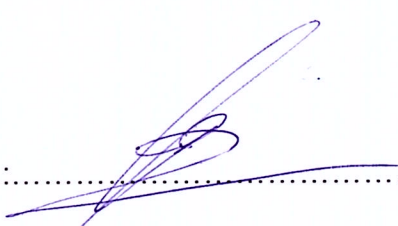


Anexo 1

ENTREGA DE COPIA DIGITAL DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER / TRABAJO FIN DE GRADO / PROYECTO FIN DE CARRERA

1.	Datos del alumno/a y del trabajo	
Apellidos, Nombre: <i>BACARIZO ROA, JULIO LUIS</i>		
DNI: <i>75720639-Q</i>		
E-Mail: <i>brj824@alboran.uae.es</i>		Tfno.: <i>605841575</i>
Grado/Máster/Titulación (Indicar especialidad, en su caso) <i>MASTER EN QUÍMICA AVANZADA APLICADA</i>		
Título del Trabajo: <i>Cambios conformacionales de la B-ficocitina de Porphyrisium cruentum en función del pH</i>		
Fecha de entrega: <i>25/06/12</i>		
Director/Tutor (es): <i>ANA CÁMARA ARTIGAS, EMILIA GORTIZ SALMERÓN</i>		

2.	El alumno/a firmante ha realizado la entrega de una copia digital de su trabajo para su depósito en la Biblioteca Universitaria, AUTORIZANDO a:	
Su difusión en acceso libre (Marcar con una X lo que corresponda)	SI <input checked="" type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>

*Fdo.: 

*Este formulario, debidamente cumplimentado y firmado (con firma digital o en su defecto, con firma manuscrita y escaneo del documento), deberá ser entregado por el alumno en formato pdf en el mismo soporte digital, junto con el resto de archivos integrantes del trabajo.

MASTER EN QUÍMICA AVANZADA APLICADA

TRABAJO FIN DE MASTER (UNIVERSIDAD DE ALMERÍA)

CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LA B-FICOERITRINA DE *PORPHYRIDIUM* *CRUENTUM* EN FUNCIÓN DEL pH

ALUMNO:

Julio Luis Bacarizo Roa

Ldo. en Ingeniería Química

Tutor:

Prof.Dr.D.^a Ana Cámara Artigas

Profesora Titular del Área de Química

Física, Bioquímica y Química Inorgánica.

Facultad de ciencias experimentales.

Universidad de Almería.

Tutor:

Prof.Dr.D.^a Emilia Ortiz Salmerón

Profesora del Área de Química

Física, Bioquímica y Química

Inorgánica. Facultad de ciencias

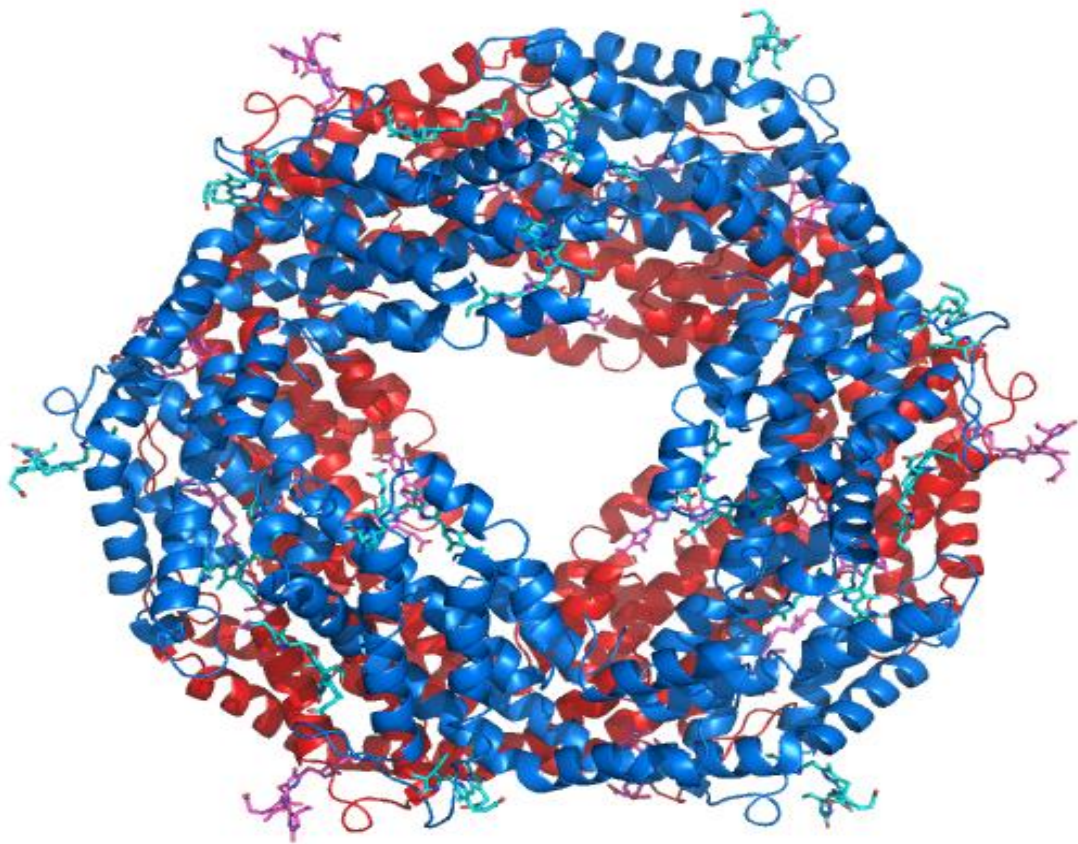
Experimentales. Universidad de

Almería.

2012

UNIVERSIDAD DE
ALMERÍA

JULIO BACARIZO ROA
CONVOCATORIA DE
DEFENSA: 29/06/12



[CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LA B-FICOERITRINA PROCEDENTE DE *PORPHYRIDIUM CRUENTUM* EN FUNCIÓN DEL pH]

Línea de investigación: Estructura de proteínas

Master en Química avanzada aplicada, Tutores: Ana Cámara Artigas, Emilia Ortiz Salmerón.

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

ÍNDICE

	Página
Índice.	
Apéndice de tablas.	
Apéndice de figuras.	
1. Introducción	3
1. Las ficoeritrinas. Descripción y función.	3
2. Estructura de ficoeritrinas.	6
2. Objetivos y Plan de trabajo	11
2.1. Objetivos	11
2.1.1. Determinar la estructura de la beta-ficoeritrina de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i> .	11
2.1.2. Caracterizar sus propiedades espectroscópicas a diferentes pHs.	11
2.2. Plan de trabajo	11
2.2.1. Buscar las condiciones más adecuadas para cristalizar la proteína.	11
2.2.2. Optimizar las condiciones de cristalización.	11
2.2.3. Medir el patrón de difracción.	11
2.2.4. Analizar los datos.	11
2.2.5. Resolver la estructura mediante reemplazamiento molecular.	11
2.2.6. Análisis de la estructura.	11
2.2.7. Análisis espectroscópico: UV-visible, fluorescencia y CD.	11
3. Materiales y métodos.	15
3.1. Determinación de la estructura de proteínas mediante difracción de rayos X.	15
3.1.1. Cristalización de proteínas.	18
3.1.2. Medida del patrón de difracción.	21

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

3.1.3. Resolución estructural.	22
3.2. Técnicas espectroscópicas.	24
3.2.1. Espectroscopia UV-VIS.	24
3.2.2. Fluorescencia.	24
3.2.3. Dicroísmo circular.	27
4. Resultados y conclusión.	31
4.1. Cristalización de la proteína.	31
4.1.1. Medidas de los cristales.	32
4.1.2. Análisis de los datos.	32
4.2. Resolución de la estructura.	33
4.2.1. Descripción de la estructura.	34
4.2.2. Descripción de los cromóforos.	37
4.3. Cambios conformacionales con el pH.	38
4.3.1. Efecto del pH en las propiedades espectroscópicas.	40
5. Conclusiones.	49
6. Bibliografía.	53

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

Figura	página
1	4
2	7
3	15
4	16
5	17
6	18
7	19
8	21
9	21
10	23
11	28
12	31
13	32
14	35
15	35
16	36
17	37
18	38
19	39
20	40
21	41
22	42
23	43
24	45
25	46

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Las ficoeritinas. Descripción y función.

1.1.1- Origen de los ficobilisomas (PBS)

Los primeros organismos con capacidades fotosintéticas primitivas en la tierra datan de más de 3,5 billones de años, y la aparición de organismos procariotas generadores de oxígeno entre 0,5 y 1 billón de años. Algunas cianobacterias actuales parecen tener su origen en estos organismos. El aparato fotosintético de las cianobacterias podría representar una aproximación a estos primeros sistemas generadores de oxígeno. Estos microorganismos parecen ser los responsables de la alteración en la composición química de la tierra, que generaron grandes cantidades de oxígeno en la atmósfera, impidiendo el desarrollo de las especies anaeróbicas. Con el tiempo, estas especies primitivas evolucionaron, fusionándose endosimbióticamente con organismos unicelulares no fotosintéticos, hacia las especies eucariotas fotosintéticas más avanzadas.

La mayor diferencia en el sistema fotosintético de las cianobacterias y algas rojas en comparación con las bacterias anaeróbicas más antiguas (rama proclorofitas), las algas verdes más avanzadas y las plantas superiores, es la presencia de una de los mayores complejos, que actúan de antena, encontradas en los organismos fotosintéticos, los ficobilisomas (PBS). El término PBS fue acuñado en base al tamaño y forma de dicho complejo proteico observado por microscopía electrónica (Gantt & Conti, 1966). Las imágenes generadas por microscopía electrónica mostraban una serie de grandes gránulos alineados regularmente en las membranas tilacoides de diferentes cianobacterias y algas rojas. Estos gránulos son el doble de grandes que los ribosomas pero con forma muy similar. Los componentes del PBS atrajeron pronto la atención de los biólogos debido a su color brillante, obteniéndose los primeros cristales de una PBP (ficobiliproteína) a finales del siglo XIX (Cramer et al. 1862; Molisch, 1894; Molisch, 1895).

El PBS sirve como recolector de energía solar en la zona espectral de absorción de la clorofila (500-660 nm), lo que permite que las especies que contengan este tipo de antenas proteicas puedan utilizar todo el intervalo de luz visible de la luz solar. Todos los complejos de PBS parecen contener dos subestructuras, un núcleo estructural cercano a la superficie de la membrana y una serie de "varillas" que emanan fuera de este núcleo (Glacer, 1985; Glacer 1989; Huber 1989; MaColl 1998). Ambas estructuras contienen subunidades que unen covalentemente los pigmentos recolectores de luz (pigmentos de tetrapirrol) y otras subunidades adicionales que carecen de pigmentos llamadas proteínas de enlace. Dentro de

las cianobacterias y algas rojas, el número de componentes del núcleo y las "varillas" es variable, pero se cree que comparten similitudes estructurales que controlan la formación del PBS (Anderson & Toole, 1998).

A diferencia de los centros de reacción fotosintéticos, hoy en día no hay evidencias bioquímicas o estructurales de precursores del PBS. Un análisis filogenético (Apt et al., 1995) ha trazado la evolución de diferentes subunidades a un antecesor primario el cual podría ser el precursor de todas las proteínas de tipo globulina (Schirmer et al., 1985; Pastore & Lesk, 1990).

Se han descrito cuatro grandes grupos de proteínas en los PBS: APC (aloficocianina, $\lambda_{\max}=652$ nm) en los núcleos; PC (Ficocianina, $\lambda_{\max}=620$ nm) en las "varillas", cerca del núcleo; PE (Ficoeritrina, $\lambda_{\max}=560$ nm) y PEC (Ficoeritrocianina, $\lambda_{\max}=575$ nm) en las "varillas", alejadas del núcleo (Figura1). La disposición de las diferentes proteínas de PBS crean un gradiente de energía desde PE o PEC a través de PC a APC y descendiendo en el lecho de clorofila donde está el centro de reacción fotosintética ($\lambda_{\max}=670-680$ nm). Las máximas longitudes de onda de absorción señaladas anteriormente, se deben a los máximos de absorción de los pigmentos de bilina unidos a la unidad mínima de PBP (complejo heterodimérico $\alpha\beta$, denominado monómero). Dos de las bilinas se encuentran unidas a través de las cisteínas conservadas en la posición 84. Los diferentes tipos de bilinas incluyen la ficocianobilina (PCB, encontrado en PC, PEC y APC), ficoeritrombilina (PEB encontrado en PEs), ficoviolobina (encontrado solo en PEC) y ficourobilina (en algunos PEs).

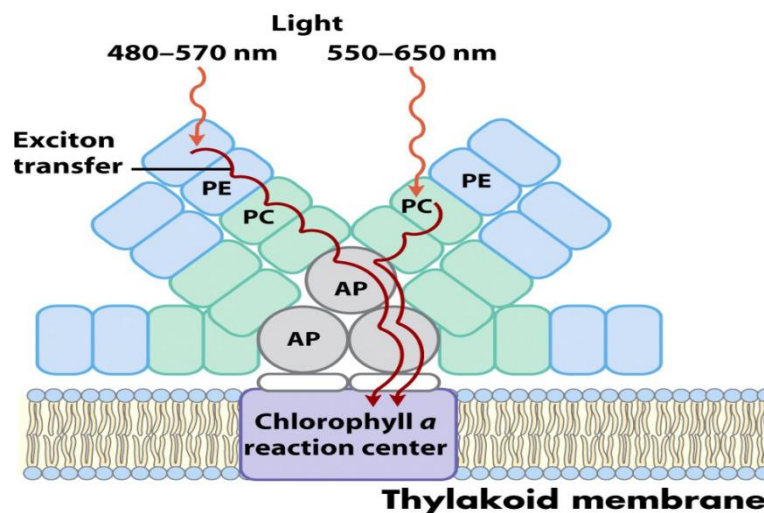


Figura 1: Descripción esquemática del ficobilisoma

1.1.2. Transferencia de energía dentro del PBS

La transferencia de energía dentro de las subunidades de PBS y de subcomplejos se ha medido por una variedad de técnicas espectroscópicas (Sauer & Scheers 1988). Las tasas de velocidad de transferencia de energía son muy altas (Knox, 1999) y el rendimiento cuántico

total es muy elevado (sobre el 95%) (Searle et al., 1978; Glazer 1989; MacColl 1998). Esta propiedad es común para todos los complejos de antena fotosintéticos, debido posiblemente a la optimización de las distancias y orientaciones entre cofactores. En el caso de los PBS la situación es diferente, puesto que las distancias entre cofactores son relativamente grandes a diferencia de los sistemas de antena de clorofila, como el LH1 y LH2 de la bacteria púrpura (Koepeke et al., 1996; Prince et al., 1997; Roszak et al., 2003), LHCII de plantas (Kuhlbrandt and Wang 1991; Liu et al. 2004) y en antenas internas y externas del PSI y PSII en cianobacterias y plantas (Jordan et al., 2001; Zouni et al., 2001; Ben-Shem et al., 2003; Kamiya and Shen 2003).

