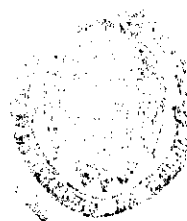


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Dpto. de BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



ARCHIVO

**ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA
MAYORITARIA DE LA CÁPSIDA DE LENTIVIRUS**



* 5 3 0 9 8 4 4 0 5 1 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Director: Francisco Gavilanes Franco

TESIS DOCTORAL

M^a BELÉN YÉLAMOS LÓPEZ

Madrid, Mayo de 1998



ARCHIVO

A mi familia y a José

La presente investigación se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas, bajo la dirección del Dr. Francisco Gavilanes Franco, al cual quiero expresar mi más profundo agradecimiento por su gran dirección y su apoyo en todo momento. Así mismo, quiero agradecer al Dr. José G. Gavilanes Franco el haber permitido mi incorporación al Departamento.

A todo mi grupo de investigación, al que he visto crecer desde que se produjo mi entrada en el L3. A Julián por su apoyo continuo y sus grandes consejos que me permitieron desenvolverme en el campo de la Biología Molecular. A Nacho, por su dedicación en mi primer año de tesis ya que me inició en la investigación de la estructura de proteínas. A Carmen y a Beatriz, las benjamins del grupo a las que deseo una feliz estancia en este laboratorio.

A Elena, ya que en ella no solo he encontrado una excelente compañera de trabajo sino también una gran amiga, que ha estado conmigo en todo momento. Y a Vivian, la viva reencarnación de la alegría y a la que me alegro mucho de haber conocido.

Y por supuesto, al resto del L3, dividido ya en varios laboratorios, con los que he pasado muy buenos momentos.

Al Dr. D.L. Peterson por permitirme mi estancia en su laboratorio y toda la ayuda prestada en el estudio de las proteínas que constituyen el eje central de esta Memoria.

A mi familia, por su constante apoyo en todo momento y en especial a mi abuela a la que siempre recordaré.

Y por último a José por apoyarme, animarme, aconsejarme, en fin, por estar siempre a mi lado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

RETROVIRUS	3
A. Morfología	3
B. Replicación y ensamblaje viral	5
C. Organización del genoma viral	7
D. Tipos de retrovirus	12
VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	16
VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA	17
PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDA LENTIVIRAL	19

OBJETIVOS	24
------------------------	-----------

MÉTODOS EXPERIMENTALES

1. Clonación, expresión y purificación de la proteína de la cápsida de EIAV	27
2. Clonación, expresión y purificación de la proteína de la cápsida de FIV	32
3. Obtención de las formas mutantes de la proteína de la cápsida de FIV	35
4. Técnicas de biología molecular	39
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)	40
6. Transferencia e inmunodetección	41
7. Enzimoinmunoensayo	41
8. Determinación de la concentración de proteína	42
9. Valoración de grupos tiólicos libres	43
10. Marcaje de cisteínas libres	43
11. Reducción y carboxiamidometilación	44
12. Oxidación y reducción de las proteínas	44
13. Dicroísmo circular	44
14. Predicción de estructura secundaria	45
15. Fluorescencia	46
16. Estudios de desnaturalización por urea	48

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (EIAV). PAPEL DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO EN EL MANTENIMIENTO DE LA ESTRUCTURA	52
1.A. CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EIAV-rp26	52
1.B. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE EIAV-rp26	56
1.C. PAPEL DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN EL MANTENIMIENTO DE LA ESTRUCTURA DE EIAV-rp26	65
1.D. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA rp26-HIS DE EIAV	91
2. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA (FIV). MECANISMO DE PLEGAMIENTO	95
2.A. CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE FIV-rp24 Y MUTANTES	96
2.B. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE FIV-rp24 Y MUTANTES	104
2.C. ESTUDIO DE DESNATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA rp24-FIV. MECANISMO DE PLEGAMIENTO.	118
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	141

ABREVIATURAS

BSA:	Albúmina de Suero Bovino
CA:	Proteína de la Cápsida
CAPS:	Ácido 3-(Ciclohexilamino)-1-propano sulfónico
CCA:	<i>Convex Constraint Analysis</i>
CD:	Dicroísmo Circular
CEAV:	Virus de la Encefalomiелitis-Artritis Caprina
CypA:	Ciclofilina A
DAB:	3,3'-diaminabencimida
DTNB:	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiamin-tetracético
EIAV:	Virus de la Anemia Infecciosa Equina
env:	Gen de la Envuelta
FIV:	Virus de la Inmunodeficiencia Felina
ΔG :	Variación de la energía libre de Gibbs
gag:	Gen Antígeno Específico de Grupo
HclGu:	Cloruro de guanidinio
HIV:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPLC:	Cromatografía Líquida a Alta Presión
IN:	Integrasa
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB:	Luria Bertani
LI:	Proteína de Unión
LTR:	<i>Long Terminal Repeat</i>
MA:	Proteína de la Matriz
MHR:	Región de Máxima Homología
NC:	Proteína de la Nucleocápsida
Nef:	Factor Negativo
NTA:	Ácido nitrilotriacético
ORF:	Marco de Lectura Abierto
PAGE-SDS:	Electroforesis en geles de poli(acrilamida) en presencia de SDS
PCR:	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>
pol:	Gen de la Polimerasa
PR:	Proteasa viral
Rev:	Proteína Reguladora de la expresión del gen
RMN:	Resonancia Magnético Nuclear
RT:	Transcriptasa inversa
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV:	Virus de la Inmunodeficiencia Simia
SU:	Glicoproteína de la Superficie
TAE:	Tris-acetato EDTA
Tat:	Proteína Transactivante
TCEP:	Tris(2-carboxietil)fosfina
TE:	Tris-EDTA
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TFA:	Ácido trifluoroacético
TM:	Glicoproteína Transmembranal

INTRODUCCIÓN

Con la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana, agente causante del SIDA, los Lentivirus han pasado a ser uno de los grupos de virus más estudiados. Esta familia se incluye dentro de los Retrovirus, caracterizados por la presencia de moléculas de RNA en el interior de la cápsida viral. La gran relación existente entre los lentivirus humanos y animales hace posible emplear estos últimos como modelos para el estudio de la biología molecular, la patogénesis y el tropismo celular de esta familia.

RETROVIRUS

El prefijo *retro-* (inverso) que antecede a la palabra virus deriva de la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, encargada de la síntesis del DNA vírico a partir del RNA pregenómico y que se encuentra dentro de los viriones de todos los miembros de esta familia. Los virus que pertenecen a esta familia guardan en común una serie de características morfológicas y genómicas que se detallarán a continuación. Dentro de esta familia hay tres subfamilias diferenciadas entre sí principalmente por su morfología, siendo más importantes las de los Oncovirus y Lentivirus, que engloban a una gran cantidad de virus de importancia veterinaria y clínica.

