condicionado a una menor estabilidad de una proteína estructuralmente similar, lo cual probablemente estaría afectando la capacidad del dominio de interactuar con otros módulos y/o mantener las estructuras supramoleculares en las que estaría involucrado, considerando que el dominio BRCT es considerado un módulo proteico de interacción (4-9).

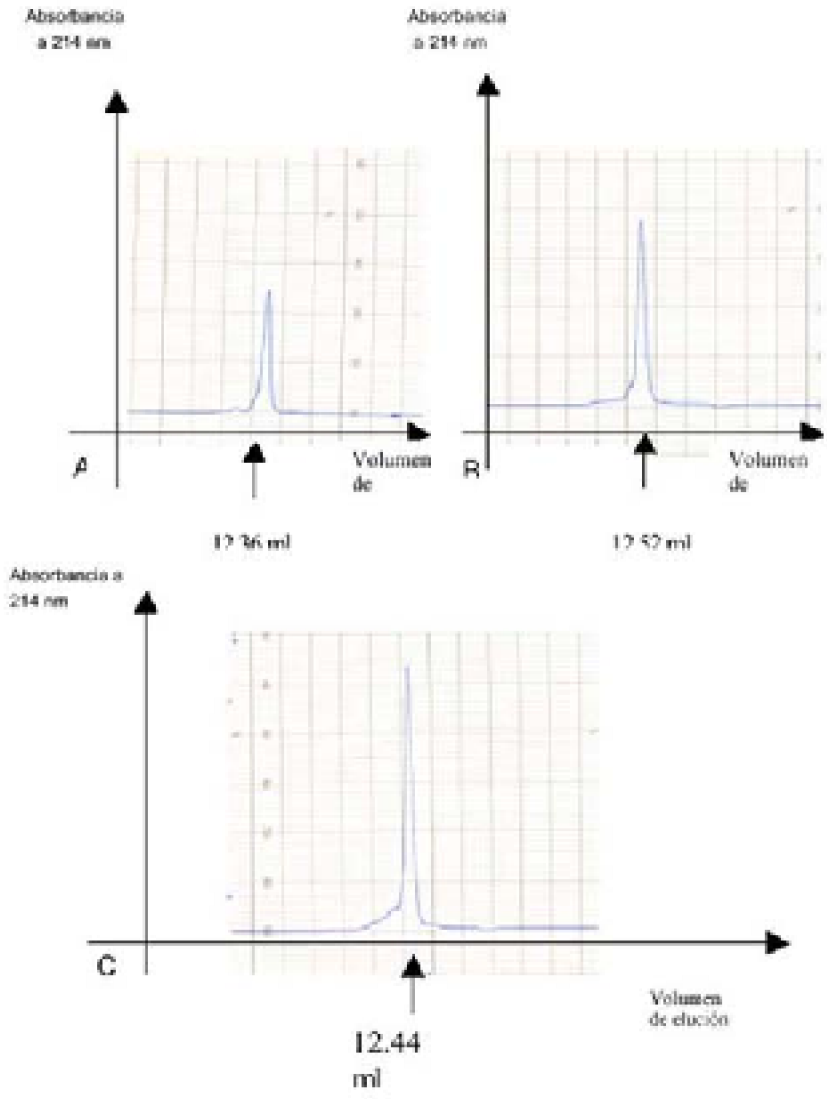


Figura 13.Cromatografía de filtración

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

Los picos representan la absorbancia a 214 nm., qué fue la longitud de onda elegida para monitorear las corridas cromatográficas. Las flechas indican el volumen al cual la proteína eluyó. Nótese que se observan picos únicos, que mantienen el volumen de elución correspondiente a monómeros. Las muestras fueron corridas durante el proceso de concentración, lo que se refleja en las diferencias en el área de pico.