En las antenas de clorofila, las distancias entre cofactores adyacentes están lo suficientemente cerca para imaginar la interacción cercana de anillos de absorción. En el complejo bacteriano LH2, los dos anillos de bacterioclorofilas están espaciados por 9 Å y 20 Å de centro a centro respectivamente y la distancia entre anillos es de 20 Å. La adición de moléculas de carotenoide hace que esta antena sea bastante densa en cofactores. En el interior de las antenas de PSI y PSII hay muchas moléculas de clorofila posicionadas en una disposición muy complicada que pueden ser separadas en dos grupos en cada cara de la membrana. El sistema más denso de clorofilas es el clorosoma encontrado en la bacteria del sulfuro verde (*Chloroflexaceae*) y en la bacteria filamentososa verde (*Chloroflexaceae*) en la cual un orgánulo entero engloba miles de moléculas de pigmento empaquetados muy próximos sin la intervención de subunidades proteicas (Frigaard et al., 2001; Vassilieva et al., 2002; Montano et al., 2003). Aunque las estrategias de captación de energía solar son muy diferentes, existen similitudes entre el PBS y el clorosoma. Dentro de cada unidad de ficocianina, las distancias entre el $\alpha 84$, $\beta 84$ y las bilinas $\beta 115$ es de 50 Å. La asociación de monómeros de ficocianina en trímeros y hexámeros permite un ligero descenso de las distancias entre algunas bilinas seleccionadas, pero ninguna está más cerca de los 20 Å (Schirmer et al. 1986; Nield et al. 2003). En hexámeros de PE que contienen 5 bilinas por monómero, la densidad es algo mayor. Así se puede asumir que la eficiencia de la transferencia energética no requiere el empaquetamiento de cofactores. El mecanismo central para la transferencia de energía requiere la existencia de acoplamiento débil entre cromóforos cercanos en niveles de energía electrónicos (Foster, 1948). Las medidas de la velocidad de transferencia de energía en PC aislados estaban entre 50 y 500 ps para diferentes rutas dentro del monómero ($\alpha\beta$) (Debreczeny et al., 1993). La formación del trímero ($\alpha\beta$)₃ permitió incrementar la velocidad de transferencia energética a 0.5-1 ps (Beck & Sauer, 1992), mostrando la importancia de la formación del complejo cuando se trata de las características funcionales del PBS. Todavía no está claro el efecto que tendrá la agregación hacia cilindros

completos, núcleos o PBSs en la velocidad de transferencia de energía, especialmente debido a la intervención de proteínas de enlace.

1.2. Estructura de las ficoeritrinas.

1.2.1.- B-Ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum*

El color característico de las cianobacterias procariotas (alga azul-verde) y del alga roja (Rodofita) es debido en gran medida a la presencia de pigmentos fotosintéticos. Estos pigmentos (las ficobiliproteínas) son proteínas con grupos prostéticos lineales de tetrapirrol (bilinas), que en su estado funcional, están unidos covalentemente a cisteínas específicas de las proteínas. Estas proteínas se pueden dividir en tres clases principales, dependiendo de sus propiedades de absorción: ficoeritrinas (λ_{\max} 540-570 nm), ficocianinas (λ_{\max} 610-620 nm) y aloficocianinas (λ_{\max} 650-655 nm). Las microalgas son las fuentes más usuales de estos componentes, especialmente el alga roja *Porphyridium cruentum* que contiene cuatro biliproteínas: aloficocianinas (5%), R-ficoeritrina(11%), b-ficoeritrina(42%) y B-ficoeritrina(42%).

Los espectros de absorción de la B-ficoeritrina son debidos a la presencia de dos grupos cromóforos unidos covalentemente a la apoproteína: ficourobilina (PUB) que presenta un hombro a 498 nm y la ficoeritrobilina (PEB) que presenta su máxima absorción entre 540-565 nm. De forma parecida a otras ficobiliproteínas, la B-ficoeritrina consiste en dos cadenas polipeptídicas diferentes, α y β de un tamaño aproximado de 17-20 kDa con una estequiometría 1:1. En las ficoeritrinas B y R, el tercer tipo de polipéptido que forma la proteína es una subunidad γ con una masa molecular aparente de 30-33 kDa y contiene grupos cromóforos. La estructura resultante es $(\alpha\beta)_6\gamma$, con forma de disco muy estable. Para la B-ficoeritrina, las subunidades α y β han sido muy bien caracterizadas. La cadena α contiene dos grupos cromóforos PEB y la subunidad β está conectada con otros tres grupos cromóforos. El número de grupos cromóforos prostéticos unidos a las subunidades γ de la B-ficoeritrina es igual a cuatro, dos PUB y dos PEB. Comparado con el PUB, el PEB contiene un doble enlace adicional entre los anillos A y B (Figura 2). La aparición de PUB en la subunidad γ incrementa el intervalo de luz visible que puede ser absorbida en el alga roja y por lo tanto aumentar su capacidad de captar el espectro completo de luz. Además, se ha propuesto que esta subunidad ayudaría a prevenir el daño en los centros de reacción a causa del exceso de energía de excitación *in vivo*.

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

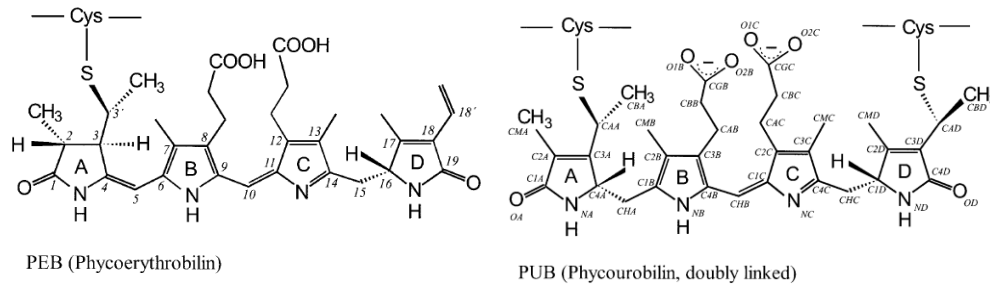


Figura 2.- Estructura química de los dos cromóforos de bilina PEB y PUB

Se han resuelto mediante cristalografía de rayos X las estructuras de las subunidades α y β de varias ficobiliproteínas (Adir, 2005). En todas esas estructuras, las proteínas forman hexámeros $(\alpha\beta)_3$ equivalentes a los descritos en los ficobilisomas. Además, se ha encontrado en algunas estructuras cristalográficas la subunidad γ en el centro del hexámero en un grupo espacial R3. La disponibilidad de estructuras de ficobiliproteínas a diferentes valores de pH puede ayudar a explicar los cambios conformacionales durante la transferencia de energía.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. Objetivos y Plan de trabajo

Los objetivos principales de este trabajo son:

- 1.- Determinar la estructura de la beta-ficoeritrina de la microalga *Porphyridium cruentum*.
- 2.- Caracterizar sus propiedades espectroscópicas a diferentes pHs.

El plan de trabajo se ha centrado en las siguientes tareas:

1. Buscar las condiciones más adecuadas para cristalizar la proteína.
2. Optimizar las condiciones de cristalización.
3. Medir el patrón de difracción.
4. Analizar los datos.
5. Resolver la estructura mediante reemplazamiento molecular.
6. Análisis de la estructura.
7. Análisis espectroscópico: UV-visible, fluorescencia y CD.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos.

3.1. Determinación de la estructura de proteínas mediante difracción de rayos X.

La obtención de modelos moleculares tridimensionales de proteínas por la técnica de cristalografía de Rayos X es una de las herramientas físicas más potentes que existen actualmente para la resolución de problemas estructurales de la materia sólida ordenada. A continuación se muestra un esquema (Figura 3) donde se pueden ver los pasos que habría que dar para poder obtener el tan deseado modelo molecular, desde la purificación y producción de proteína, cristalización, difracción de rayos X, obtención de las fases y factores de estructura, refinamiento, validación y cálculo del modelo final para interpretar dichos resultados.

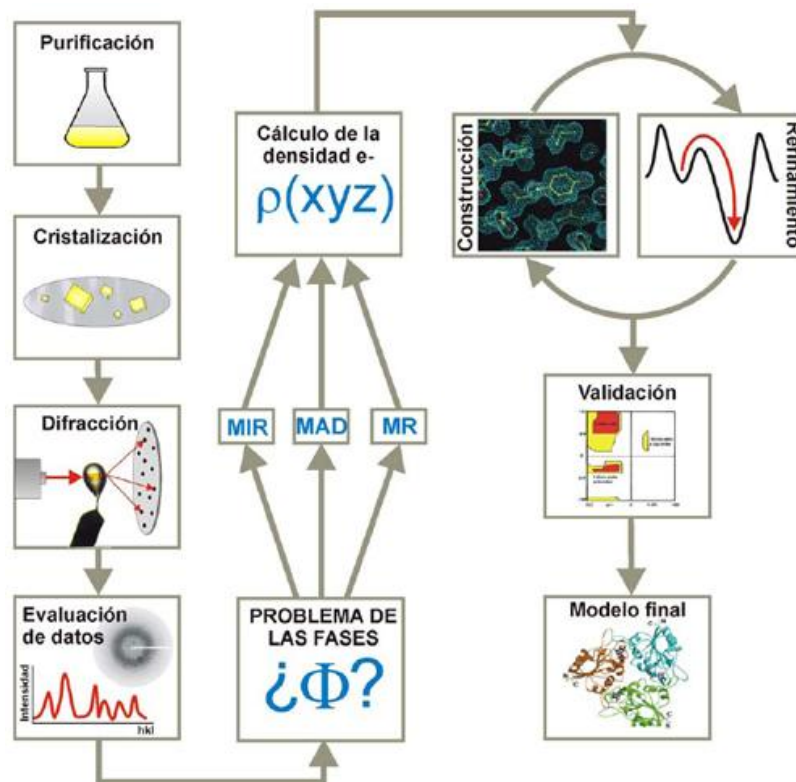


Figura 3. Esquema de las etapas básicas para la resolución estructural mediante cristalografía de rayos X

Cualquier entidad que se encuentre ordenada en un espacio cristalino presenta un orden de sus elementos internos (iones, átomos o moléculas) siguiendo un modelo de repetición periódica. En los cristales de proteína, estos componentes se repiten desde pocos Å hasta las centenas de Å, y esa repetitividad característica en tres dimensiones, constituye lo que se denomina red cristalina. El conjunto mínimo que se repite, ordenadamente en las tres

direcciones de espacio y genera todo el cristal, se conoce con el nombre de celdilla elemental o celdilla unidad. Las tres traslaciones independientes forman un prisma definido por tres ejes (a, b, c), y tres ángulos interaxiales (α, β, γ), que constituyen los parámetros de la celda unidad (Figura 4).

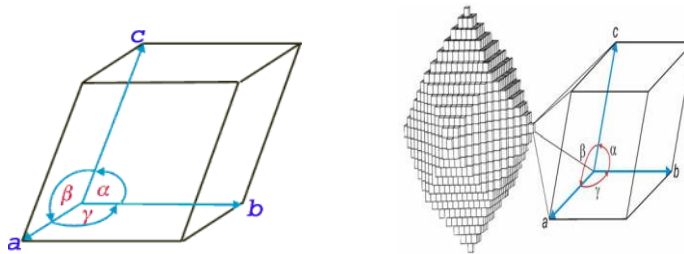


Figura 4. Celdilla unidad. Los ejes deben cumplir la igualdad del producto vectorial $a \times b = c$. El apilamiento de celdillas forma el cristal (Gómez-Moreno et al., 2003).

Además de las repeticiones de traslación, que exhiben los cristales en las tres dimensiones del espacio y que definen la red, existen otras operaciones de repetición, denominadas elementos de simetría, que provocan repeticiones dentro de la celdilla unidad. Así, los ejes de simetría (binarios, ternarios, cuaternarios y senarios) provocan repeticiones por giros ($180, 120, 90$ y 60° respectivamente). Los planos de simetría originan la misma repetición que ocurre cuando uno se mira en un espejo, provocando una imagen (esta vez real) no superponible denominada enantiómero y del mismo modo actúa el denominado centro de simetría. Otros elementos de simetría en los cristales resultan de la combinación de ejes y planos de simetría con operaciones de traslación, dando lugar a nuevos elementos de simetría, denominados ejes helicoidales y planos de deslizamiento. Se define, por tanto como unidad asimétrica al conjunto mínimo de moléculas cuya repetición (mediante la aplicación de los elementos de simetría) genera la totalidad del contenido de la celdilla elemental, cuyo apilamiento en las tres direcciones del espacio genera el cristal.

La combinación de los elementos de simetría presentes en los cristales y los distintos tipos de celdilla posibles da lugar a los denominados grupos espaciales, que representan las 230 maneras diferentes en las que un motivo (una o varias moléculas) pueden repetirse en el espacio tridimensional. El conjunto de elementos de simetría de un objeto finito, que pasan por un punto, definen la simetría total del objeto y se denominan grupo puntual de simetría. Grupos puntuales hay muchos, pero en los cristales han de ser compatibles con la periodicidad (repetitividad por traslación) que los describe internamente. Así, en los cristales no son posibles las rotaciones (ejes de simetría) de orden 5 (un objeto que se repita a sí mismo, mediante giro, 5 veces). Con todo ello, en los cristales nos encontramos con sólo 32 grupos

puntuales posibles, que se denominan clases cristalinas. A su vez, en los cristales, las formas de repetición por traslación tienen que ser compatibles con la simetría puntual (las 32 clases cristalinas), de modo que sólo nos encontramos con 14 tipos de redes de traslación que son compatibles con las clases cristalinas. A estos tipos de redes (modos de repetición por traslación) de los cristales se les llama también redes de Bravais. La representación de éstas las encontramos en la Figura 5. Así, cuando se combinan los 32 grupos puntuales de simetría con los elementos de simetría traslacional y las 14 redes de Bravais se obtienen los 230 grupos espaciales de simetría posibles ya comentados anteriormente.