A. MORFOLOGÍA

Los viriones de los retrovirus son esféricos, de 80-100 nm de diámetro, y poseen una estructura única en tres capas (Narayan y Clements, 1990). Están constituidos por lípidos (30-35%), proteínas (60%) y RNA (2%) (Gelderblom et al, 1991). A modo de ejemplo, en la Figura 1 se recoge la estructura del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1). En esta figura se indican las diferentes proteínas de las que consta el virión, como las que aparecen en su superficie, glicoproteínas gp120 y gp41, muy importantes en el proceso de entrada del virus en la célula (Freed et al., 1995). En el interior se encuentra el complejo genoma-nucleoproteína, que incluye alrededor de treinta moléculas de la enzima transcriptasa inversa transcriptasa inversa, y supuestamente posee una estructura helicoidal. Esta estructura está situada dentro de una cápsida icosaédrica, que a su vez se encuentra rodeada por una

virus, y de cuya superficie emergen los peplómeros de glicoproteínas (Gelderblom *et al.*, 1989; Gelderblom *et al.*, 1991; Fukui *et al.*, 1993). Debido a su contenido en lípidos y proteínas, los retrovirus son inactivados por detergentes y disolventes de lípidos, así como por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos. Sin embargo, son más resistentes que otros virus a la luz ultravioleta o a los Rayos X, lo que puede ser debido a que su genoma es diploide.

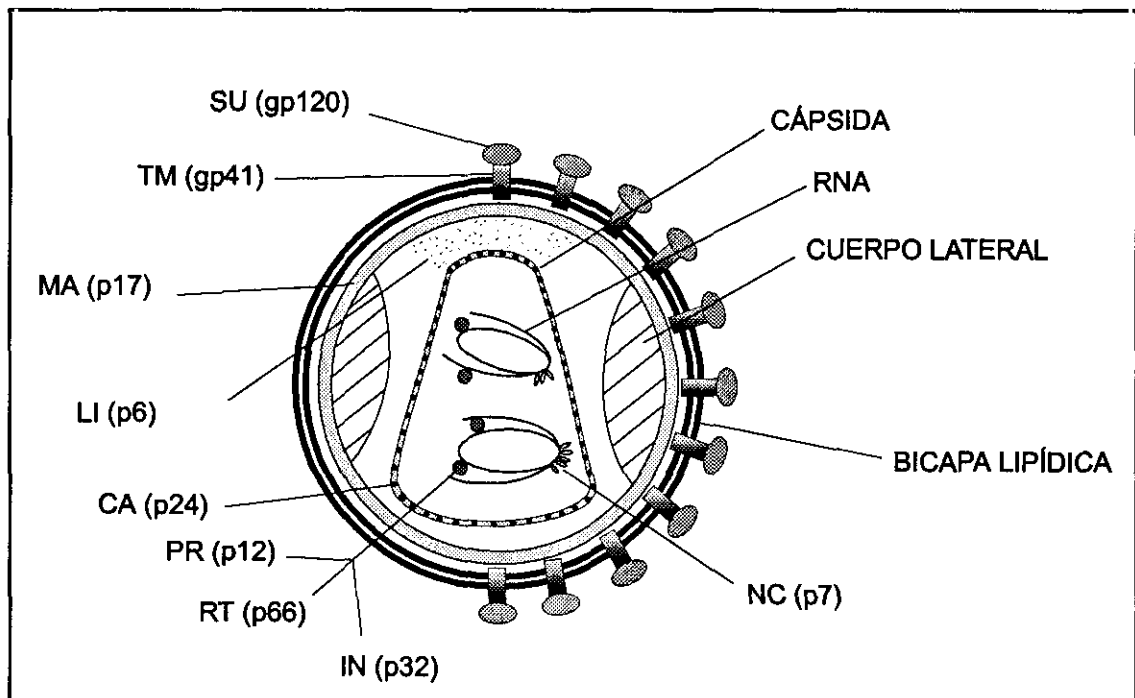


Figura 1. Esquema de la organización del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Gelderblom *et al.*, 1989). La cápsida del virión está constituido por la proteína CA (p24) y en su interior se encuentra el RNA viral asociado a enzimas como la transcriptasa inversa, RT (p66), la proteasa viral, PR (p12) o la integrasa, IN (p32) y a la proteína NC (p7). Esta cápsida se encuentra rodeada por una matriz formada por la proteína MA (p17). Una bicapa lipídica engloba a todos estos componentes y en ella está embebida la glicoproteína transmembranal, TM (gp41), unida a la glicoproteína de la superficie SU (gp120). La cápsida en forma de cono suele estar unida a la proteína MA a través de la proteína LI (p6) por su extremo más estrecho, mientras que el otro aparece libre. Paralelos al eje longitudinal de la cápsida se encuentran los cuerpos laterales, que pueden proceder de un exceso del precursor pr55 sin procesar o ser proteínas adicionales codificadas por el virus.

B. REPLICACIÓN Y ENSAMBLAJE VIRAL

En la Figura 2 se recoge el proceso de replicación viral. Después de la adsorción del virus a la célula mediante la interacción con receptores de la superficie celular (Fig. 2: 1,2), las glicoproteínas de la superficie fusionan la envuelta lipídica con la membrana plasmática con lo que la nucleocápsida con el RNA viral es liberado en el citoplasma (3). El receptor celular para el virus HIV-1 mejor caracterizado es la molécula CD4 (White y Littman, 1989; Robey y Axel, 1990; Capon y Ward, 1991; Allan, 1993). Otros receptores retrovirales identificados incluyen aminoácidos y transportadores, así como una molécula relacionada con el receptor de lipoproteínas (Freed, 1997). En el citoplasma el RNA es copiado a DNA por la transcriptasa inversa asociada al virión actuando como una DNA-polimerasa dependiente de RNA. La copia de DNAs de cadena sencilla es transformada en una de doble cadena por la misma enzima, actuando ahora como una DNA-polimerasa dependiente de DNA. El DNA de doble cadena entra en el núcleo de la célula infectada (4), donde se circulariza y se integra en el DNA de la célula huésped. El DNA integrado (provirus) sirve como molde para la producción tanto de mRNA (5) que es traducido a proteínas (6,7), como de RNA del virión, que es encapsulado en el virión progenie.

El virión se forma siguiendo dos procesos de ensamblaje, uno dirigido a la formación de la cápsida (6) y otro a la formación de la envuelta viral (7). La síntesis, el procesamiento y la glicosilación de la poliproteína de la envuelta se produce en el retículo endoplasmático. La poliproteína es transportada hacia la membrana plasmática de la célula huésped mediante la vía secretora. Allí se asocia con la membrana donde se hidroliza por la proteasa viral. Por otro lado, las proteínas estructurales y las enzimas que se encuentran en la cápsida se sintetizan en el citoplasma. La traducción y la miristoilación de las poliproteínas Gag y Gag-pol son seguidas por el ensamblaje en el citoplasma o bien en el lado citoplasmático de la membrana. Las poliproteínas Gag y Gag-pol, junto con el DNA del virión, se mueven hacia una posición en la membrana celular, el lugar donde las proteínas de la envuelta viral están ya presentes (Gelderblom *et al.* 1992; Hunter, 1994). La nucleocápsida se ensambla mediante una serie de roturas proteolíticas de la proteína producidas por la proteasa viral mientras tiene lugar el crecimiento de los viriones.

La replicación de los retrovirus se produce con una alta velocidad de mutación ya que la transcriptasa inversa carece de una función editora, y también a causa de la alta frecuencia de recombinación con otros genes de retrovirus y con genes celulares.