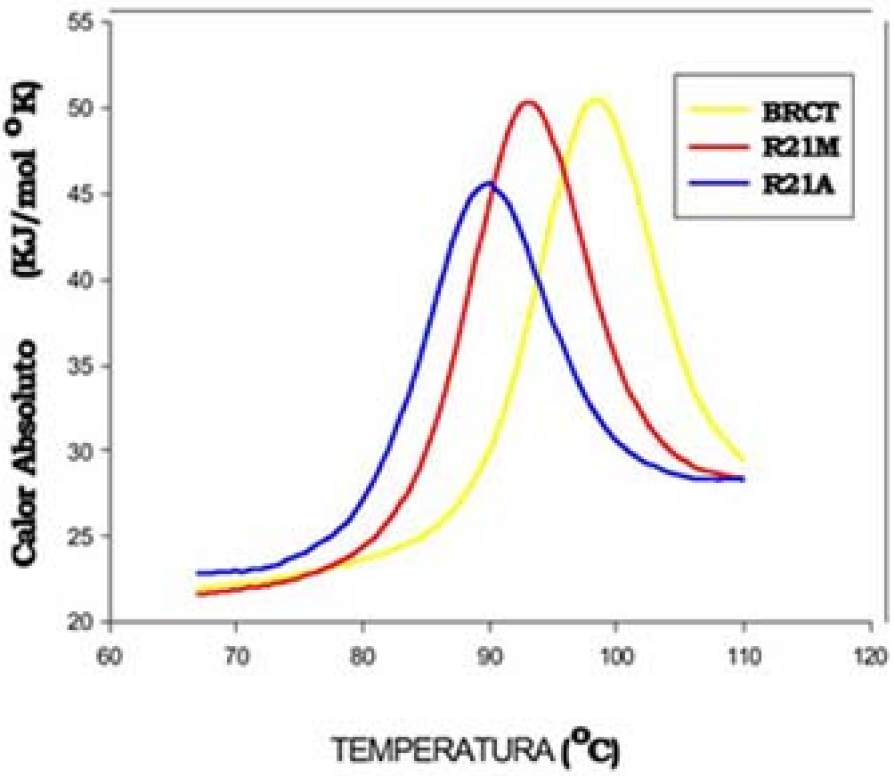


Figura 14. Gráfica de los resultados obtenidos de la Calorimetría diferencial de barrido del dominio BRCT para diferenciar la temperatura de desnaturación (Tm)

Los picos muestran la temperatura de desnaturacion (Tm). Nótese que aunque el Tm se ve afectado, el perfil sigue siendo el mismo, correspondiente a una proteína típica de dos estados: plegado y desplegado.

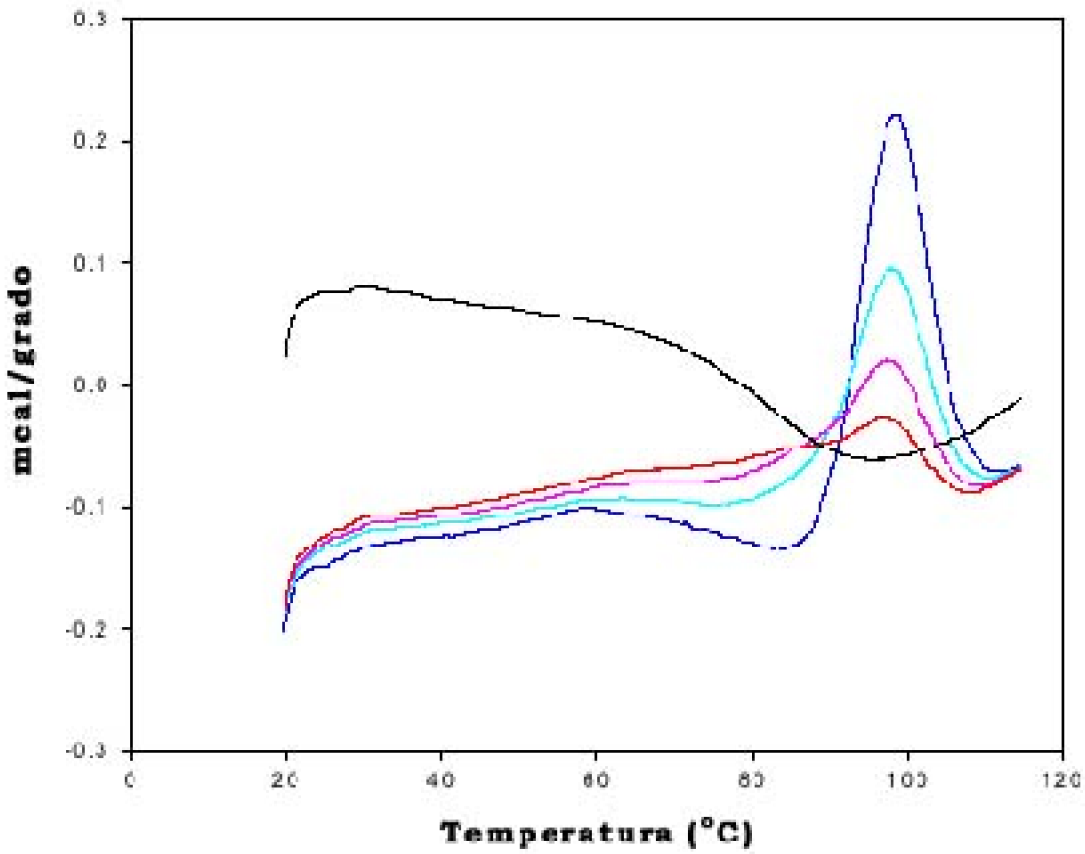


Figura 15. Domino Nativo BRCT, Pruebas de recalentamiento.