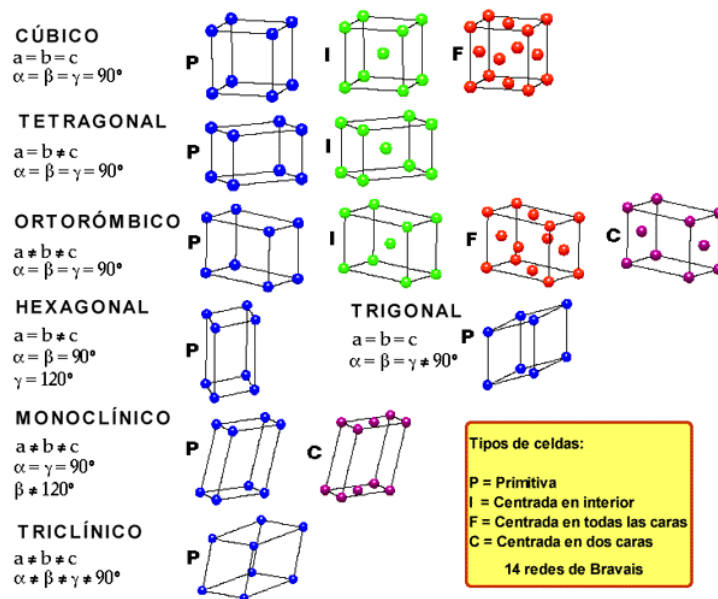


Figura 5. Representación de las 14 redes de Bravais en los 7 sistemas cristalinos.

La difracción de Rayos X es el fenómeno físico fundamental a través del cual se manifiesta la interacción de los rayos X con los cristales. Cuando un haz de rayos X incide sobre un cristal, este interacciona con los electrones de los átomos que componen el cristal, haciéndolos vibrar acopladamente con las variaciones periódicas de su campo eléctrico. Los electrones oscilantes se convierten así en focos de nueva radiación de Rayos X que se emite en forma esférica, fenómeno que llamaremos dispersión, normalmente elástica. Los rayos X dispersados por los electrones interfieren. Estos rayos X dispersados por los electrones interfieren entre sí, pudiéndose dar interferencias destructivas. Sin embargo, como los átomos en un cristal están ordenados de un modo regular y periódico, también ocurre que en determinadas direcciones, las ondas interfieren constructivamente, reforzándose, dando lugar al fenómeno de dispersión cooperativa o difracción.

Para describir el fenómeno de la difracción se puede hacer uso de modelos físicos y geométricos, basados estos últimos en la ley de Bragg, que establece que la difracción de Rayos X en los cristales ocurre como si de una reflexión óptica se tratara. Para que se produzcan todos los haces difractados el cristal debe ser girado de tal modo que todos los planos virtuales se coloquen en la posición adecuada para cumplir la ley de Bragg. Este requerimiento se comprende mejor haciendo uso del concepto de la denominada red recíproca y del modelo de Ewald, que supone una simplificación del modelo de Bragg. En el modelo de Ewald se reemplaza cada familia de planos paralelos virtuales (planos de Bragg) por un punto geométrico (Figura 6). Para la identificación de cada una de las familias de estos planos se utiliza un triplete de números conocidos como los índices de Miller (h,k,l) donde cada uno de estos números corresponde al número de partes idénticas en que la familia de planos corta a los ejes de la celdilla elemental. Todas las familias de planos posibles definen una red de puntos llamada red recíproca que está rígidamente asociada con la red cristalina. El modelo de Ewald establece, que al girar el cristal, la difracción ocurrirá cuando cada uno de estos puntos recíprocos intersecte la superficie de una esfera virtual de radio igual al inverso de la longitud de onda (esfera de Ewald).

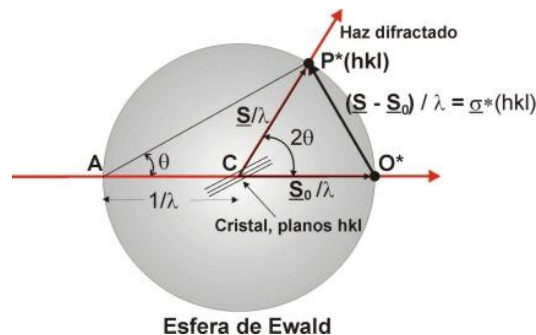


Figura 6. Esquema de la Esfera de Ewald

3.1.2. Cristalización de proteínas.

El primer paso para la determinación de la estructura tridimensional de cualquier molécula por difracción de rayos X es conseguir cristales adecuados para someterlos a difracción. Debemos tener en cuenta que los cristales de proteína no se forman con la misma facilidad que los de sal. Además, los cristales de proteínas difieren mucho de los cristales convencionales de moléculas pequeñas (como los compuestos orgánicos en general) o sales inorgánicas (como la sal común). Las características de los primeros están condicionadas por la naturaleza propia de estas macromoléculas. Así, debido al tamaño de las proteínas y a su esfera de solvatación, el volumen de la celdilla unidad suele ser bastante grande. Además, como las macromoléculas se empaquetan con baja densidad, al ordenarse en el cristal dejan

grandes canales constituidos por moléculas de agua desordenadas y el contenido en solvente suele ser elevado (50-70%) (Mathews, 1968). Por todo ello, las interacciones entre moléculas son muy pequeñas, de manera que los cristales son muy frágiles y, en ocasiones, suelen presentar un cierto grado de desorden.

Para producir cristales de cualquier compuesto, las moléculas en solución, en presencia de agentes precipitantes suaves, son conducidas a un estado de sobresaturación, estado termodinámicamente inestable, que posteriormente deriva en la aparición de una fase cristalina, de manera que las moléculas son llevadas a un equilibrio entre las fases sólida y líquida (Figura 7) (Ducruix & Giegé, 1992).

El proceso de cristalización se puede dividir en dos fases: la fase de nucleación (formación de los primeros agregados ordenados) y la fase de crecimiento del cristal (en donde el conjunto de interacciones atractivas entre las moléculas son máximas, y las repulsivas mínimas).

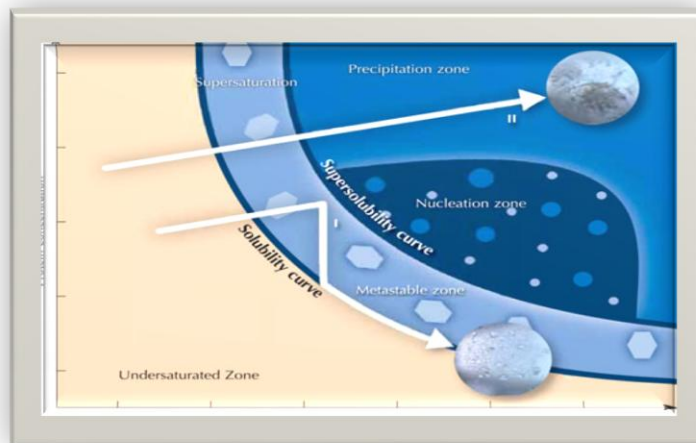


Figura 7. Descripción esquemática de un diagrama bidimensional de solubilidad, en el que se ilustra el cambio de concentración de proteína con la concentración de agente precipitante (Ducruix & Giegé, 1992).

Durante este proceso hay que superar una barrera energética, como ocurre en cualquier reacción química. En el caso de las proteínas, la superación excesiva del punto de saturación, sobre todo si sucede rápidamente, conlleva con gran frecuencia la precipitación de proteína en forma de agregados amorfos, no ordenados, que no son adecuados para los estudios de difracción. Por el contrario, si la sobresaturación es leve se alcanza un estado metaestable que no da lugar a núcleos cristalinos (a menos que se le aporte energía al sistema) pero que sería la zona ideal para el crecimiento de cristales sin nucleación de otros nuevos (Figura 7). Por tanto, la formación de cristales requiere alcanzar lentamente un grado limitado

de sobresaturación, para que se formen pocos núcleos, de manera que la masa proteica se invierta en el crecimiento de los cristales y así éstos adquieran un buen tamaño.

La cristalización es un proceso que depende de muchos parámetros químico-físicos que aún hoy en día no se han llegado a racionalizar y controlar totalmente, con lo que se puede considerar que este proceso es fundamentalmente empírico. La estrategia para alcanzar la sobresaturación consiste en empezar con una concentración elevada de proteína y aumentarla por eliminación gradual de agua, introduciendo además cambios que disminuyan la solubilidad de la proteína. Los factores manipulados usualmente que afectan la solubilidad de las proteínas son: el pH, la temperatura, la presencia o no de sales, la adición de solventes orgánicos, el uso de precipitantes poliméricos (los más usuales son los PEG) y la adición de ligandos específicos de la proteína.

Por tanto, el primer paso en cualquier proyecto cristalográfico con una proteína que no ha sido cristalizada con anterioridad es poner en marcha experimentos de búsqueda de condiciones en las que la proteína cristaliza. El número de factores a controlar es excesivo para realizar búsquedas sistemáticas en que se exploren todos los factores posibles. Por ese motivo, se han diseñado estrategias de muestreo, que utilizan matrices que exploran el espacio de cristalización. Varias empresas comercializan matrices de búsqueda, de las que probablemente las más utilizadas sean las matrices de Jancarik, comercializadas por la casa Hampton (Crystal Screen I, Crystal Screen II, Crystal Screen Lite), basadas en el rastreo de condiciones que han dado en el pasado resultados favorables. Una vez encontradas las condiciones óptimas de todas las probadas, se pasa a continuación a una optimización de las condiciones iniciales, realizando en primer lugar un rastreo sobre estas (variando un poco las condiciones) y probando la adición de diferentes aditivos.

Debemos tener en cuenta que a la hora de llevar a cabo el proceso de cristalización disponemos de diferentes métodos (Figura 8), estos son la difusión de vapor, la diálisis, la contradifusión a través de interfase o el denominado *microbatch*. La difusión de vapor es la técnica más ampliamente utilizada. En ella, una pequeña gota que contiene la solución de proteína y sustancia precipitante, se equilibra contra un reservorio que contiene la solución de precipitación a una concentración mayor que en la gota. El equilibrio se consigue por difusión de las especies volátiles (agua o solvente orgánico), hasta que la presión de vapor en la gota se iguala con la del reservorio. Existen principalmente dos modalidades: la modalidad de la gota colgante, donde la gota se deposita sobre un cubreobjetos siliconado, que luego se invierte y se utiliza para sellar un pocillo de una bandeja de cristalización. En la segunda alternativa, la modalidad de gota sentada, la gota se asienta sobre una elevación plana o cóncava situada por encima del nivel de la solución de cristalización.

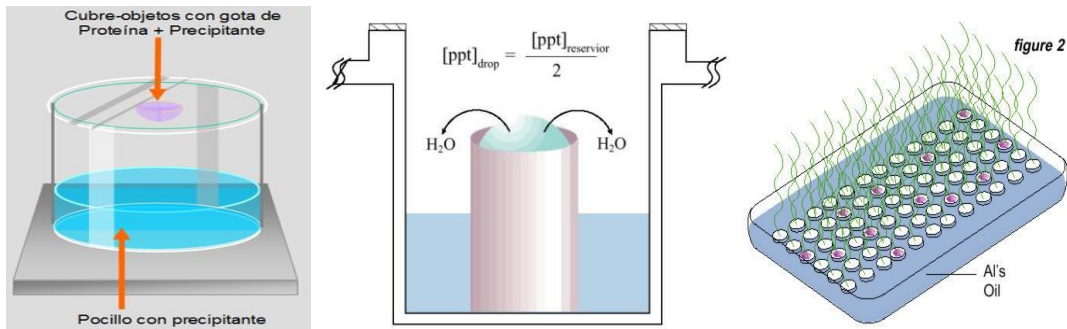


Figura 8. Técnicas de cristalización de proteína por difusión de vapor, gota colgante, gota sentada y micro batch.

En el caso de utilizar el método de la diálisis, de uso menos amplio, este se realiza generalmente en pequeños botones de diálisis que, tras cubrirse con una membrana de diálisis, se sumergen en la solución de cristalización, lo que permite que la solución de proteína alcance gradualmente la condición de sobresaturación. También, como ya se ha comentado anteriormente, se han desarrollado procedimientos de contradifusión en fase líquida o en gel, usualmente en capilares. Esta técnica está basada en la heterogeneidad de la mezcla de los reactivos fuera del equilibrio cuando ambos difunden en sentido contrario. El lento aporte de materia controlado por la difusión, hace que la sobresaturación aumente gradualmente, permitiendo que la nucleación de los cristales se produzca a sobresaturaciones tan bajas como se deseen con un aporte continuo de materia. La inestabilidad del sistema no es completamente aleatoria, ya que podemos ejercer un control sobre la amplitud de su desarrollo a partir de la propia configuración experimental y/o de las concentraciones iniciales (García-Ruiz et al., 1991). Una ventaja adicional de esta técnica es que, en general, no es necesario manipular los cristales para recoger datos de difracción.

3.1.3. Medida del patrón de difracción.

Una vez conseguidos los cristales de proteína adecuados, se procede a su medida. Para ello se hace incidir un haz monocromático de rayos X (con una longitud de onda alrededor de 1 Å) sobre un monocristal de la muestra en estudio, tal y como se muestra en la Figura 9.