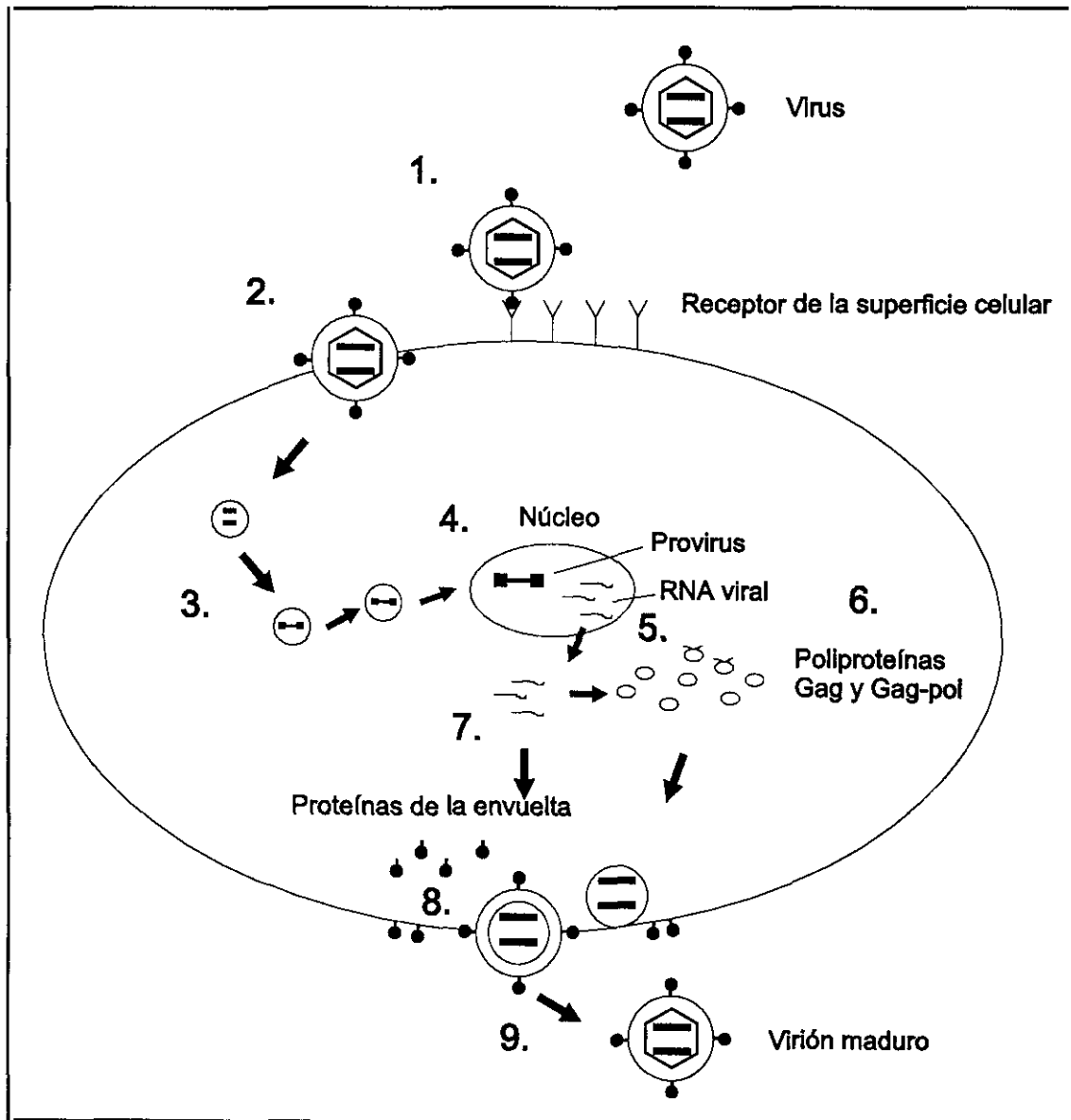


Figura 2. Esquema del ciclo de vida de retrovirus (Freed, 1997). Los pasos indicados son: (1) unión con el receptor de la superficie de la membrana plasmática de la célula huésped, (2) fusión con la membrana plasmática y liberación de la nucleocápsida, (3) transcripción inversa, (4) transporte nuclear e integración en el núcleo de la célula huésped, (5) transcripción y transporte del RNA viral, (6) traducción y transporte de las poliproteínas Gag y Gag-pol, (7) transporte de las proteínas de la envuelta viral, (8) ensamblaje y crecimiento del virus, y (9) condensación y maduración del virus.

C. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL

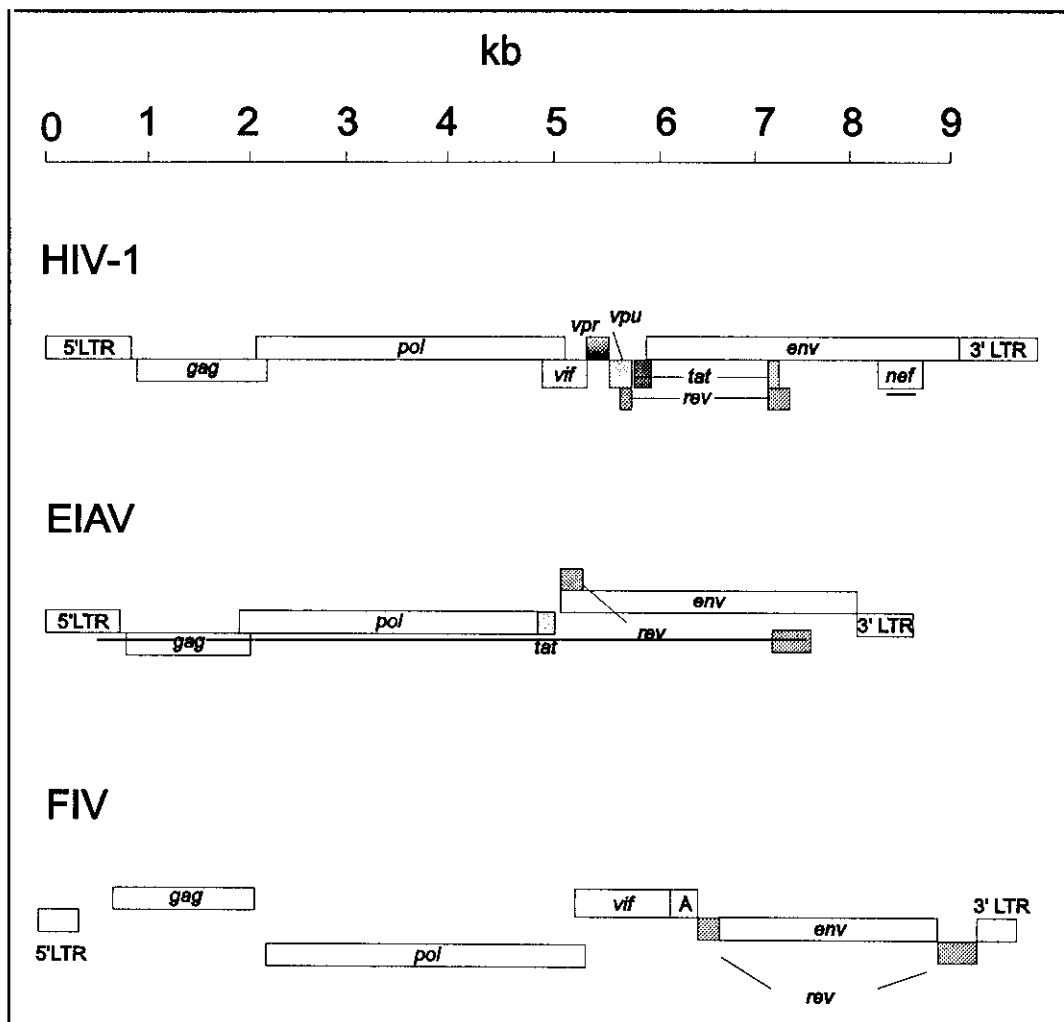


Figura 3. Organización del genoma de los lentivirus EIAV, FIV y HIV-1. En la figura se muestra la posición y el tamaño relativo de los marcos de lectura abierta de los tres virus. Flanqueando el DNA de los lentivirus se encuentran los LTRs 5' y 3'. En los tres genomas aparecen los principales genes *gag*, *env* y *pol*. La organización del genoma más compleja la presenta el HIV, donde hay hasta seis marcos de lectura abierta adicionales, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* y *nef*.