Se observa que la Tm no se ve modificada, por tanto, al enfriar la muestra se repliega en la misma forma, sin formación de estados intermediarios de plegamiento. (línea azul)Corresponde al calentamiento del dominio BRCT,(línea celeste)al primer recalentamiento,(línea morada) al segundo recalentamiento,(línea roja) al tercer recalentamiento y(línea negra) a la línea base.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

CONCLUSIONES

De los resultados experimentales, se puede concluir:

1. Que las mutaciones realizadas en la posición 21 del dominio BRCT de la DNLJ-ligasa de *T. Thermophilus* no producen ningún efecto en la estructura de la proteína, manteniéndose el plegamiento compacto y definido de la proteína nativa en sus mutantes.

2. Que si bien la contribución de la arginina 21 del dominio BRCT de la DNLJ-ligasa de *T. Thermophilus* es favorable para la estabilidad del dominio, este residuo no mostró tener una contribución crucial en la estabilidad del mismo.

3. Que la diferencia en estabilidad entre los mutantes R21M y R21A muestra que mas allá de la relevancia de la carga de la arginina, la hidrofobicidad que su cadena lateral aporta es también significativa en la estabilidad del dominio, por tanto, el aporte de la arginina 21 a la estabilidad del dominio estaría dado por la adición de la contribución favorable de su carga positiva y de la hidrofobicidad de su cadena radical, que también es favorable para la estabilidad del dominio.

4. Que la contribución estabilizante de la Arginina 21, al hallarse en la superficie del dominio, parece tener relevancia más que para el dominio en si, en la capacidad de interactuar con otros módulos de proteínas o ácidos nucleicos, que se considera es la función principal del dominio BRCT.

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

BIBLIOGRAFÍA

Koonin, E.V., Altscul S.F. y Bork,P. (1996) BRCA1 protein products...functional motifs. Nat. Gen. **13**:266-267

Bork, P., Hofmann, P., Butcher, A.F. .,Neuwald Altschul, AF. y Koonin,, EV. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. FASEB J. **11**:68-76

Callebaut, I. y Mornon, J.P. (1997) From BRCA1 to RAP1 a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. FEBS Lett. **400**:25-30

Huyton, T., Bates, P.A. , Zhang, X.D., Sternberg, M.J.E. y Freemont, P.S. (2000) The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. Mutat. Res.—DNA Repair **460:**319-332

Lee, J.Y., Chang C., Song, H.K., Moon J., Yang J.K., Kim, H-K, Kwon, S-T. y Suh, S-W.(2000) Crystal structure of a NAD+ dependent DNA ligase: modular architecture and functional implications. EMBO **19:**1119-1129

Zhang, X., Morera, S., Bates, P. A., Whitehead, P. C., Coffer, A. I., Hainbucher, K., Nash, R. A., Sternberg, M. J. E., Lindahl, T. y Freemont, P.(1998) Structure of an Xrcc1 Brct Domain: A New Protein-Protein Interaction Module. Embo J. **17**:6404-6411

Williams RS, Green R y Glover JN. (2001) Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. Nat. Struct. Biol. **8:**838-842

Krishnan, V.V., Thornton, K. H., Thelen, M.P. y Cosman, M. (2001) Solution Structure

and backbone dynamics of the human DNA Ligase IIIa BRCT Domain, Biochem. **40:**13158-13166

Dulic,A., Bates, P., Zhang, X., Martin, S., Freemont, P., Lindahl, T. y Barnes, D. (2001) BRCT domain interactions in the heterodimeric DNA repair protein XRCC1-DNA ligase III. **40:**5906-5913

Shaw, A. y Bott, R. (1996) Engineering enzymes for stability. Curr. Op. in Struc Biol **6:**546-550

Yoshio, M. y Swensen, J. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Sci. **266**:66-71

Baer, R. (2001) With the ends in sight: images from the BRCA1 tumor suppressor. Nat. Struct. Biol. **8:**822-824