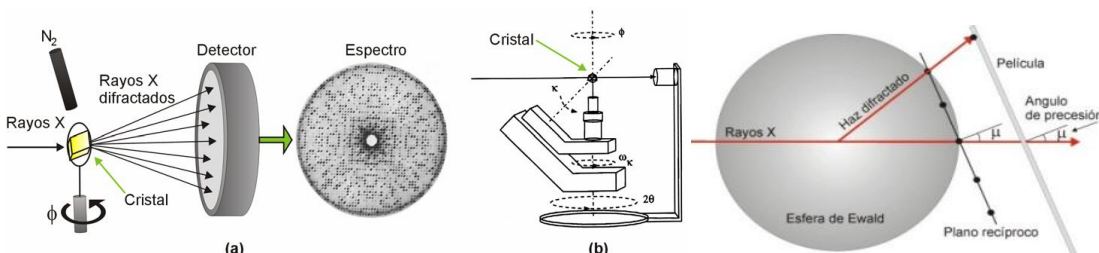


Figura 9. Esquema de un experimento de difracción de Rayos X

El espectro de difracción de rayos X obtenido mediante este experimento, contiene un patrón de intensidades correspondientes a los haces difractados por el cristal y la recogida de datos de difracción consiste en la medida de dichas intensidades y su disposición espacial respecto al sistema de referencia del laboratorio. El diseño experimental implica la toma de imágenes sucesivas, en un detector plano situado en la perpendicular del haz de rayos X, para distintas posiciones angulares del cristal, hasta obtener un conjunto de datos completo. Esto se consigue mediante oscilaciones simples del cristal (geometría Phi) o bien mediante una combinación de giros más complejos (geometría Kappa). Las medidas pueden realizarse en un difractómetro con fuente convencional o bien en una estación de radiación sincrotrón. Un sincrotrón es un acelerador de partículas en donde se genera radiación de diferentes longitudes de onda, entre ellas rayos X.

Los cristales de proteína, debido a las características especiales que presentan, sufren un gran deterioro al ser expuestos a la radiación. Así, la longitud de onda penetrante y la intensidad del haz, unidas a prolongados tiempos de exposición, provocan fenómenos de absorción que hacen que la muestra se caliente, generándose radicales libres en las moléculas de proteína y solvente, que, con el tiempo, dan lugar a daños irreparables en el cristal que redundan en la pérdida de orden interno. Por este motivo es conveniente enfriar el cristal durante el proceso de difracción (Garman & Schneider, 1997), mediante un flujo laminar de nitrógeno frío (120-100 K). Para hacer uso de la criocristalografía es necesario previamente bañar el cristal en una solución crioprotectora (glicerol, PEGs, etilenglicol, sacarosa, etc.) (McFerrin & Snell, 2002) para que las moléculas de agua no estructurales se reemplacen por las crioprotectoras, impidiendo así la formación de hielo y la consiguiente ruptura del cristal.

3.1.4. Resolución estructural.

El objetivo del estudio estructural es la determinación de la densidad electrónica para cada punto de la celdilla elemental cristalina. Para ello partimos de la información del espacio recíproco (espectro de difracción). La transformación del espacio recíproco al espacio cristalino (función de densidad electrónica) implica la resolución de una función denominada transformada de Fourier (Figura 10). En ella intervienen unas magnitudes denominadas factores de estructura ($F(h,k,l)$), definidos en cada punto del espacio recíproco (h,k,l) y que contienen la resultante, en esa dirección de la dispersión de los rayos X que, cooperativamente, emiten los electrones de todos los átomos contenidos en la celdilla elemental cristalina. Los factores de estructura son ondas y como tales, se pueden describir por sus módulos y fases respecto de un origen común de fases. Los módulos representan las amplitudes de los haces difractados y se obtienen directamente a partir de las intensidades

que se recogen del espectro de difracción. El problema lo presentan las fases, ya que no se pueden medir experimentalmente y será necesario recurrir a diferentes métodos para resolver el denominado problema de la fase. Una vez obtenidas las fases asociadas a cada factor de estructura se podrá resolver de inmediato la ecuación de la transformada de Fourier. Que nos proporcionará un mapa de densidad electrónica y por tanto la estructura.

$$\rho(xyz) = (1/V) \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \cos 2\pi(hx+ky+lz-\alpha(hkl))$$

Figura 10. Función de densidad electrónica. V es el volumen de la celdilla unidad y $\alpha(hkl)$ es la fase asociada al módulo del factor de estructura, $|F(hkl)|$.

El problema de la fase para cristales de proteínas puede resolverse mediante tres métodos:

1. Reemplazamiento isomorfo: introduciendo átomos altamente dispersores.
2. Dispersión anómala: introduciendo átomos dispersores anómalos.
3. Reemplazamiento molecular: haciendo uso de un modelo estructural de una proteína homóloga, previamente determinada.

Con cualquiera de estos tres métodos, podemos calcular unas fases iniciales, que junto con las amplitudes experimentales, nos permitirán calcular una función de densidad electrónica que está definida en cada punto de la celdilla. La representación gráfica de los valores de esta función da lugar a lo que se denomina mapa de densidad electrónica. Si la distribución de fases estimadas es correcta para el conjunto de módulos de los factores de estructura experimentales, el mapa mostrará zonas con densidad electrónica positiva sobre las cuales deberá acoplarse el esqueleto polipeptídico. Esta labor se realiza mediante programas gráficos y equipos informáticos que permiten trazar no solo la cadena de carbonos alfa sino las laterales. En la siguiente etapa, denominada refinamiento estructural se ajustan los parámetros estructurales para optimizar el acuerdo entre las observaciones y la predicción. Este proceso debe proporcionar un modelo geométrico de la proteína muy ajustado a las observaciones experimentales y consistente con criterios estereoquímicos establecidos, ausencia de choques entre cadenas, distancias y ángulos de enlace adecuados y parámetros térmicos razonables.

3.2. Técnicas espectroscópicas.

3.2.1. Espectroscopia UV-VIS.

El espectro electrónico implica transiciones entre diferentes estados o niveles energéticos de los electrones. La radiación electromagnética provoca una oscilación en los electrones en respuesta al campo eléctrico incidente. Si la frecuencia de oscilación inducida coincide con la diferencia energética entre dos estados electrónicos diferentes, la probabilidad de transición se vuelve alta. Las transiciones electrónicas dan lugar a las manifestaciones conocidas de la radiación electromagnética con la materia: el color, la visión y la conversión de la luz solar en energía en las plantas. Además, los experimentos de espectroscopia electrónica son muy simples y baratos de efectuar y se pueden hacer con gran precisión. Las energías implicadas en los tránsitos electrónicos corresponden a la absorción de fotones en la región visible (400-750 nm) y ultravioleta (200-400 nm) del espectro electromagnético. Por debajo de 200 nm se encuentra la región lejana o de vacío del ultravioleta, llamada así porque el oxígeno del aire absorbe considerablemente a esta longitud de onda y el espectro de este es solo conseguido realizando vacío en el instrumento. Los espectrofotómetros convencionales solo llegan hasta los 185 nm.

La aplicación más general de la espectroscopia electrónica es para medir concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos, ya que en la mayoría de los casos hay una relación directa entre el número de moléculas y la absorción.

En un gran número de moléculas, la absorción de un fotón provoca la excitación de los electrones de un pequeño grupo de átomos. El término cromóforo es usado para describir esta absorción selectiva. El espectro de absorción electrónica de las moléculas nos permite cuantificar su color. El color de un componente es determinado por la luz que no es absorbida.

El espectro de los aminoácidos es determinado por la naturaleza de sus cadenas laterales. Ninguno de los aminoácidos absorbe en la región visible, y en ausencia de cromóforos adicionales (grupos Hemo, iones Cu, flavinas, etc.) las proteínas son por lo tanto incoloras. Aminoácidos con cadenas laterales aromáticas, en particular el triptófano y la tirosina cuentan con la mayor absorción por debajo de 300 nm. Debido a la contribución de triptófanos y tirosinas, la absorción es máxima sobre 280 nm, y puede ser usada para el cálculo de la concentración de proteína.

3.2.2. Fluorescencia.

Las proteínas son capaces de absorber y emitir radiación en la zona ultravioleta del espectro electromagnético. Dicha absorbancia es debida a la presencia de los enlaces peptídicos, aminoácidos aromáticos y, en menor extensión, a la existencia de puentes

disulfuro. Algunas proteínas que poseen grupos cromóforos presentan también absorción en la región visible del espectro. Durante el proceso de absorción la energía de la luz se emplea en promover electrones desde un estado inicial a otro excitado de mayor energía, de tal manera que en el caso de electrones deslocalizados de sistemas aromáticos la absorción de energía se produce en las regiones visibles o del ultravioleta cercano. La fluorescencia de emisión surge a partir de la presencia de los aminoácidos aromáticos y se puede observar por la emisión de energía radiante que se produce cuando los electrones que están en un estado excitado vuelven al estado de energía inicial en el que se encontraban antes de ser excitados.

En consecuencia, la emisión de fluorescencia se observa cuando un electrón previamente excitado vuelve desde el primer nivel de excitación al nivel de energía en el que estaba inicialmente siguiendo un proceso radiactivo, con la particularidad de que en dicho estado excitado el electrón pierde previamente parte de la energía que posee debido a procesos rápidos no radiactivos, como transiciones vibracionales (relajación). Por esa razón, la energía de la luz emitida al volver al estado inicial es menor que la de la luz absorbida para pasar al estado excitado, dando lugar a que la fluorescencia presente longitudes de onda superiores a las de absorción. Durante el tiempo de vida media del estado excitado pueden existir interacciones o perturbaciones que afecten al mismo, y consecuentemente, al espectro de emisión. Por esta razón, la fluorescencia de emisión es mucho más sensible a los cambios en el entorno del grupo cromóforo que la de absorción de luz, siendo así una técnica muy extendida en la investigación de cambios conformacionales en proteínas.

En el caso de las proteínas, la fluorescencia se debe a la presencia de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y, especialmente, a la contribución del triptófano. Este puede excitarse a longitudes de onda mayores que para los otros dos aminoácidos (por encima de 295 nm). El anillo indólico de su cadena lateral presenta además un coeficiente de extinción molar mayor que el de las cadenas laterales de tirosina y fenilalanina. Así, aunque su rendimiento cuántico sea similar al de la tirosina, presenta una fluorescencia de emisión mucho más intensa. Por otra parte, su cadena lateral también es muy sensible a cambios en el entorno. A esto podemos añadir que las proteínas no suelen contener en su composición un gran número de triptófanos. Los valores de fluorescencia que presentan estos aminoácidos se cuantifican y comparan mediante la sensibilidad, definida como el producto del coeficiente de extinción molar del máximo de emisión y del rendimiento cuántico, y que presenta un valor muy pequeño para fenilalanina en comparación al triptófano y tirosina. Por eso la fluorescencia de la fenilalanina no puede ser observada en el estado nativo. Otro factor importante es la transferencia de energía entre residuos que afecta especialmente a la fluorescencia de la fenilalanina debido a que su emisión disminuye por su capacidad de

transferir energía a los otros dos aminoácidos. Así, el triptófano y la tirosina absorben energía alrededor de los 280 nm, región en la que la fenilalanina emite fluorescencia. Por otra parte, en el caso de proteínas plegadas que contienen triptófanos y tirosinas la emisión de las tirosinas también se ve afectada porque la emisión de los triptófanos es mucho mayor. Esto se debe, por una parte, a que la longitud de onda de emisión del triptófano se desplaza hacia valores de longitud de onda menores que la tirosina y por otra a que los residuos de tirosina pueden transferir energía no radiativa a los triptófanos (Eftink, 1991; Penzer, 1980; Cantor & Schimmel, 1980; Brand & Witholt, 1967). Para que esto ocurra, ambos residuos deben estar contenidos en la misma molécula de proteína y orientados en ella favorablemente.

Los cambios producidos en la conformación de las proteínas a lo largo del proceso de desplegamiento implican cambios en el entorno, de forma que residuos que en el estado nativo (plegado) se encuentran protegidos, pueden estar expuestos al solvente en el estado desplegado. Esto se traduce en cambios en la fluorescencia, especialmente, según se ha mencionado, en el triptófano. Estos cambios pueden darse en el valor del máximo de emisión, que depende del entorno. Así, para un triptófano protegido en el interior apolar de la estructura nativa de una proteína este cambio se encuentra en el intervalo comprendido entre 308 y 340 nm. Este amplio intervalo se debe a una localización variable del anillo indólico respecto a cadenas laterales de otros grupos como puentes disulfuro, histidinas protonadas o enlaces peptídicos por ejemplo. El máximo de su espectro de emisión se desplaza en longitud de onda hasta valores entre 340 y 350 nm para el caso de estar expuesto al disolvente en el estado desplegado.

También pueden darse cambios en la intensidad de emisión, que puede aumentar o disminuir simultáneamente al desplazamiento del máximo de emisión. Dichos cambios en intensidad se producen por los cambios en el entorno producidos gracias al paso de conformación nativa al estado desplegado, en el que este residuo está expuesto al solvente.

En el caso de la tirosina su máximo de emisión de fluorescencia, se encuentra alrededor de 303 nm, independientemente de su entorno molecular. Por eso, si una proteína contiene tirosinas y no triptófanos, el desplegamiento estará dirigido sólo por cambios en la intensidad de emisión de este residuo, que suele presentar valores menores en el estado nativo respecto al del estado desplegado.

La posición del máximo de emisión de estos dos residuos varía también en función de la naturaleza y concentración del solvente, incluso en ausencia de cambios conformacionales. Generalmente, las proteínas pueden desplegarse a través de cambios en la temperatura o por el uso de agentes desnaturizantes (guanidina y urea). Estos factores también contribuyen a cambiar los espectros de emisión del triptófano y tirosina.

3.2.3. Dicroísmo circular.

El dicroísmo circular (DC) es una de las técnicas que engloba la espectroscopia de absorción. Se emplea en el estudio de moléculas orgánicas y, en particular, de las propiedades conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos en disolución (Duddeck, 1995; Nakanishi et al., 1994; Johnson, 1990) ya que esto facilita, a su vez, el seguimiento de cambios en dicha conformaciones inducidos por variaciones de temperatura, pH, presencia de codisolventes, unión de ligandos y cambios en el estado de asociación.

El fenómeno del dicroísmo circular se basa en la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada hacia la derecha e izquierda por parte de las moléculas asimétricas que son ópticamente activas, también llamadas quirales. La quiralidad es una propiedad universal de los sistemas biológicos, como los aminoácidos, que generalmente presentan configuración L, los nucleótidos, que contienen los azúcares D-ribosa y D-desoxirribosa y los carbohidratos con configuraciones D ó L. Los tres sistemas anteriores son las unidades que constituyen las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos.