El genoma retroviral es diploide y comprende dos moléculas idénticas, unidas no covalentemente en sus extremos 5'. A ambos lados del genoma retroviral están los LTRs (*Long Terminal Repeats*). El LTR 5' contiene los elementos promotores de la transcripción y el LTR 3' proporciona la señal de poliadenilación (Clements y Wong-Staal, 1992). El genoma está formado por unas 10.000 bases y contiene tres genes principales que codifican las proteínas estructurales y enzimáticas. El gen *gag* (antígeno específico de grupo) codifica las proteínas del núcleo central del virión, el gen *pol* (polimerasa), codifica la transcriptasa inversa y el gen *env* (envuelta) codifica

las proteínas de los peplómeros del virión (Clements y Wong-Staal, 1992). Los lentivirus tienen una organización genómica más compleja que el resto de los retrovirus, pues además de los genes *gag*, *pol* y *env*, contienen marcos de lectura abiertos (ORF) adicionales localizados entre el gen *pol* y el *env*, así como diferentes exones tanto dentro como en el extremo 3' del gen *env* (Cullen y Greene, 1990; Carpenter y Alexander, 1992; Cullen, 1992; Miyazawa *et al.*, 1994) (Fig. 3). Estos genes actúan como reguladores modulando el ciclo viral "*in vitro*" y, probablemente, "*in vivo*" contribuyen a los mecanismos tanto de latencia clínica como patogénicos. Un ejemplo de este complejo genoma se encuentra en la Figura 3, en la que además de los genomas de EIAV y FIV se representa el más complejo de los genomas retrovirales, el del HIV-1, que posee hasta seis marcos extra de lectura abierta (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*) cuya función se comentará más adelante (Cullen y Greene, 1990; Schwartz *et al.*, 1990; Miyazawa *et al.*, 1994).

- El gen retroviral *gag* codifica las principales proteínas estructurales del virión y es requerido para el ensamblaje y liberación de las partículas (Reicin *et al.*, 1996). Las poliproteínas Gag pueden ser ensambladas y liberadas de las células como partículas víricas en ausencia de otros genes virales, lo que sugiere que *gag* es el único gen viral esencial para el proceso de ensamblaje (Karacostas *et al.*, 1989; Mergener *et al.*, 1992; Royer *et al.*, 1992, McGuire *et al.*, 1994; Klikova *et al.*, 1995; Sakalian *et al.*, 1996).

El producto del gen *gag* se traduce en polirribosomas libres a partir de un mRNA inmaduro. El precursor *gag* sigue uno de los dos caminos de la morfogénesis viral (Gelderblom *et al.*, 1990). En la mayoría de los retrovirus las poliproteínas Gag son transportadas directamente a la membrana plasmática, donde se produce simultáneamente el ensamblaje de la cápsida y la extrusión de la membrana. Entre los virus que siguen este camino está el virus aviario de tipo C y los virus de leucemia/sarcoma de mamíferos, así como los virus patogénicos de la leucemia humana y el HIV. En el caso de la segunda clase de virus, los precursores parecen dirigirse hacia un lugar intracitoplasmático donde se produce el ensamblaje de la cápsida (Rhee y Hunter, 1991). Estas partículas ensambladas inmaduras son entonces transportadas hacia la membrana plasmática donde comienzan a crecer y envolverse. Entre los virus que siguen este proceso están los virus del tumor mamario de ratón de tipo B y los de mono Mason-Pfizer de tipo D, junto con los miembros de la familia de espumavirus (Gelderblom *et al.*, 1990).

La poliproteína precursora de 55-57 kDa codificada por el gen *gag*, Pr55Gag es procesada proteolíticamente por la proteasa viral (Henderson *et al.*, 1987; Kawakami *et al.*, 1987; Hussain *et al.*, 1988; Rushlow *et al.*, 1992; Tözser *et al.*, 1993; Schnölzer *et al.*, 1996) originando la proteína de la matriz p17 (MA), de la cápsida p24 (CA), y la proteína p15 de la nucleocápsida. La proteína p15, que está localizada en el extremo carboxilo-terminal del precursor Pr55Gag, a su vez es procesada dando lugar a la proteína p7 (NC), que forma realmente la nucleocápsida, la proteína p6 rica en prolinas, y dos péptidos pequeños, p1 (Dannull *et al.*, 1994) y p2. La proteína p7 es la que se une a las moléculas de RNA viral; posee motivos de dedos de zinc (*zinc fingers*) constituidos por residuos de cisteína (Cys-X₂-Cys-X₉-Cys), característicos de las proteínas que se unen a ácidos nucleicos (Green y Berg, 1989; Narayan y Clements, 1990; Gorelick *et al.*, 1996). La proteína NC también cataliza la formación del dímero de RNA genómico que se encuentra en las partículas víricas (Darlix *et al.*, 1990). La proteína p6 tiene como función unirse a la proteína Vpr, dando como resultado la incorporación de esta proteína accesoria dentro del virión (Kondo *et al.*, 1995). El papel de p1 es todavía desconocido, mientras que p2 parece participar en la regulación de la velocidad del procesamiento del precursor Gag (Pettit *et al.*, 1994; Krausslich *et al.*, 1995). La proteína mayoritaria es la que forma la cápsida viral, que adquiere una estructura en forma de cono (Takasaki *et al.*, 1997) y es uno de los principales antígenos en la infección por estos virus (Gelderblom *et al.*, 1989; Höglund *et al.*, 1992). Esta proteína induce anticuerpos que inactivan la infectividad del virus (Ada, 1988) y por ello los estudios para conseguir una vacuna contra el HIV se basan en la producción de anticuerpos frente a esta proteína. Otra proteína importante codificada por este gen es p17, proteína de la matriz, localizada en el extremo amino-terminal del precursor Pr55Gag. La proteína p17 tiene múltiples funciones estructurales y fisiológicas (Wills y Craven, 1991). En los pasos iniciales del ciclo viral, la proteína p17 puede estar implicada en la penetración del virión en las células y en la infectividad viral (Crawford y Goff, 1984; Yu *et al.*, 1992a; Wang y Barklis, 1993). En los últimos estados del ciclo viral la proteína p17 es un factor importante en la morfogénesis del virión a través de su papel en el transporte intracelular (Fäcke *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1993), en la señalización de la membrana plasmática para el precursor del Gag, en el crecimiento extracelular de los viriones a partir de la membrana celular (Bryant y Ratner, 1990; Gelderblom, 1991; Spearman *et al.*, 1994) y en la incorporación en el virión de glicoproteínas virales (Yu *et al.*, 1992a; Yu *et al.*, 1992b; Dorfman *et al.*, 1994a). Esta proteína interacciona con la membrana viral a través de su extremo amino-terminal, que sufre una modificación post-trasduccional consistente en la incorporación de ácido mirístico. Esta miristoilación es requerida para la eficiente asociación a la membrana y la formación

del virus (Göttlinger *et al.*, 1989; Pal *et al.*, 1990). En el caso del virus HIV-1 se ha identificado un dominio de unión a membranas dentro del extremo amino-terminal de la proteína p17. Este fragmento consiste en un conjunto de 14 aminoácidos del extremo amino-terminal miristoilado y una región muy básica que se une a fosfolípidos ácidos (Zhou *et al.*, 1994). Este último aspecto se ha comprobado mediante estudios de unión del virión a membranas modelo (Ehrlich *et al.*, 1996). La estructura cristalina de la proteína MA ha sido ya determinada (Hill *et al.*, 1996; Massiah *et al.*, 1996). Esta estructura revela que las moléculas individuales están compuestas por cinco hélices principales unidas por la parte superior por una lámina β mixta de tres cadenas. La proteína trimeriza y es esta trimerización la que crea una superficie de unión a la membrana, en la cual los residuos básicos expuestos podrían cooperar con los grupos miristoilo del extremo amino-terminal para unir la proteína al interior ácido de la membrana del virus.