Holt JT, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C, Arteaga CL, King MC y Jensen RA. (1996) Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. Nat Genet **12:**298-302

Scully, R.(1997) BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. **94:**5605-5610

Scully,R. y Puget,N. (2000) BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer Biochimie **84:**95-102

Elledge, H. y Harper, J. (1998) The role of protein stability in the cell cycle and cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Reviews on Cancer **1377:**M61-M70

Partridge AW, Therien AG y Deber CM. (2004) Missense mutations in transmembrane domains of proteins: phenotypic propensity of polar residues for human disease. Prot **1:**648-656

Baase WA, Eriksson AE, Zhang XJ, Heinz DW, Sauer U, Blaber M, Baldwin EP, Wozniak JA y Matthews BW. (1992) Dissection of protein structure and folding by directed mutagenesis. Faraday Discuss. **93:**173-181

Tang K, Guralnick B, Wang W, Fersht A y Itzhaki L. (1999) Stability and folding of the tumor suppressor protein p16. J of Molec Biol. **285:**1869-1886

Ferrer-Costa, C., Orozco, M y De la Cruz, X. (2002) Characterization of Disease-associated Single Amino Acid Polymorphisms in Terms of Sequence and Structure Properties. J of Molec. Biol. **315:**771-786

Perutz, M (1992) Protein structure: New approaches to disease and therapy, W.H. Freeman and Company, New York.

Zuckerkandl, E. y Pauling, L. (1962) Molecular disease evolution and genetic heterogeneity. In Horizons in Biochemistry .Marsha, M. & Pullman, B., ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y. pp. 189-225.

Terp, B., Cooper, D., Christensen, I., Jorgensen, F., Bross, P., Gregersen, N., y Krawczak, M. (2002) Assessing the relative importance of biophysical properties of aminoacid substitutions associated with human genetic disease. Hum Mut **20:**98-109

Bullock A, Henckel J, DeDecker B, Johnson C, Nikolova P, Proctor M, Lane P. y Fersht A. (1997) Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94:**14338-14342

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

Yamane, K. (1999) Conserved BRCT regions of TopBP1 and of the tumor suppressor BRCA1 bind strand breaks and termini of DNA. Oncog. **18:**5194-5203

Thornton KH, Krishnan VV, West MG, Popham J, Ramirez M, Thelen MP, y Cosman M. (2001) Expression, purification, and biophysical characterization of the BRCT domain of human DNA ligase IIIalpha. Protein Expr Purif **21:**401-411

Jaenicke, R. (2000) Stability and stabilization of globular proteins in solution J of Biotech **79:**193-203

Chakravarty, R. y Varadarajan, R. (1999) Residue depth: a novel parameter for the analysis of protein structure and stability. Structure **14:**723-732

Lee, B. y Vasmatzis, G.(1997) Stabilization of protein structures. Current Op in Biotech **8:**423-428

Cross, J., Kai Chang, T. y Hendrix, D. Graphical Representations of Algorithms,Structures. Crosstalk, Jan 1996. http://www.stsc.hill.af.mil/crosstalk/1996/01/graspada.asp

Harpaz, Y., Gerstein, M. y Chothia, C. (1994) Volume changes on protein folding .Struct. **2:**.641-649

Birnboim, H. y Doly, J., (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids Research **7:**1513-1523

Schagger, H. y Von Jagow, G. (1987) Tricina-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamida gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. **166:**368-379

Gill S.C. y Von Hippel P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal. Biochem. **182:**319-326

Tasayco, ML., Fuchs, J., Yang, X., Dyalram, D. y Georgescu, R. (2000) Interaction between teo discontinuos chain segments from the B-sheet of Escherichia coli Thiorodoxin suggest an initiation site for folding. Biochemistry, **39:**1613-1618.

Andrade, M.A., P. Chacón, J.J. Merelo y F. Morán. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. Prot. Eng. **6:**383-390

Georgescu, R., Garcia-Mira, M., Tasayco, M. y Sanchez-Ruiz, J. (2001) Heat capacity analysis of oxidazed Escherichia coli thiorodoxin fragments (1-73,74-108) and their no covalent complex. Eur. J. Biochem. **268:**1477-1485

Heinz DW, Baase WA y Matthews BW. (1992) Folding and function of a T4 lysozyme containing 10 consecutive alanines illustrate the redundancy of information in an amino acid sequence. Proc Natl Acad Sci U S A. **89:**3751-3755

Merelo, J., Andrade, M., Prieto, A. y Morán, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. Prot Eng.. **6:** 383-390