Cada uno de los tipos de luz circularmente polarizada (a derecha e izquierda) sigue la ley de Lambert-Beer. Según esto, un espectro de DC para una muestra de un compuesto dado puede definirse inicialmente mediante la diferencia entre las absorbancias que presenta para estas dos formas de luz polarizada, en función de la longitud de onda, λ :

$$\Delta\text{Abs}(\lambda) = \text{Abs}_I(\lambda) - \text{Abs}_D(\lambda) = [\varepsilon_I(\lambda) - \varepsilon_D(\lambda)] \cdot c \cdot l$$

$$\Delta\text{Abs}(\lambda) = \Delta\varepsilon \cdot c \cdot l$$

donde Abs_I y Abs_D corresponden a las absorbancias correspondientes a la muestra para la luz circularmente polarizada a la izquierda y derecha respectivamente, c es la concentración de la muestra expresada en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, l es la longitud del paso de luz de la cubeta en cm , y ε_I y ε_D los coeficientes de extinción molar en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para cada tipo de luz.

Las bandas de un espectro de DC pueden ser negativas o positivas, dependiendo de qué tipo de luz se absorba más y sólo se dan a longitudes de onda correspondientes a las bandas de absorción normales.

Actualmente, los instrumentos que se utilizan para realizar estudios mediante DC reciben el nombre de espectropolarímetros y miden de forma directa la diferencia de absorbancia $\Delta\text{Abs}(\lambda)$. Cuando la luz polarizada plana incide sobre una muestra que exhibe DC, las dos componentes circularmente polarizadas que la componen se absorben en diferente magnitud. El DC es proporcional a la excentricidad de la elipse que caracteriza la luz polarizada resultante. La elipticidad, θ , es una medida angular de esta excentricidad y constituye la forma original para detectar la medida de DC (Figura 11). Por razones históricas, la mayoría de los

instrumentos comerciales están calibrados en unidades de elipticidad (θ). Generalmente los espectros de DC se expresan en términos de elipticidad molar $[\theta]$ en $\text{grados}\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{cm}^2$. Su relación con la diferencia entre los coeficientes de extinción molar viene dada por la relación:

$$[\theta] = 3298 \cdot \Delta\epsilon$$

que incluye un factor de 100 debido a la conversión de la concentración en mol/L a dmol/cm^3 .

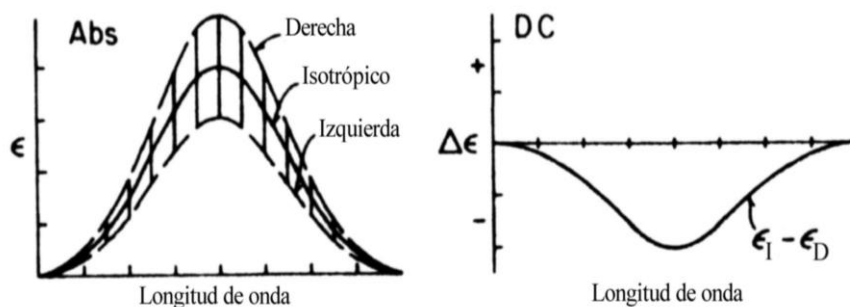


Figura.11: Izquierda: Representación esquemática del espectro de absorción de la luz isotrópica comparado con el de la luz polarizada circularmente a derechas o a izquierdas para una molécula quiral. Derecha: Espectro de DC resultante de la diferencia de coeficientes de extinción entre la luz circular polarizada a izquierdas y a derechas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

4.1. Cristalización de la proteína:

Los cristales de la B-ficoeritrina se consiguieron usando la técnica de contradifusión en capilar. Un experimento típico de contradifusión consiste en un capilar relleno con disolución de proteína y uno de los extremos del capilar en contacto con la disolución de precipitante. Este contacto debe permitir el transporte de materia de proteína y moléculas de agente precipitante para proceder sólo y exclusivamente a través de la difusión molecular. La concentración de proteína utilizada está normalmente comprendida entre 4 y 20 mg/mL. Es altamente recomendable que la concentración del agente precipitante sea muy alta, incluso cercana a la saturación. Mediante este procedimiento las moléculas de precipitante difunden a través de la disolución de proteína provocando una interfase líquido/líquido que generará una fase amorfa o un precipitado microcristalino. La concentración de proteína desciende inmediatamente en las inmediaciones del precipitado pero las moléculas de precipitante difunden más adelante del precipitado. A continuación se forma un gradiente gradual de supersaturación, permitiendo a las proteínas nuclear y crecer en regiones de baja saturación, facilitando la formación de pocos cristales pero grandes.

Así, la técnica de contradifusión en capilar es un sistema de precipitación fuera del equilibrio que se mueve espontáneamente hacia las condiciones de equilibrio. La parte baja del capilar estaría llena de multitud de pequeños cristales lo que reduciría la concentración de proteína de una forma gradual, mientras que la concentración de precipitante se incrementa a lo largo del capilar. Esto daría menores cristales pero más grandes en partes más altas del capilar (Figura 12).

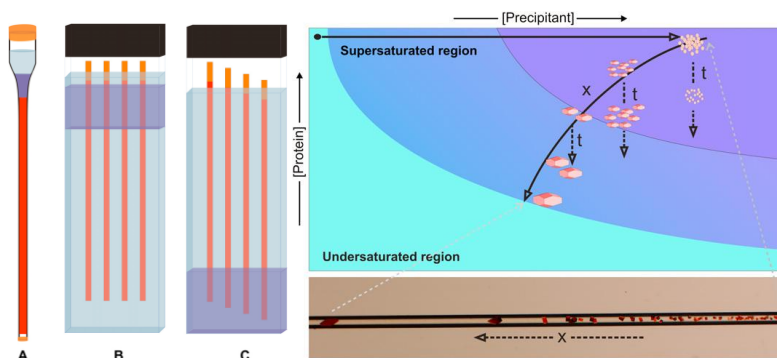


Figura 12. Distintos montajes de la técnica de contradifusión en capilar y esquema del proceso

Los cristales de la B-ficoeritrina procedentes del alga roja *Porphyridium cruentum* fueron obtenidos por contradifusión en capilar. Los capilares utilizados tenían un diámetro

interno de 0.3 mm, se usó como precipitante 3M de sulfato amónico y 0.1M de disolución tampón para ajustar el pH al que queremos cristalizar la proteína (Acetato sódico pH5 y Tris-HCl pH8). La concentración de B-ficoeritrina que se usó fue de 9 mg/mL, dializada frente a 10 mM Tris-HCl pH8, y posteriormente introducida en el capilar mediante capilaridad. Para cada montaje de cristalización, se preparó una disolución de agarosa en gel al 1% y se depositó en el fondo del montaje de cristalización y se cubrió con la disolución de precipitante. El capilar se selló en un extremo con arcilla especial y el lado abierto se introdujo en la zona de la agarosa permitiendo así una lenta difusión. Los montajes de cristalización se dejaron a 298 K. Los cristales se obtuvieron en una semana, adecuados para la colección de datos y determinación de la estructura (Figura 13).

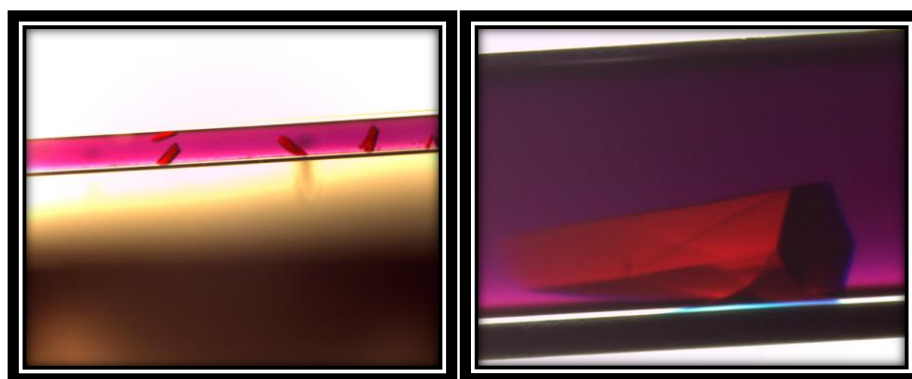


Figura 13. Fotografías de cristales de B-ficoeritrina crecidos en la técnica de contradifusión en capilar

4.2. Medida de los cristales

Los cristales de B-ficoeritrina se sacaron del capilar aplicando presión en su extremo superior. Antes de ser medidos, los cristales se mezclaron con 50 μ L de disolución de glicerol (crioprotector) al 25 % (v/v). Se cogieron con un loop de Mitegen y se congelaron con nitrógeno líquido. Para evitar que se formen cristales de agua, que impidan la obtención de un patrón de difracción de monocristal de proteína se adiciona el crioprotector. Cuando se congela una muestra con un alto porcentaje de agua se forman cristales y sus difracciones interfieren con las de proteína siendo imposible su interpretación. Los datos de difracción de rayos X fueron recogidos en la línea 14-4 del Síncrotrón Europeo (ESRF) situado en Grenoble (Francia) usando una longitud de onda de 0.97 Å y un detector ADSC Quantum Q315r.

4.3. Análisis de los datos

Todos los cristales medidos de la B-ficoeritrina pertenecen al grupo espacial R3. Algunas proteínas relacionadas, por ejemplo la R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*, se han

cristalizado también en el grupo espacial R3 con más o menos las mismas constantes de la celdilla unidad, sugiriendo un empaquetamiento similar de las ficobiliproteínas. Los datos fueron indexados, integrados y escalados con el programa iMOSFILM por la investigadora y profesora titular de la Universidad de Almería Dr. *Ana Cámara Artigas*.

A continuación mostramos una tabla con los resultados de las estadísticas de los datos de difracción y las estructuras tridimensionales:

Tabla 1. Tabla de difracción de rayos X y refinamiento

	pH5	pH8
Grupo espacial	R3	R3
Dimensiones de la celdilla unidad (a b c)	187.00 187.00 59.33	187.11 187.11 59.23
Intervalo de resolución (Å)	20-1.85	20-1.70
Número de observaciones	241056 (31314)	367561(53036)
Reflexiones únicas	64691(9332)	84772(12451)
Completitud (%)	98.0(96.7)	99.6 (100)
R_{merge}^b (%)	7.1 (48.3)	7.2 (55.3)
$I/\sigma(I)$	13.1 (2.6)	11.6 (2.4)
Refinamiento		
Número de aminoácidos	682	682
Disolvente	540	549
R_{work} (%)	17.8 (23.8)	17.7 (24.4)
R_{free} (%)	22.1 (29.0)	21.5 (29.1)
RMS desviaciones de geometría ideal		
Enlaces (Å)	0.017	0.015
Ángulos (grados)	2.411	2.510
media B (proteína) (Å ²)	19.74	21.1
Residuos en zonas permitidas de Ramachandran (%) ^c	99.7	99.7

^a Los valores entre paréntesis son para los datos de alta resolución

^b $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{j=1}^N |I_{hkl} - I_{hkl}(j)|}{\sum_{hkl} \sum_{j=1}^N I_{hkl}(j)}$ donde $|I_{hkl}|$ es el valor final de intensidad.

^c Perteneciente al programa PROCHECK statistics.

4.4. Resolución de la estructura

Las estructuras de la B-ficoeritrina fueron resueltas por la Investigadora y Profesora Titular de la Universidad de Almería Dr. *Ana Cámara Artigas* usando el paquete de programas CCP4. Los cristales de B-ficoeritrina pertenecientes al grupo espacial R3 con un coeficiente de Matthews para dos moléculas del heterodímero $\alpha\beta$ en la unidad asimétrica de 2.75 y con un porcentaje de disolvente del 55.3 %. La estructura de B-ficoeritrina procedente de *Porphyidium cruentum* fue resuelta anteriormente a una resolución de 2.3 Å, pero las coordenadas no estaban accesibles en el banco de datos de proteínas (PDB). Por esta razón, como modelo para

el reemplazamiento molecular, se usó las coordenadas de la R-ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata* que tiene un 84% de homología secuencial y fue resuelta a una resolución de 2.8 Å. Para el modelo se excluyeron los grupos cromóforos y las moléculas de agua. El reemplazamiento molecular se llevo a cabo usando el programa MOLREP perteneciente a CCP4 y dando como solución dos moléculas ($\alpha\beta$) del heterodímero en la unidad asimétrica. Las estructuras fueron refinadas usando el programa REFMAC5. Un refinado inicial usando 10 ciclos de refinamiento de posición restringida rápidamente bajó el valor del factor R. Los residuos pertenecientes a la B-ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* fueron fijados en las coordenadas de la solución por reemplazamiento molecular. La construcción manual de la estructura se hizo con los mapas de densidad electrónica σ_A -ponderado (2Fo-Fc) y (Fo-Fc) con el programa COOT. Las moléculas de agua fueron automáticamente actualizadas después de cada ciclo de refinamiento y con una inspección manual usando el programa COOT. La calidad final del modelo fue comprobada usando MolProbity. Las coordenadas atómicas de la proteína han sido depositadas en el PDB con un código de acceso 3V58 (estructura del cristal a pH5) y 3V57 (estructura del cristal a pH8).

Algunos programas pertenecientes a CCP4 se usaron para analizar y comparar las estructuras de B-ficoeritrina: para la superposición y el cálculo de las desviaciones r.m.s de las estructuras se usó LSQKAB, las zonas accesibles de las áreas superficiales se calcularon usando AERAIMOL, las distancias entre aminoácidos fueron estimadas con el programa CONTACT y los factores B fueron generados usando BAVERAGE. Finalmente, las superficies de proteína en los cristales fueron caracterizadas usando la página web PISA SERVER. Los datos finales de refinamiento se presentan en la Tabla 1.

4.5. Descripción de la estructura

La B-ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* está compuesta por los polipéptidos denominados α y β . La subunidad α contiene 164 residuos y la subunidad β contiene 177 residuos, ambas subunidades tienen el mismo plegamiento total.