- Los productos del gen *pol* son sintetizados inicialmente como una proteína de fusión Gag-pol de 160 kDa (Jacks *et al.*, 1988). Este precursor puede ser autocatalíticamente procesado dando lugar a las enzimas proteasa de 9 kDa (PR), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN), así como a proteínas maduras de la cápsida. La proteasa viral, PR, se encarga de procesar, autocatalíticamente, las proteínas precursoras codificadas por otros genes.

- El gen *env* codifica las proteínas glicosiladas que se encuentran insertadas en la envoltura viral. Inicialmente se sintetizan en forma de un precursor que sufre una proteólisis post-trasduccional por acción de una proteasa celular (Stein y Engleman, 1989; Gelderblom *et al.*, 1991), lo que origina una proteína que atraviesa la membrana viral, gp40-50, y una proteína superficial, gp120-135. Esta rotura es necesaria para dar lugar a la infectividad viral (McCune *et al.*, 1988; Hunter y Swanston, 1990). Las glicoproteínas transmembranales tienen una serie de características en común: un fragmento de aminoácidos hidrofóbicos, una región rica en residuos de treonina y serina, una serie de aminoácidos con una alta probabilidad de formar una estructura en α -hélice, dos o tres residuos de cisteína próximos y los sitios de N-glicosilación que están seguidos por el dominio de unión de la glicoproteína a la membrana. El significado funcional de algunas de estas características conservadas de esta proteína ha sido ampliamente estudiado. Así, mediante mutaciones introducidas en las secuencias hidrofóbicas del extremo amino-terminal de gp41 de HIV-1 se reduce enormemente la capacidad de formar agregados (sincitios) de los virus mutantes (Kowalski *et al.*, 1991). El dominio hidrofóbico que se encuentra en el amino-terminal está implicado en el proceso de fusión entre la

membrana viral y la de la célula huésped, y es sólo activo después de la rotura del precursor (Fass *et al.*, 1996). También la sustitución de dos residuos de cisteína próximos entre sí altamente conservados por otros residuos de aminoácidos afectan al procesamiento del precursor gp160, lo que sugiere que el puente disulfuro formado entre estas dos cisteínas es importante para la maduración de la proteína de la envuelta (Syu *et al.*, 1991). El segundo dominio hidrofóbico de la proteína se expande en la membrana y se encarga de unir la glicoproteína a la membrana. La glicoproteína superficial gp120 está altamente glicosilada, aproximadamente la mitad de la masa molecular de la proteína está compuesta por oligosacáridos (Allan *et al.*, 1985). Forma las protuberancias observadas en la superficie del virus y contiene las regiones que interaccionan con el receptor celular así como los epítomos para la neutralización del virus (Carpenter y Alexandersen, 1992). En la Tabla 1 se resumen las diferentes proteínas virales y la función que desempeñan.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Gag	
Matriz (MA)	Señalización de la membrana para Gag Incorporación de Env en el virión
Cápsida (CA)	Ensamblaje del virus
Nucleocápsida (NC)	Unión a RNA
Proteasa (PR)	Rotura de los precursores Gag y Gag-pol
Pol	
Transcriptasa inversa (RT)	Transcripción inversa del genoma viral
Integrasa (IN)	Integración del DNA viral en el genoma huésped
Env	
Superficie (SU)	Receptor de unión
Transmembrana (TM)	Fusión de la membrana

Tabla 1. Proteínas retrovirales resultantes de la expresión de los genes *gag*, *pol* *env* y función que desempeñan en el virus.

D. TIPOS DE RETROVIRUS

La familia de los retrovirus comprende tres subfamilias, *Oncovirus*, *Lentivirus* y *Espumavirus*. En la Tabla II se recogen algunos ejemplos representativos de las tres subfamilias y en la Figura 4 se representan de manera esquemática algunos miembros de estas subfamilias (Gelderblom *et al.*, 1991). Sus características más importantes se detallan a continuación:

- **ONCOVIRUS:** este grupo comprende virus tumorigénicos. Dentro de esta subfamilia pueden distinguirse cuatro subtipos de virus, que se diferencian principalmente en su morfología, y son denominados de tipo A, B, C y D. Las partículas de **tipo A** se forman en el citoplasma de la célula infectada, migran hasta la superficie celular y allí son envueltas por la membrana plasmática, formando los virus de **tipo B**, como el virus del tumor mamario de ratón, que muestra una cápsida excéntrica cuando ha madurado. Los virus de **tipo C**, tienen un cápsida simétrica y central, formada a la vez que se produce la salida del virus de la célula. En su superficie posee glicoproteínas. A este grupo pertenecen los oncovirus de importancia veterinaria que causan sarcomas y linfomas en pollos, gatos y ratones. En las partículas de **tipo D** el núcleo central ya se encuentra formado cuando se produce la salida; al principio posee una forma esférica, pero cuando el virión ha madurado adquiere una forma elongada.

El genoma de esta subfamilia posee, además de los tres genes principales, un cuarto gen, el oncogen viral (*v-**onc***). La presencia de este gen está normalmente asociada a la supresión de algunas bases de la secuencia del gen *env*, por lo que la mayoría de los oncovirus que lo contienen son incapaces de sintetizar una envuelta completa y no son competentes en la replicación. Se encuentran asociados con virus competentes que ayudan en la replicación de otros virus.

- **ESPUMAVIRUS:** el potencial patogénico de los espumavirus aún no es conocido. Se encuentran frecuentemente como contaminantes en cultivos celulares, actuando como virus citopáticos. Estos virus se caracterizan por la formación de vacuolas que se cree que son el resultado de un alto nivel de ensamblaje intracelular y de la formación de agregados inducida por una expresión de la glicoproteína de la envuelta viral (Freed, 1997). Las partículas son esféricas (100-140 nm) y consisten en una cápsida anular rodeada de una bicapa lipídica, cubierta de glicoproteínas. El gen *env* codifica esta estructura que posee un dominio transmembranal y otro superficial. Las cápsidas de estos virus se forman con anterioridad a la formación de su envuelta, y tienen una forma esférica antes de la maduración.