Zhou Y, Wen J. y Bowie J. (1997) A passive transmembrane helix. Nat. Struct Biol **4:**986-990

Wen J., Chen X y Bowie JU (1996) Exploring the allowed sequence apace of a membrane protein. Nat Struct Biol **3:**141-148

Frillingos S, Sahin-Toth M, Wu J y Kaback HR. (1998) Cys scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. FASEB J **12:**1281-1299

Matthews BW. (1996) Structural and genetic analysis of the folding and function of T4 lysozyme. FASEB J **10:** 35-41

Antonarakis SE, Krawczak M. y Cooper DN. (2000) Disease-causing mutations in the human genome. Eur J Pediatr **159:**173-178

Gregersen N, Bross P, Jorgensen M., Corydon T. y Andresen B. (2000) Defective folding and rapid degradation of mutant proteins is a common disease mechanism in genetic disorders. J Inherit Metab Dis **23:**441-447

De la Mata, I., Garcia, J., Gonzalez, C., Menendez, M., Canada, J., Jimenez-Barbero, J. y Asensio, J. (2002) The impact of R53C mutation on the three-dimensional structure, stability, and DNA-Binding properties of the Human Hesx-1 Homeodomain. Chembiochem **3:**726-740

Bross P, Corydon Tj., Andresen BS, Jorgensen MM, Bolund L. y Gregersen N. (1999) Protein misfolding and degradation in genetic diseases. Hum Mutat **14:**186-198

Spector S, Wang M, Carp S, Robblee J, Hendsch Z, Fairman R, Tidor B y Raleigh. (2000) Rational modification of protein stability by mutation of charged surface residues. Biochem **39:**872-879

Rohl C, Fiori W y Baldwin R. (1999) Alanine is helix-stabilizing in both template-nucleated and standard peptide helices. Proc Natl Acad Sci USA **96:**3682-3687

MacArthur MW y Thornton JM. (1991) Influence of proline residues on protein conformation. J Mol Biol **218:** 397-412

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

Muñoz,V., Cronet,P., López-Hernández,E. y Serrano,L. (1996) Analysis of the effect of local interactions on protein stability Folding & Design **03:**167-178

Sambrook, (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US. A2.2-A3

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

APÉNDICES

Apéndice 1. Medios de cultivo

(*) **Si medio sólido es requerido, se emplea la misma receta agregando 20 gramos de Bactoagar por litro de medio.**

LB (*) (53)

Bactotriptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de Sodio	10 g
Ajustar a pH 7.5 con Hidróxido de Sodio	
Agua destilada en cantidad suficiente para 1 litro	

TB (53)

Agua destilada	900 ml
Bactotriptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 ml
Autoclavar y dejar enfriar hasta 60 C	
Agregar 100 ml de buffer fosfato autoclavado	

Para un litro de Buffer fosfato:

Fosfato de potasio monobásico: 23.1 g

Fosfato de potasio dibásico : 125.4 g

Autoclavar

2xYT (*) (53)

Bactotriptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Cloruro de Sodio	10 g
Agua destilada en cantidad suficiente para 1 litro	

Apéndice 2. SDS PAGE (33)

- **Buffer para el Ánodo (+):** 200 mM Tris pH 8.9 (diluido de una solución 10X stock)
- **Buffer para el cátodo (-):** 100 mM Tris/100 mM Tricina/0.1% SDS (no necesita ajustar pH, es aproximadamente 8.25, también puede ser diluido de una solución stock 10X)
- **Gel Buffer**: 3.0 M Tris, pH 8.45/0.3% SDS
- **Proporción de Acrilamida/bis en el gel de Apilamiento :** 48% acrilamida/1.5% bis-acrilamida
- **Proporción de Acrilamida/bis en el gel de Separación :** 46.5% acrilamida/1.5% bis-acrilamida
- **Buffer de muestra:**Para 20 ml (2X)

5 ml 0.5 M Tris, pH 6.8

4 ml 20% SDS

1 ml 2-mercaptoetanol

4 ml 50% glicerol

0.004 g azul de bromofenol

"Programa Cybertesis PERÚ - Derechos son del Autor"

6 ml agua

Geles:

· Gel de Separación:

10% gel

1.22 ml acrilamida

2 ml gel buffer

2 ml 50% glicerol

0.78 ml agua

75 ul 10% persulfato de amonio

7.5 ul TEMED

· Gel de apilamiento:

0.25 ml acrilamida

0.75 ml gel buffer

2.0 ml agua

20 ul 10% persulfato de amonio

2 ul TEMED