Cada subunidad contiene 8 hélices- α , seis de las cuales se pliegan como una globulina (A, B, E, F, G y H) que es similar al plegamiento de la mioglobina. De hecho, los cofactores covalentemente unidos PEB82 α y PEB82 β aparecen en una localización análoga en la que lo hacen las porfirinas en las globulinas. Las dos hélices adicionales X e Y forman el dominio de asociación entre las dos subunidades en la formación del monómero ($\alpha\beta$) (Figura 14).

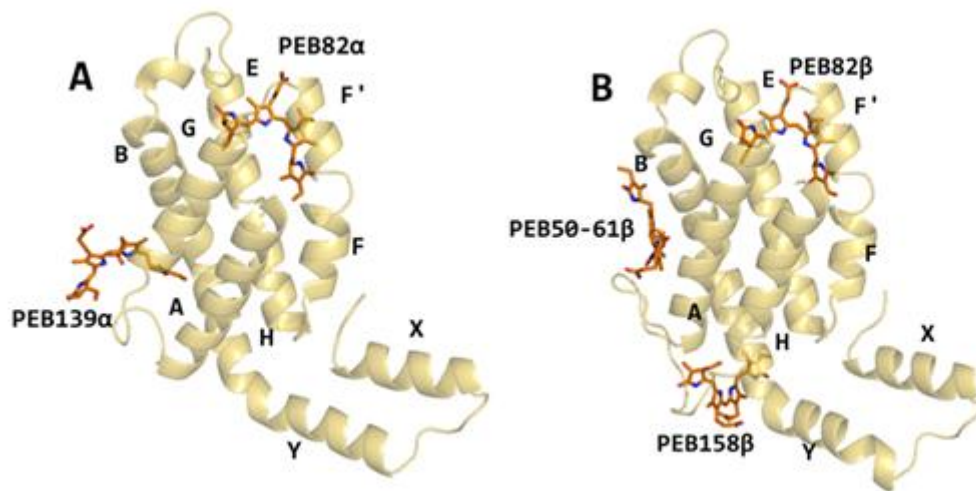


Figura 14. Plegamiento de las subunidades α y β

Las estructuras cristalográficas muestran la presencia de un dímero del ($\alpha\beta$) heterodímero en la unidad asimétrica a ambos pHs (5 y 8). La superficie del área de enterramiento sobre la formación del heterodímero ($\alpha\beta$) se calculó con el programa PISA server, siendo esta de 1530 \AA^2 . El heterodímero es altamente estabilizado por la formación de 6 puentes salinos y 18 puentes de hidrógeno. El operador de grupo espacial R3 por simetría genera el hexámero $[(\alpha\beta)_2]_3$, que está compuesto por dos capas de hexámeros (Figura 15). El empaquetamiento de estas dos capas de hexámeros se asemeja a aquellas estructuras análogas encontradas *in vivo*.

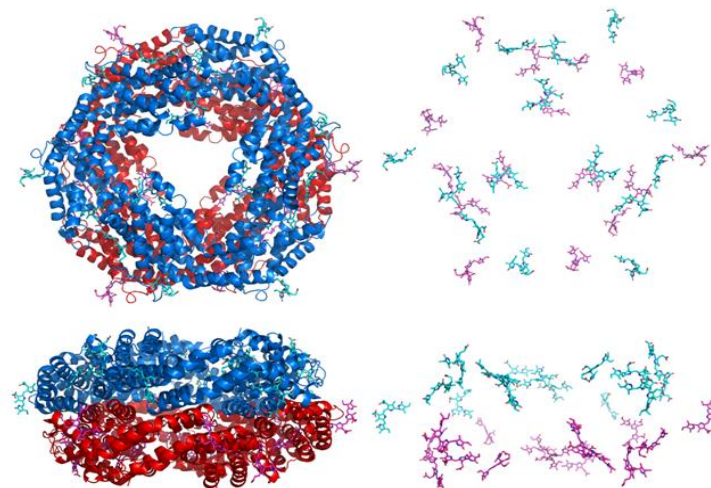


Figura 15. Dos hexámeros (rojo y azul) de B-ficoeritrina. A la derecha se muestran los cofactores unidos al complejo proteico de forma separada.

Cuando se sustituyen los residuos presentes en el modelo de reemplazamiento molecular (R-ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata*) por los residuos correspondientes presentes en la B-ficoeritrina, encontramos una discrepancia entre las dos secuencias de esta proteína. En la posición 96 de la cadena α no queda claro si lo que se encuentra es un aspartato o una cisteína. Gracias a la buena calidad y alta resolución de nuestros datos podemos identificar que en esa posición se encuentra situada una cisteína.

Nuestros datos también han confirmado la presencia de una asparagina metilada en la posición 72 de la subunidad β . Esta asparagina metilada ha sido descrita en algunas ficobiliproteínas y está situada a la distancia de un puente de hidrógeno del átomo OA Å (3.42) y el átomo NA (2.91Å) del PEB82 α . La metilación de la asparagina para producir γ -N-metilasparagina se ha propuesto que aumenta la eficiencia de la transferencia de energía dentro del ficobilisoma y para prevenir la fotoinhibición. Este aminoácido clave interactúa con una red de enlaces de hidrógeno y puentes salinos que conecta el cromóforo PEB82 α y el PEB82 β . Todos los residuos están localizados en zonas favorables de la gráfica de Ramachandran excepto el residuo Thr75 β que también interactúa en esta red de enlaces y puentes salinos (Figura 16).

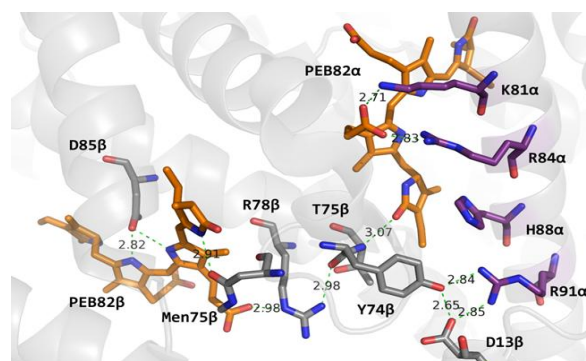


Figura 16. La estructura a pH5 tiene una red de enlaces de hidrógeno y puentes salinos formada por un ambiente entre el PEB82 β y el PEB82 α . Participando en esta red está el residuo modificado de asparagina metilada 72 β y la Thr75.

La conformación restringida adoptada por este residuo resulta de la interacción de la amida perteneciente a este con el PEB82 α (grupos carbonilos de la cadena α adyacente). Residuos que aparecen en la misma posición en otras ficoeritrinas están también en esta región no permitida de Ramachandran.

Algunos autores han mostrado la existencia de una tercera subunidad y en el centro del hexámero de ficobiliproteína, que contiene el grupo cromóforo PUB en vez del PEB. El espectro de la B-ficoeritrina, obtenido anteriormente a la cristalización, mostraba un hombro característico a 498 nm atribuido a la presencia del grupo cromóforo PUB. Además, la

electroforesis SDS-PAGE (Figura 17) de la proteína después de cristalizar revelaba una banda correspondiente a esta subunidad γ . En el centro de estos hexámeros, hemos observado alguna densidad electrónica residual en la diferencia de mapas de densidad electrónica que podría ser debido a la subunidad γ , pero debido al eje de simetría, el promedio de densidad electrónica no pudo ser modelado.

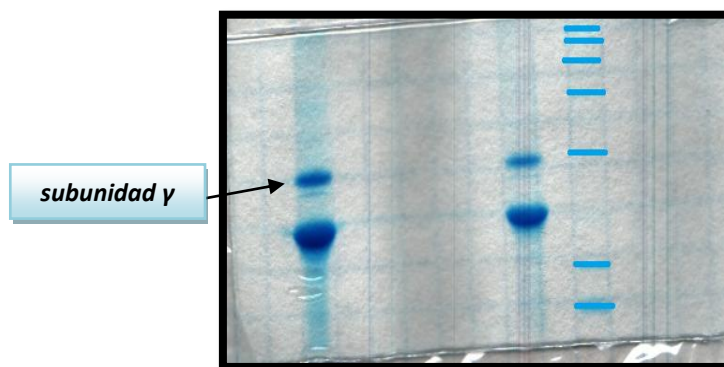


Figura 17. Gel electroforesis SDS-PAGE subunidad γ

4.6. Descripción de los cromóforos:

Los polipéptidos α y β muestran una gran homología estructural incluso cuando la homología secuencial es solo del 24%. Las principales diferencias entre las cadenas de polipéptido están dentro de los loops que contienen los bolsillos cromóforos de unión. Como para otras ficobiliproteínas, la distribución de moléculas de cromóforos en el hexámero indica que la totalidad de la estructura está diseñada como un embudo de energía hacia el centro del hexámero (Figura 15). Cada molécula de PEB presente en el hexámero tiene algunos vecinos en una distancia de 30 Å y se esperan unas interacciones dipolo-dipolo muy fuertes. Estas interacciones han sido modeladas jugando un papel en las propiedades espectrales de estos complejos de bilina-proteína.

En la B-ficoeritrina de *Porphyridium cruentum*, los cromóforos presentes en la subunidad α están covalentemente unidos a los residuos Cys82(PEB82 α) y Cys139(PEB139 α), y aquellos dentro de la subunidad β que están unidos a los residuos 82(PEB82 β) y 158(PEB158 β). Una molécula adicional de PEB está presente en la subunidad β , pero en este caso el cromóforo está doblemente unido al polipéptido β a través de los residuos Cys50 y Cys61 (PEB50-61 β). Para todos los cromóforos, los átomos de nitrógeno de los anillos B y C (Figura 18) interactúan con un residuo de aspartato, con la excepción del PEB139 α , donde el nitrógeno está unido por puente de hidrógeno a una molécula de agua, que también forma un puente de hidrógeno con Asp143 α .

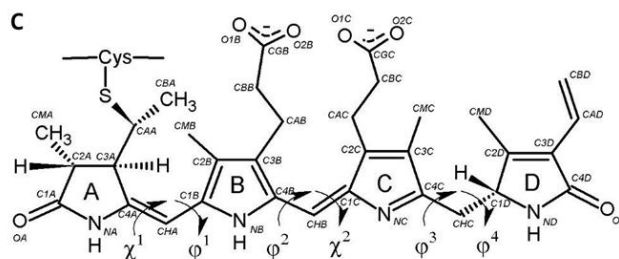


Figura18. Esquema de una molécula de PEB.

Los cromóforos PEB contienen dos grupos propiónicos (Figura 18) apuntando hacia fuera en el anillo B y C que interactúan con las cadenas laterales de algunos residuos. Estos grupos de propionato están formando puentes salinos con arginina o lisina con la excepción del PEB158 β , el cual está unido por puentes de hidrógeno a algunos residuos a través de moléculas de agua. Todas estas interacciones podrían ser modificadas por el pH. Por ejemplo, el pKa de los grupos propiónicos de PEB se espera que sea de 4.5. Disminuyendo el pH por debajo de 4.5 resultaría en la protonación de los grupos propiónicos y se destruirían las interacciones por puentes salinos mencionadas antes con los residuos del medio.

Las diferencias en la conformación del cromóforo de *Porphyridium cuentaum* y otras algas rojas son evidentes, las más notables están en los ángulos del anillo A del PEB139 α . Cuando nosotros comparamos en nuestras estructuras este cromóforo con aquel presente en la estructura de la R-ficoeritrina del alga roja *Griffithsia monilis*, este anillo está rotado sobre 90°. Esta conformación da lugar un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo del átomo OA del PEB y los residuos Thr159 β (Átomo N, 3.18Å), Asp157 β (Átomo OD1, 3.34Å) y Cys158 β (Átomo N, 2.77Å). El último residuo está unido al cromóforo PEB158 β . De esta forma, las interacciones que se generan unen los diferentes cromóforos presentes en diferentes hexámeros. No hay diferencias medibles entre los pHs 5 y 8 para el PEB139 α . La rotación encontrada entre los anillos de pirrol A y B del PEB139 α es comparable a aquella que se describe en dominio de unión de bilinas de la cianobacteria fitocromo de *Synechococcus* OSB'. En la estructura de esta cianobacteria generada por RMN, el anillo A está prácticamente perpendicular al anillo B y C en el estado fundamental (Pr), pero en la fotoconversión al estado fotoactivado (Pfr), las orientaciones de B, C y D se mantienen sin cambios, el anillo A se somete a una rotación de 90° y se vuelve coplanar con B y C.

4.7. Cambios conformacionales con el pH:

La comparación entre las estructuras de los cristales obtenidos a pH5 y 8 muestra que la mayor diferencia entre ellos se encuentra cerca del cromóforo PEB82 α . A pH8, la His88 α

aparece en una doble conformación pero no ocurre lo mismo a pH5 (Figura 19). En la conformación alternativa de la His88 α , la cadena lateral está rotada 60° estableciendo una distancia de 3.55Å entre el átomo ND1 del átomo carbonil OD del PEB82 α . Además, esta cadena lateral forma dos nuevos puentes de hidrógeno: uno entre el átomo NE2 de la His88 α y el átomo NH2 de la Arg91 α , y otro entre el mismo átomo NE2 de la His88 α y el átomo OH de Tyr74 β . Estas interacciones no están presentes en la cadena lateral de la histidina en la estructura resuelta a pH5. Un cambio conformacional parecido se ha observado comparando el estado fundamental (Pr) y el estado fotoactivo (Pfr) en las estructuras resueltas en los dominios de unión de bilinas de la cianobacteria de fitocromo de *Synechococcus*.

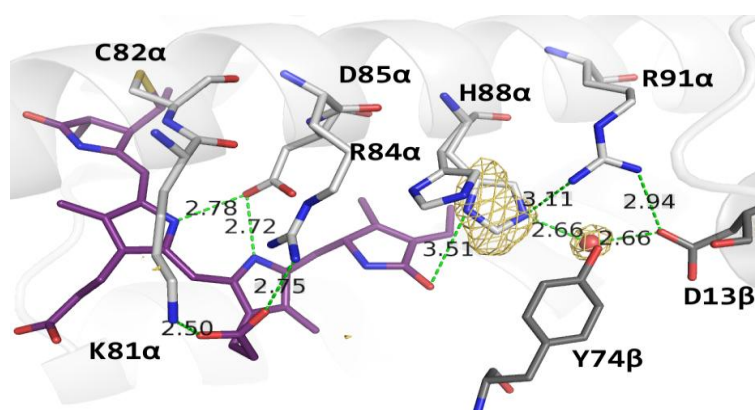


Figura19. Entorno del cromóforo PEB82 α

En la estructura de Pr la His169 está formando un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonilo del anillo D del cromóforo de ficocianobilina (PCB), mientras en la estructura de Pfr esta interacción no ocurre y los autores atribuyen estos cambios a la diferencia del estado fundamental (Pr) y el estado fotoactivo (Pfr). Así, el cambio conformacional debido al pH probablemente se vea reflejado en cambios estructurales que tendrían lugar durante la transferencia de energía.