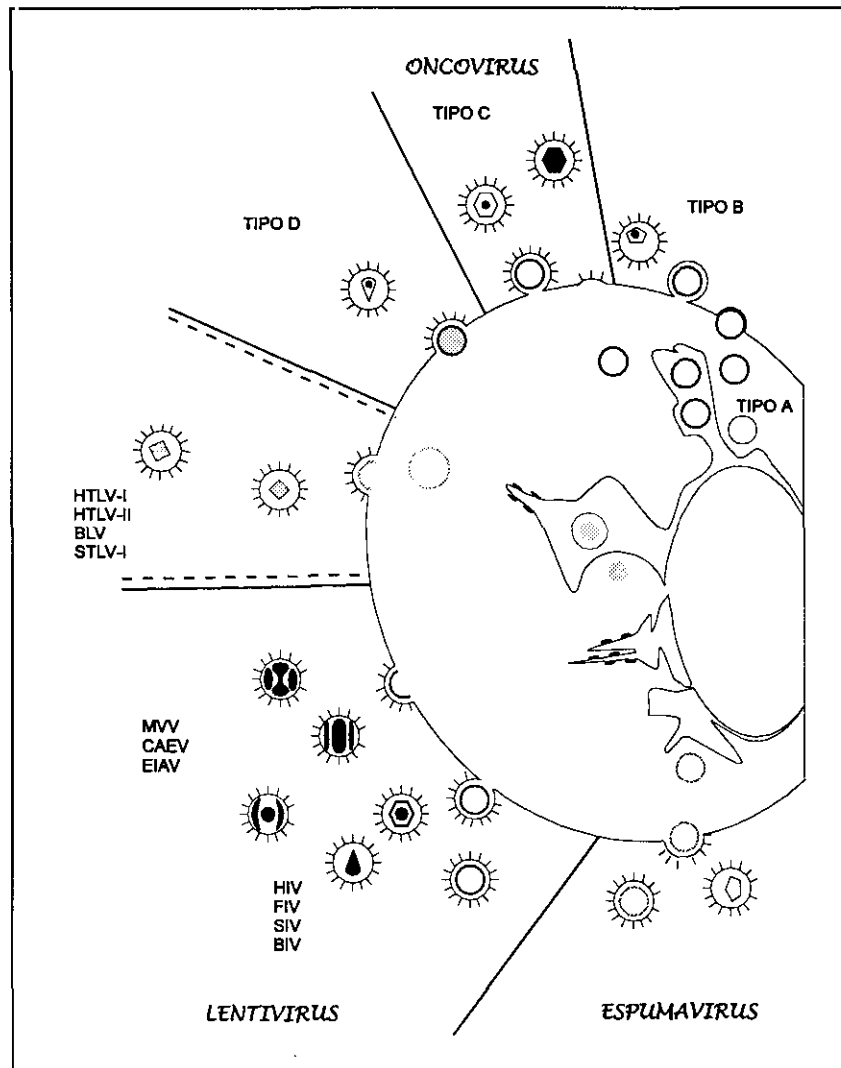


Figura 4. Representación esquemática de los componentes de la familia de los retrovirus (Gelderblom *et al.*, 1991). Los oncovirus comprenden las partículas de tipo A, B, C y D. Las partículas A son los núcleos centrales de las partículas de tipo B preformados en el citoplasma de la célula huésped. Estos núcleos migran hacia la membrana de la célula y forman un virión inmaduro. Este virión, después de una maduración morfológica, da lugar a una partícula con un núcleo central isométrico excéntricamente localizado. En el caso de las partículas de tipo C, el núcleo central se forma a la vez que se produce la salida del virión. Los viriones de tipo D se forman por la envoltura de su núcleo central previamente formado en el citoplasma. El HTLV-1 y los virus relacionados (HTLV-I, HTLV-II, BLV y STLVI) constituyen un grupo intermedio con características comunes tanto a los oncovirus de tipo C como a los lentivirus. Los lentivirus tienen un núcleo central que se forma a la vez que se produce la salida del virus de la célula. Este núcleo central madura después hasta alcanzar una forma de cono. Los espumavirus presentan una envoltura de los núcleos centrales formados en el citoplasma. Las abreviaturas empleadas son: HTLV-1, virus de la leucemia T humana de tipo 1; HTLV-II, virus de la leucemia T humana de tipo 2; BLV, virus de la leucemia bovina; STLVI, virus de la leucemia simia de tipo 2; MVV, virus de Maedi-visna, CAEV, virus de encefalomiелitis-artritis caprina; EIAV, virus de la anemia infecciosa equina; HIV, virus de la inmunodeficiencia humana; SIV, virus de la inmunodeficiencia simia; FIV, virus de la inmunodeficiencia felina; BIV, virus de la inmunodeficiencia bovina.

● **LENTIVIRUS:** constituyen una subfamilia cuyo nombre deriva del curso lento de las infecciones que producen tanto en humanos como en animales (Haase, 1986). Todas las infecciones causadas por lentivirus tienen una serie de características clínicas en común: largos períodos de incubación, enfermedad multiorgánica, fuerte respuesta inmune y un final invariablemente fatal (Clements y Zink, 1996). En la Tabla II se recogen algunos ejemplos de lentivirus. El primer lentivirus identificado fue el EIAV, aislado por Vallee y Carree de un caballo con anemia hemolítica en 1904 (Vallee y Carree, 1904). A partir de entonces se han encontrado en una gran variedad de especies, incluyendo primates y el hombre. En 1983 fue aislado el HIV por Montaigner y Gallo (Gallo *et al.*, 1984; Gallo y Montaigner, 1988). Difieren de los oncovirus en detalles de su morfología, composición química así como en la aparición de una nucleocápsida en los viriones maduros. Su membrana tiene mayor grosor y sus cápsidas adquieren una forma de cono alargado que se puede observar mediante estudios ultramicroscópicos (Gelderblom *et al.*, 1989; Fukui *et al.*, 1993; Nakai y Goto, 1996; Takasaki *et al.*, 1997). En función de la manifestación de la enfermedad que producen, los lentivirus pueden dividirse en virus que causan inmunodeficiencia y virus que causan enfermedades específicas en órganos mediadas por respuesta inmune. Entre los primeros se encuentran los virus de primates y humanos (HIV-1, HIV-2, SIV *mac*) y el virus de inmunodeficiencia felina (FIV). Entre los segundos se encuentran el virus de la encefalitis y artritis caprina (CAEV), o el virus visna, que inducen una enfermedad crónica inflamatoria, y el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) que induce una anemia hemolítica seguida de una enfermedad crónica.

La expresión génica de lentivirus está caracterizada por dos fases, temprana y tardía, aunque la transcripción del RNA viral siempre da lugar a la síntesis de un mRNA de cadena completa que sirve como el genoma viral así como el mRNA para los genes *gag* y *pol*. El procesamiento del mRNA viral se produce en el núcleo de la célula infectada, y los niveles de mRNA maduro e inmaduro que están en el citoplasma de la célula están controlados por las proteínas reguladoras Tat y Rev. Durante la fase temprana de la expresión génica, las únicas transcripciones en el citoplasma son de mRNAs que codifican a las proteínas Tat, Rev y Nef. Por el contrario, en la fase tardía, mRNAs virales inmaduros y maduros están presentes en el citoplasma. El gen *tat* funciona incrementando la expresión del gen viral a niveles transcripcionales y postranscripcionales (Cullen y Greene 1990; Clements y Wong-Staal, 1992). La proteína Rev facilita el transporte de mRNAs virales inmaduros desde el núcleo así como su asociación con poliribosomas (Ahmed *et al.*, 1991; Arrigo y Chen, 1991). Esta proteína funciona mediante la unión de su dominio básico a elementos de RNA altamente estructurados presentes en los genes *env* (Cochrone *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1990). La expresión de RNA inmaduro que codifica las

proteínas estructurales del núcleo central viral (proteínas Gag) y las enzimáticas del gen *pol*, así como del mRNA maduro del gen *rev*, es dependiente de la proteína *Rev*. La expresión génica tardía es iniciada cuando hay suficiente proteína Rev en la célula para facilitar el transporte de mRNA viral para estas proteínas estructurales y enzimáticas.

Subfamilia	Huésped	Virus	Enfermedad
Oncovirus	Pollo	V. leucosis aviaria (ALV)	Linfomas, leucemia, anemia
	Vaca	V. leucemia bovina (BLV)	Leucemia
	Gato	V. leucemia felina (FeLV)	Leucemia
Lentivirus	Ovejas	V. maedi-visna (MLV)	Encefalitis, neumonía intersticial
	Caballo	V. anemia infecciosa equina (EIAV)	Anemia hemolítica
	Vaca	Virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV)	Linfocitosis, linfadenopatía
	Cabra	Virus de la encefalitis-artitis caprina (CAEV)	Artritis, encefalomiелitis
	Mono	V. inmunodeficiencia simia (SIV)	Inmunodeficiencia
	Gato	V. inmunodeficiencia felina (FIV)	Inmunodeficiencia
	Humano	V. inmunodeficiencia humana (HIV)	Inmunodeficiencia, SIDA
Espumavirus	Vaca	V. bovino (BFV)	Infecciones inaparentes

Tabla II. Ejemplos de virus pertenecientes a las tres subfamilias de los retrovirus.

VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

El virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) tiene una gran importancia veterinaria, ya que afecta a todos los integrantes de la especie equina y está ampliamente difundido en todo el mundo (Montelaro, 1994). El conocimiento de que este virus estaba relacionado tanto genética como antigénicamente con el virus HIV-1 (Gonda, 1988), hizo que su estudio adquiriese mayor importancia, pues permitía obtener información general acerca de la patogénesis causada por los lentivirus. El EIAV, como otros retrovirus, sufren una gran variación antigénica durante la infección viral, fenómeno que únicamente ocurre en las infecciones donde el virus induce anticuerpos neutralizantes. Este virus es transmitido por moscas y mosquitos y se trata del único virus transmitido por esta vía (Narayan y Clements, 1990).

La infección viral clásica comprende tres fases de interacción entre el agente viral y la célula huésped (Narayan y Clements, 1990): (a) el período de diseminación del virus hacia las células diana y la infección en el hospedador, (b) el período de replicación del virus, y (c) el período de eliminación del virus. La enfermedad se origina o bien por efectos patológicos directos observados de la replicación viral en células, o bien por las consecuencias inmunopatológicas asociadas con la eliminación del virus. En muchos casos, estas fases se completan en días o semanas. El EIAV difiere del resto de los lentivirus en el tiempo de inducción de la enfermedad. A diferencia de otros lentivirus caracterizados por producir enfermedades de curso progresivo, lento y crónico, la infección por EIAV tiene un curso rápido y variable. Después de la exposición al virus, los caballos experimentan una enfermedad de curso variable, pudiendo ser aguda, crónica o inaparente (Carpenter y Alexandersen, 1992). El estado agudo de la enfermedad se asocia a la exposición inicial al virus. En la forma crónica tienen lugar fases de anemia, edema, pérdida de peso y depresión, intercaladas con períodos de tranquilidad. Por último, en la tercera forma de la enfermedad, clínicamente inaparente, los caballos no exhiben los signos clínicos asociados con las formas aguda y crónica, pero son portadores del virus. La distinción entre el estado crónico y agudo depende de la capacidad del animal infectado para sobrevivir al inicio de la replicación del virus. La respuesta inmune, que normalmente está asociada con la recuperación de una infección puede ser inducida por vacunas que protejan frente a la enfermedad. La creación de una vacuna se puede llevar a cabo mediante varios procedimientos, incluyendo el uso de virus activos con virulencia atenuada (como en el caso del virus del sarampión), de virus inactivados (como en el poliovirus) o subunidades virales (como el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B).

El sistema de EIAV ha sido muy útil como modelo para examinar la eficacia de diferentes estrategias de vacunas en la infección de lentivirus. Se han empleado vacunas consistentes en la utilización del virus inactivado, vacunas compuestas de glicoproteínas de la envuelta viral purificadas y una vacuna compuesta de glicoproteínas de la superficie viral expresada en baculovirus (rgp90) (Issel *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994; Montelaro y Bolognesi, 1995). Los resultados de estos estudios revelan que hay un amplio intervalo de eficacia para prevenir la infección por EIAV y la enfermedad. Por ejemplo, la vacuna del virus inactivado y la compuesta de glicoproteínas de la envuelta viral purificadas proporcionan una protección del animal frente a una infección homóloga por EIAV. Sin embargo, no previenen la infección heteróloga por una variante antigénica de EIAV. La vacuna rgp90 es incapaz de proteger al animal frente a una infección homóloga o heteróloga por EIAV. El gran intervalo de eficacia observado se puede emplear para identificar las respuestas inmunes características de protección.

VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA

El virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) fue aislado en 1986 de un gato seronegativo frente al virus de la leucemia felina (FeLV) pero con infecciones oportunistas (Pedersen *et al.*, 1987). Está clasificado como un lentivirus en función de la morfología del virión, la actividad de la transcriptasa inversa dependiente de Mg^{2+} , y la tendencia a inducir una infección persistente en gatos (Pedersen *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1988; Olmsted *et al.*, 1989a).

La infección por FIV está ampliamente difundida entre felinos tanto domésticos como salvajes (Pedersen *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1989; Olmsted *et al.*, 1992) y actualmente se considera como un modelo de estudio para la infección inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana (Letvin, 1990; Johnson *et al.*, 1991; Bendinelli *et al.*, 1993; Willett *et al.*, 1997). La inmunopatogénesis y la enfermedad clínica observadas en gatos infectados natural o experimentalmente son muy similares a las del SIDA (Pedersen, 1993). Se caracteriza por una progresiva disminución en el número de células CD4+ circulantes y una inversión asociada de la relación CD4:CD8 (Pedersen *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1988; Ackley *et al.*, 1990; Novotney *et al.*, 1990; Torten *et al.*, 1991). Durante la fase aguda de la infección por FIV, la inversión de la relación CD4:CD8 viene determinada por un incremento en las células T CD8+, expresando bajos niveles de CD8 y de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC) (Willett *et al.*, 1993). Los datos sugieren que,

como ocurre con la infección de HIV en humanos, el daño principal en los gatos infectados por FIV es un impedimento de la función auxiliadora de las células T. La observación de que humanos, monos y gatos pueden ser infectados por HIV, SIV y por FIV, respectivamente, durante largo períodos de tiempo sin que experimenten una enfermedad clínica, sugiere que los mecanismos inmunes naturales de los organismos huéspedes son capaces de inhibir el desarrollo de la infección viral (Bolognesi, 1993; Levy, 1993).

En la infección por FIV se distinguen seis estados: (a) el primer estado está asociado a grados variables de fiebre, leucopenia, neutropenia y en algunas ocasiones diarrea. Una linfadenopatía generalizada aparece a menudo y puede persistir desde unas cuantas semanas hasta varios meses antes de desaparecer. (b) En este estado los niveles de células T CD4+ bajan significativamente tras de la infección primaria y después continúan bajando lentamente. (c) Este tercer estado es parecido al estado de linfadenopatía progresiva que aparece en la infección por HIV. Se producen pérdidas de peso, letargía, depresión, fiebres. (d) El cuarto estado coincide con el fallo del sistema inmune. Está caracterizado por infecciones crónicas secundarias que inicialmente responden a terapia pero esta respuesta disminuye cuando se alcanza el quinto estado. (e) El quinto estado se asocia con pérdidas de peso mayores del 20%. En la mayoría de los gatos infectados hay grados variables de anemia, neutropenia o linfopenia e infecciones oportunistas. (F) Por último, el sexto estado lo presentan aquellos gatos que desarrollan enfermedades neurológicas, inmunológicas o neoplásicas sin signos aparentes de inmunodeficiencia adquirida.