Otra diferencia relevante es la presencia de una molécula de agua a una distancia de 2.66 Å de la His88 α , también interactúa con la Tyr74 β (2.81 Å) y con el Asp13 β (2.66 Å) (Figura 19). Vale la pena señalar que la His88 α se encuentra próxima a un grupo especial de residuos implicados en el contacto entre cadenas del monómero ($\alpha\beta$). Entre estos residuos, la Thr75 β , que es el único residuo fuera de la región de las zonas favorecidas de Ramachandran, forma un puente de hidrógeno con el átomo OD carbonil del anillo A del PEB82 α . En estas diferencias en la red de enlaces de hidrógeno se espera que tengan un impacto en el proceso de transferencia de energía entre cromóforos.

4.8. Efecto del pH en las propiedades espectroscópicas:

El espectro de absorción visible de la B-ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum* está caracterizado por una banda ancha en la región espectral de 470 a 570 nm con un pequeño hombro a 498 nm (Figura 20).

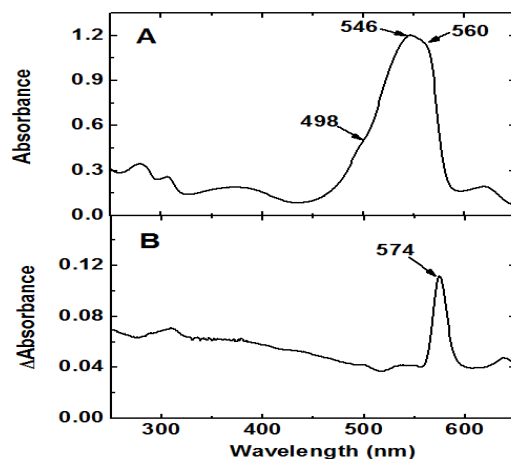


Figura 20. Espectro de absorción de la B-ficoeritrina

Medidas espectroscópicas previas han producido modelos para explicar las características espectrales y mecanismos de transporte energético en las ficobiliproteínas (Womick et al., 2011). Basados en estos modelos, el PEB tiene una frecuencia de resonancia electrónica menor que el PUB debido a que la conjugación de doble enlace se mantiene a través de los tres anillos de pirrol. De esta forma, que la amplia banda visible esté compuesta por varios picos es debido a la absorción de varios diferentes tipos de PEB y PUB (responsable de la transición producida a 498 nm que aparece como un hombro). Las propiedades espectroscópicas de las bilinas son muy sensibles a la conformación de los cromóforos. Algunos estudios han atribuido la diferencia en el espectro de absorción de los diferentes cromóforos presentes en ficobiliproteínas a diferencias en los ángulos de torsión entre los anillos A y B. Nosotros hemos determinado la desviación en la coplanaridad de cada molécula de PEB en nuestra estructura cristalográfica. Se han realizado cálculos semiempíricos usando la estructura de la R-ficoeritrina procedente del alga roja *Griffithsia monilis* (Gaigalas et al., 2006), permitiendo una estimación cuantitativa del desplazamiento hacia el azul dependiendo de la coplanaridad de los anillos conjugados A y B. Estos autores atribuyeron el pico de absorción a 530 nm a aquellas moléculas de PEB con alta desviación de la planaridad ($>50^\circ$), mientras que el pico a 560 nm fue relacionado con las moléculas de PEB con poca desviación de la planaridad ($<20^\circ$). En el espectro de B-ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* se pueden distinguir dos picos en la banda presentes en la región espectral entre 470 y 570 nm: un pico

con un máximo a 546 nm y otro a 560 nm. En nuestras estructuras, el PEB82 α / β muestra menor desviación de la planaridad que el PEB139 α o el PEB158 β , por lo que se espera que el pico a 560 nm pertenezca al PEB82 α / β .

La diferencia en el espectro óptico de la B-ficocitrina entre el pH5 y 8 está en un pico que aparece a 574 nm que indica un desplazamiento hacia el azul a pH8 (figura XB). Esta diferencia espectral sugiere que la molécula de PEB se encuentra en diferentes conformaciones y distintos medios en los dos valores de pH, en acuerdo con el cambio estructural a pH8 en la orientación de la His88 α , que promueve cambios en la red de puentes de hidrógeno y la hidratación próxima al PEB82 α comparado con el observado a pH5.

Entre pH5 y 8, no se observan cambios espectrales pero justo por encima de pH 8 la absorbancia a 546 y a 560 nm decreció. (Figura 21)

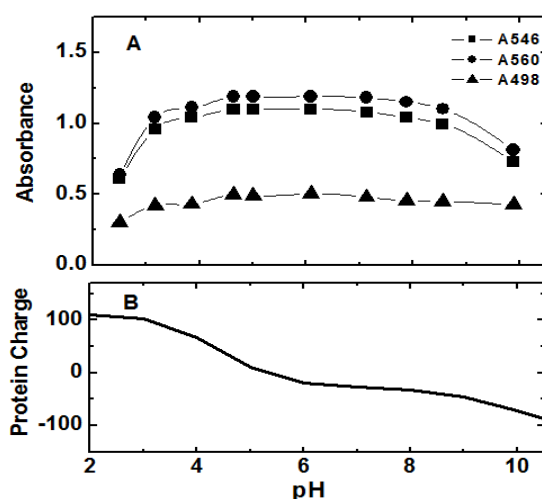


Figura 21. Gráficas de B-ficocitrina en función del pH

La dependencia del pH tiene una buena correlación con la predicción en el perfil de protonación y la estabilidad de la proteína obtenido por el servidor de cálculo de pKa PROPKA (Figura 21). Cambios en el estado de protonación de los residuos alrededor de los cofactores deberían tener un impacto pronunciado en las propiedades ópticas de la bilina. La mayoría de las moléculas de PEB presentes en la B-ficocitrinas interactúan con un residuo de aspartato. Estos residuos de aspartato tienen inusualmente bajos valores de pKa sobre 2. Esta interacción entre el aspartato y la bilina no está presente en el PEB139 α donde una molécula de agua está unida a los nitrógenos del pirrol, pero también está unida al residuo Asp143 α , el cual muestra también un bajo valor inusual de pKa. Todos estos residuos de aspartato están formando puentes salinos con residuos cercanos de arginina que, al mismo tiempo, están formando otros puentes salinos de los grupos propiónicos del PEB. La excepción de estos bajos valores de

pKa es el residuo de aspartato unido a PEB158 α , Asp39 β . Este aspartato tiene un valor de pKa cercano a 8, que es bastante mayor que el valor de 3.8 esperado para este tipo de residuo, debido a la distribución de cargas en el medio proteico. Tal como ya se ha descrito, este aspartato está ligado a una molécula de PEB (PEB158 α) y no esta interactuando con residuos con carga positiva. Así, el estado neutro de este residuo parece ser importante para su interacción con los nitrógenos del pirrol de la bilina. La falta de esta interacción seguramente de lugar a una dependencia del pH respecto al espectro óptico. En general, la información estructural de cambios en la conformación y la red de puentes de hidrógeno, relacionada con los cambios en el pH, es de gran interés para determinar el mecanismo del proceso de transferencia de energía en este tipo de proteínas.

La B-Ficoeritrina en condiciones fisiológicas puede absorber luz en la región espectral de 470 nm a 570 nm. La Figura 22 muestra el espectro de absorción a pH7, el análisis del espectro muestra la presencia de tres componentes fisicoquímicos diferentes a diferentes longitudes de onda: un pico con un máximo de 544 nm y otro a 565nm, típico de la B-ficoeritrina que contiene PEB, y un hombro a 498 nm que corresponde al cromóforo PUB. La presencia de este hombro en el espectro visible confirma la presencia de la subunidad γ .

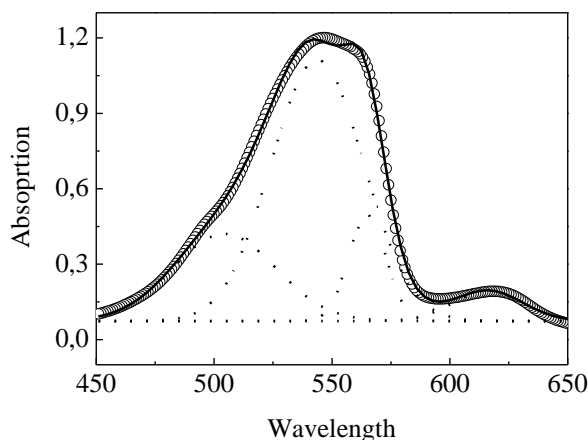


Figura 22. Espectro de absorción de B-ficoeritrina a pH7.

Para estudiar el comportamiento de la proteína a diferentes pHs se realizaron espectros de absorción entre pH 2.5 y 9.9 (Figura 23). Se observó que según descendía el pH y carácter ácido la intensidad de absorbancia también disminuía, siendo más notable este descenso a 565 nm y menos apreciable en 544 y 498 nm. El mayor descenso de absorbancia a 565 nm y el menor declive de absorbancia a 544nm y 498 nm, podría ser explicado basándonos en la diferencia de estabilidad de los cromóforos en función del pH. A 544 nm la molécula de PEB (PEB50-61 β) asociada con el polipéptido β está doblemente unida a través de

los residuos Cys50 y Cys61 y esto puede explicar su mayor estabilidad respecto al PEB asociado a 565 nm que está unido a la proteína a través de un único residuo de cisteína 82. La alta estabilidad del PUB solo presente en la subunidad y es más difícil de explicar debido a los problemas que genera este tipo de estructuras para el modelado de esta subunidad. Sin embargo, teniendo en cuenta datos de otras ficoeritrinas podemos predecir que su mayor estabilidad es debida al tipo de unión doble que presenta respecto a la proteína.

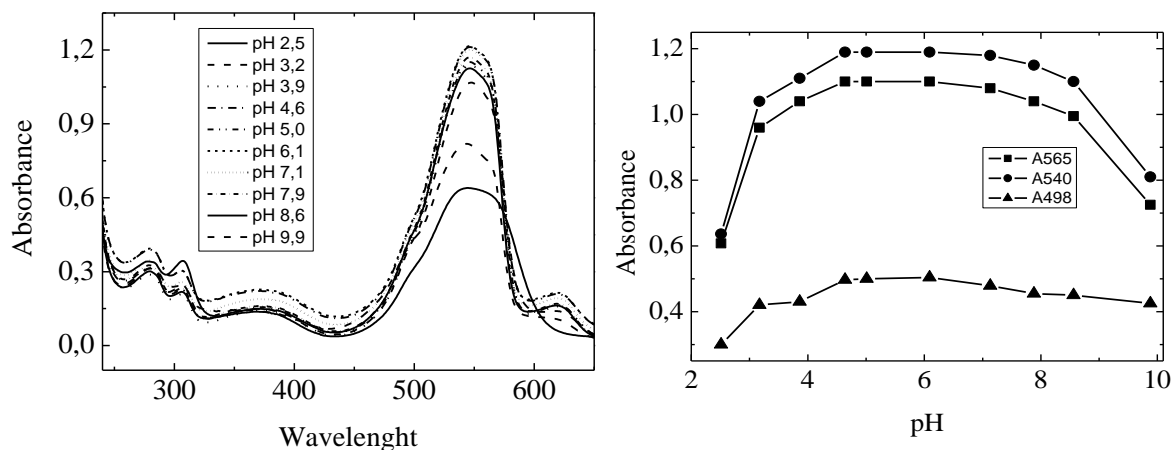


Figura 23. Efecto del pH en las propiedades del espectro de absorción en la B-ficoeritrina

De acuerdo a los datos obtenidos de los espectros de absorción y fluorescencia a diferentes pHs, las variaciones más significativas ocurren en los valores por debajo de 4 y por encima de 8. Los cambios observados por debajo de pH4 podrían ser atribuidos a los diferentes estados de protonación en los residuos de aspartato (pKa 3.96). Este aminoácido es responsable de la interacción entre la B-ficoeritrina y las moléculas de PEB presentes, con la excepción del PEB139 α . De acuerdo a los datos estructurales esta interacción se produce a través de los anillos B y C con un puente de hidrógeno con el residuo de aspartato, y en el PEB139 α los anillos de pirrol forman un puente de hidrógeno con una molécula de agua. Estos contactos se ven afectados cuando el grupo aspártico es protonado a bajo pH, resultando en la perturbación de las propiedades electrostáticas implicadas en la asociación proteína-cromóforo.

Los cambios observados a pH>8 podrían ser explicados en términos de diferentes conformaciones de la His88 a diferentes pHs, porque este aminoácido es el responsable de las diferentes estructuras de cristales a pH5 y 8. También, la His88 está situada cerca del cromóforo PEB82 α , explicando las diferencias en el espectro de absorción detectado a pH>8. A pH8 la cadena lateral de la His88 α está rotada 60° (en comparación con pH5) y este movimiento desplaza el ND1 a una distancia de 3.55Å del átomo carbonil OD del anillo A del

PEB82 α . La cadena lateral forma dos nuevos puentes de hidrógeno: uno entre la His88 α (átomo NE2) y el átomo NH2 de la arginina 91 α y el segundo entre la misma His88 α (átomo NE2) y el átomo OH de la Tyr74 β . Es remarcable que esta histidina 88 α se encuentra cerca de un grupo especial de residuos implicados en contactos intercatenarios cerca de la Thr75 β , el cual tiene un puente de hidrógeno con el átomo carbonil OD del anillo A (cromóforo PEB82 α) y que estos cambios conformacionales podrían tener alguna trascendencia en el transporte de energía en la B-ficoeritrina. Por otra parte, el pK de una histidina libre es 6, pero este valor podría cambiar en la proteína teniendo en cuenta que el pH>8. Hay varias razones para explicar este cambio en el pKa, por ejemplo, un cambio en la micropolaridad del medio que rodea a estos residuos es posible. Alternativamente, una forma protonada podría ser estabilizada formando un puente de hidrogeno con un grupo vecino.

La información de cambios estructurales de la B-ficoeritrina fue obtenida realizando experimentos de CD. Los datos obtenidos junto a los cambios de absorción espectral nos dan información muy valiosa de variaciones de la estructura de la proteína en diferentes medios. A pH<3.86 y pH>8.56 un descenso en el porcentaje de hélices α se produce indicando cambios estructurales en estas condiciones, en concordancia con los datos obtenidos de UV-visible y fluorescencia.

Por otra parte, la transferencia de energía entre cromóforos modula las propiedades fluorescentes de la B-ficoeritrina. Debido al gran número de cromóforos en la B-ficoeritrina la medida de la cinética de transferencia de energía entre ellos es difícil. Sin embargo, el conocimiento de la estructura cristalina de la B-ficoeritrina ha permitido la determinación de las principales rutas de transferencia de energía en esta proteína. En el hexámero, los cromóforos 1 α -82 y 2 β -82 son los más fuertemente acoplados. El cromóforo 1 β -50/1 β -61 está localizado entre 1 β -158, 3 α -82 y 1 β -82 y puede mediar la transferencia de energía desde β -158 a α 82 y β -82. El cromóforo periférico 1 α -139a se acopla débilmente con los cromóforos 1 α -82 y 2 β -82 dentro de un trímero, pero, en el hexámero, este está cerca del cromóforo 6 β -158 del otro trímero. Debido a su posición periférica y su proximidad a cromóforos equivalentes, puede hacer de mediador de transferencia de energía. La configuración de los cromóforos y la conformación del polipéptido afecta para dar la mejor estructura favorable para la eficiencia en la migración de energía entre cromóforos.

El comportamiento detectado a PH<4 y pH>8 puede ser explicado en términos de cambios conformacionales (quizá desplegamiento y disociación parcial) o modificaciones de los cromóforos. A esos valores de pH un descenso en la intensidad de fluorescencia tiene lugar debido a perturbaciones en las rutas de migración de energía entre cromóforos, y esto puede dar lugar a un descenso en el rendimiento cuántico de fluorescencia. También, la disociación

del hexámero podría jugar un importante papel en este proceso debido a que la intensidad de fluorescencia de los hexámeros de B-ficoeritrina fueron mucho mayores que los de B-ficoeritrina disociada.

Se realizaron experimentos de CD a diferentes pHs para comprobar el análisis estructural de la proteína. Las bandas de UV lejano de CD son sensibles al cambio de la estructura secundaria. Como podemos ver en la Figura 24 la estructura secundaria de la B-ficoeritrina es estable entre el pH4 y 8 donde no se aprecian cambios en el espectro de CD. Este valor desciende a $\text{pH} < 3.86$ y $\text{pH} > 8.56$.

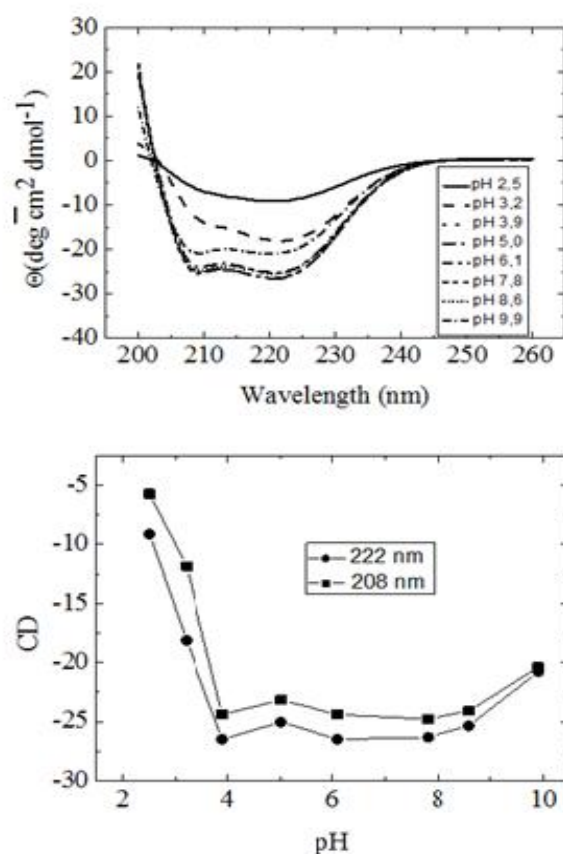


Figura 24. Efecto del pH en los espectros de dicroísmo circular.

Los cambios en la intensidad de fluorescencia de la B-ficoeritrina a diferentes pHs se muestran en la Figura 25. La excitación a 498 nm es absorbida por el cromóforo PUB y el espectro de emisión de fluorescencia con excitación a 540 y 565 nm da información sobre la red de transferencia de energía entre los cromóforos de PEB. La emisión de fluorescencia se mide a 578 nm muestra ser estable entre los pH 4-8. A $\text{pH} < 4$ la emisión de fluorescencia de B-ficoeritrina se desplaza hacia el infrarrojo y cuando el $\text{pH} > 8$ encontramos desplazamiento hacia el azul.

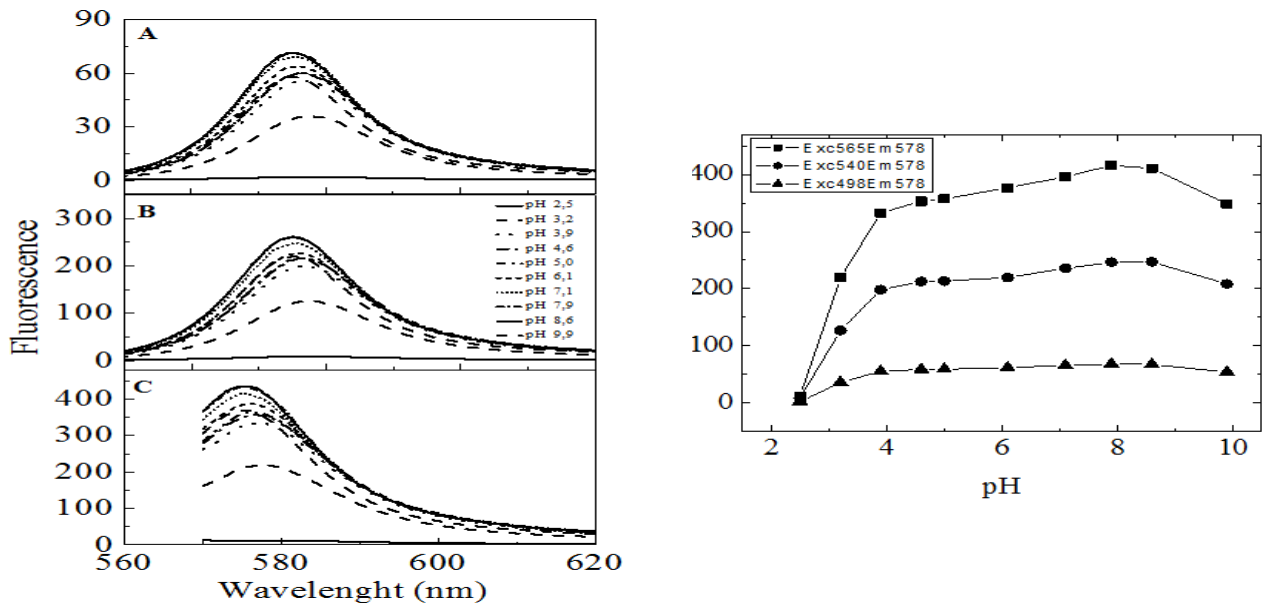


Figura 25. Espectro de emisión de fluorescencia en función del pH.

5. CONCLUSIONES

La B-Ficoeritrina procedente del alga *Porphyridium cruentum* ha sido cristalizada usando la técnica de contradifusión en capilar. Los cristales pertenecientes al grupo espacial R3 con parámetros muy parecidos de la celdilla unidad difractaron a una resolución máxima de 1.85 y 1.70 Å respectivamente a los pHs 5 y 8. La diferencia más notable entre ambas estructuras es la presencia de dos conformaciones diferentes en la Histidina 88 de la subunidad α a pH8. Este residuo está situado cerca del grupo cromóforo ficoeritrobilina (PEB82 α) y la nueva conformación provoca una nueva disposición en la red de enlaces de hidrógeno y el estado de hidratación alrededor del PEB82 α , que probablemente contribuya a la variación del espectro óptico asociado con este grupo cromóforo. La comparación de la estructura de la B-ficoeritrina con la de otras algas rojas muestra diferentes conformaciones en el anillo A del grupo cromóforo PEB139 α . Esta diferencia conformacional en la B-ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* permite la formación de algunos puentes de hidrógeno que conectan el PEB139 α con el cromóforo PEB158 β en la interfase de asociación del hexámero ($\alpha\beta$)₃. La posible influencia de estas diferencias estructurales en el espectro óptico y la transferencia de energía son discutidas, con las dos conformaciones dependientes del pH de la Histidina 88 de la subunidad α y el PEB82 α , siendo propuesto como la representación de las características estructurales fundamentales que se correlacionan con la dependencia del pH y estados de transito ópticos durante la transferencia de energía.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Adir N (2005) Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynth Res* **85**, 15-32.
2. Glazer AN (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J Biol Chem* **264**, 1-4.
3. Liu LN, Chen XL, Zhang YZ & Zhou BC (2005) Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1708**, 133-142.
4. Glazer AN & Hixson CS (1977) Subunit structure and chromophore composition of rhodophycean phycoerythrins. Porphyrin B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. *J Biol Chem* **252**, 32-42.
5. Liu LN, Elmalk AT, Aartsma TJ, Thomas JC, Lamers GE, Zhou BC & Zhang YZ (2008) Light-induced energetic decoupling as a mechanism for phycobilisome-related energy dissipation in red algae: a single molecule study. *PLoS One* **3**, e3134.
6. Ficner R & Huber R (1993) Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm resolution and localization of the gamma subunit. *Eur J Biochem* **218**, 103-106.
7. Jiang T, Zhang JP, Chang WR & Liang DC (2001) Crystal structure of R-phycoerythrin and possible energy transfer pathways in the phycobilisome. *Biophys J* **81**, 1171-1179.
8. Ritter S, Hiller RG, Wrench PM, Welte W & Diederichs K (1999) Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90-Å resolution. *J Struct Biol* **126**, 86-97.
9. Garcia-Ruiz JM (2003) Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol* **368**, 130-154.
10. Camara-Artigas A, Palencia A, Martinez JC, Luque I, Gavira JA & Garcia-Ruiz JM (2007) Crystallization by capillary counter-diffusion and structure determination of the N114A mutant of the SH3 domain of Abl tyrosine kinase complexed with a high-affinity peptide ligand. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 646-652.
11. Otorola F, Gavira JA, Ng JD & Garcia-Ruiz JM (2009) Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Prog Biophys Mol Biol* **101**, 26-37, doi: S0079-6107(09)00084-4 [pii]
10.1016/j.pbiomolbio.2009.12.004.
12. Abad-Zapatero C, Fox JL & Hackert ML (1977) The quaternary structure of a unique phycobiliprotein: B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 266-272.
13. Contreras-Martel C, Martinez-Oyanedel J, Bunster M, Legrand P, Piras C, Vernede X & Fontecilla-Camps JC (2001) Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 52-60.
14. Yeates TO (1997) Detecting and overcoming crystal twinning. *Methods Enzymol* **276**, 344-358.
15. Bailey S (1994) The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 760-763.
16. Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F & Vagin AA (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355-367, doi: S0907444911001314 [pii]
10.1107/S0907444911001314.
17. Krissinel E & Henrick K (2005) Detection of protein assemblies in crystals. *Computational Life Sciences, Proceedings* **3695**, 163-174.
18. Klotz AV, Leary JA & Glazer AN (1986) Post-translational methylation of asparaginyl residues. Identification of beta-71 gamma-N-methylasparagine in allophycoerythrin. *J Biol Chem* **261**, 15891-15894.
19. Miller CA, Leonard HS, Pinsky IG, Turner BM, Williams SR, Harrison L, Jr., Fletcher AF, Shen G, Bryant DA & Schluchter WM (2008) Biogenesis of phycobiliproteins. III. CpcM is

the asparagine methyltransferase for phycobiliprotein beta-subunits in cyanobacteria. *J Biol Chem* **283**, 19293-19300.

20. Ficner R, Lobeck K, Schmidt G & Huber R (1992) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* **228**, 935-950.

21. Chang WR, Jiang T, Wan ZL, Zhang JP, Yang ZX & Liang DC (1996) Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **262**, 721-731.

22. Womick JM, Liu H & Moran AM (2011) Exciton delocalization and energy transport mechanisms in R-phycoerythrin. *J Phys Chem A* **115**, 2471-2482.

23. Gaigalas A, Gallagher T, Cole KD, Singh T, Wang L & Zhang YZ (2006) A multistate model for the fluorescence response of R-phycoerythrin. *Photochem Photobiol* **82**, 635-644.

24. Ulijasz AT, Cornilescu G, Cornilescu CC, Zhang J, Rivera M, Markley JL & Vierstra RD (2010) Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form. *Nature* **463**, 250-254.

25. Rostkowski M, Olsson MH, Sondergaard CR & Jensen JH (2011) Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. *BMC Struct Biol* **11**, 6, doi: 1472-6807-11-6 [pii]

10.1186/1472-6807-11-6.

26. Bermejo Roman R, Alvarez-Pez JM, Acien Fernandez FG & Molina Grima E (2002) Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J Biotechnol* **93**, 73-85.

27. Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR & Leslie AG (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 271-281, doi: S0907444910048675 [pii]

10.1107/S0907444910048675.

28. Vagin A & Teplyakov A (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography* **30**, 1022-1025.

29. Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**, 2126-2132.

30. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS & Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21.

31. Kabsch W (1976) Solution for Best Rotation to Relate 2 Sets of Vectors. *Acta Crystallographica Section A* **32**, 922-923.