Al igual que el EIAV, este lentivirus se ha empleado como modelo para desarrollar una vacuna dirigida a prevenir la infección por FIV y los lentivirus relacionados. Estas posibles vacunas incluyen el virus inactivado (Yamamoto *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1993; Hosie *et al.*, 1995), células infectadas pero inactivadas, subunidades recombinantes y sintéticas. Estas últimas comprenden proteínas de FIV recombinantes expresadas en células de mamíferos usando sistemas de expresión del virus vaccinia o baculovirus (Lutz *et al.*, 1995; Siebelink *et al.*, 1995) y en células procariontas como la bacteria *E. coli* (Hosie *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 1995; Verschoor *et al.*, 1996). Los resultados experimentales indican que la protección frente a virus homólogos o cepas relacionadas se ha conseguido sólo con vacunas que incluyen el virus inactivado o células infectadas inactivadas pero no con vacunas de subunidades recombinantes. La protección frente a cepas de FIV antigénicamente distintas aún no se ha conseguido.

Como el HIV-1, HIV-2 y SIV (Steffan *et al.*, 1986; Schmitt *et al.*, 1990; Schmitt *et al.*, 1991), FIV puede replicar en células Kuppfer de hígado después de la infección de cultivos celulares *in vitro* por el virus libre (Martin *et al.*, 1995), lo que sugiere que estas células pueden jugar un papel en la fisiopatología de la infección por FIV.

PROTEÍNAS DE LAS CÁPSIDA LENTIVIRAL

El principal producto del gen *gag* de lentivirus es una proteína (CA) de 24-26 kDa que constituye la cápsida del virus. Los estudios de microscopía electrónica muestran que dicha proteína oligomeriza adoptando una forma tubular, en forma de cono doblemente truncado, en cuyo interior aparece el material genético del virus (Gelderblom *et al.*, 1989; Höglund *et al.*, 1992; Fukui *et al.*, 1993).

Como se ha dicho anteriormente, las proteínas estructurales y las enzimas que se encuentran en la cápsida son sintetizadas en el citoplasma a partir de las poliproteínas precursoras Gag y Gag-pol. Ambas poliproteínas son trasladadas a la membrana plasmática, teniendo lugar el ensamblaje en el lado citoplasmático de la membrana celular, a la vez que se produce el crecimiento y la liberación de las partículas víricas. A la liberación de las partículas le sigue un proceso de maduración, que supone la rotura proteolítica de las poliproteínas Gag y Gag-pol por la proteasa viral, cuyo resultado es la formación del virus maduro infeccioso (Debrouck *et al.*, 1987; Kohl *et al.*, 1988). La fase de ensamblaje está dividida a su vez en dos estados caracterizados por la diferente morfología de la estructura que se encuentra en el interior de la envuelta viral. En las partículas inmaduras es esférica, mientras que en las partículas maduras tiene forma de cono y está localizada excéntricamente (Gelderblom *et al.*, 1987; Chrystie y Almeida, 1988; Hockley *et al.*, 1988). La formación de la partícula inmadura y su maduración son muy sensibles a mutaciones en los genes *gag* y *pol*, lo que indica que hay regiones en Gag y Gag-pol que contienen información necesaria para varios aspectos del ensamblaje de los lentivirus.

Cuando se expresa el precursor Gag en ausencia de la proteasa viral se producen partículas similares a las del virus. Este hecho ha convertido a este sistema de expresión en la base para el análisis experimental de los factores requeridos para el ensamblaje y la secreción (Gheysen *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1990; Royer *et al.*, 1991; Jowett *et al.*, 1992). Así, la importancia de la proteína CA en el proceso de ensamblaje se demostró por primera vez cuando se comprobó que moléculas de Gag con deleciones en la CA son incapaces de ensamblarse (Trono *et al.*, 1989).

Posteriores estudios han permitido definir una serie de regiones en CA requeridas para el ensamblaje (Trono *et al.*, 1989; Von Poblitzki *et al.*, 1993; Wang y Barklis, 1993; Mammano *et al.*, 1994; Franke *et al.*, 1994a; Chazal *et al.*, 1995; Reicin *et al.*, 1995). Se sugiere que el extremo carboxilo-terminal, una región en la cual la homología de secuencia entre las proteínas de las cápsidas de lentivirus es máxima, es la región crucial para el ensamblaje (Wang y Barklis, 1993; Chazal *et al.*, 1994; Franke *et al.*, 1994a; Mammano *et al.*, 1994). En otros estudios, utilizando mutantes de delección de la proteína CA se comprobó que dicha proteína está dividida en dos regiones (Jowett *et al.*, 1992; Von Poblitzki *et al.*, 1993; Dorfman *et al.*, 1994b; Reicin *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 1997), el extremo amino-terminal y un dominio carboxilo-terminal, siendo este último donde se producen los contactos entre las moléculas de Gag, que resultan esenciales para el ensamblaje de la partícula (Zhang *et al.*, 1996). En el extremo carboxilo-terminal, que también ha sido implicado en la dimerización de la proteína (Gitti *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 1997), en la oligomerización del precursor Gag (Franke *et al.*, 1994a) y en la formación el virus, existe un fragmento de unos 20 aminoácidos denominado MHR ("*Major Homology Region*"), que se encuentra en todos los oncovirus y lentivirus conocidos, así como en el trasposón inverso de levaduras (Patarca y Haseltine, 1985; Wills y Craven, 1991; Orlinsky *et al.*, 1996). Su función precisa no es conocida, ya que diferentes mutaciones en esta región bloquean la replicación en diferentes fases, incluyendo el ensamblaje (Mammano *et al.*, 1994; Craven *et al.*, 1995; Orlinsky *et al.*, 1996), la maduración (Mammano *et al.*, 1994; Craven *et al.*, 1995) y las etapas más tempranas de la infectividad (Strambio-de-Castillia y Hunter, 1992; Craven *et al.*, 1995; Orlinsky *et al.*, 1996). En estudios realizados con el extremo amino-terminal, se observó que deleciones e inserciones en dicho extremo no inhiben el proceso de ensamblaje, pero sí la formación de viriones maduros (Wang y Barklis, 1993; Reicin *et al.*, 1995). Según esto, distintas zonas del dominio amino-terminal de la proteína CA pueden ser necesarias para el correcto procesamiento proteolítico del precursor Gag o para que se produzcan los contactos CA-CA necesarios para la formación de la cápsida. Por todo ello, la determinación de la estructura de esta proteína es esencial para conocer las bases moleculares del proceso de ensamblaje y de formación de viriones maduros. Por tanto, estos estudios podrían tener implicación en la terapia antiviral y conducir al desarrollo de un posible método de inhibición de la infectividad de los lentivirus.

Las proteínas de la cápsida de los lentivirus guardan una gran homología de secuencia entre sí (Stephens *et al.*, 1986; Olmsted *et al.*, 1989b; Talbott *et al.*, 1989; Wills y Craven, 1991; Matsuo *et al.*, 1992). En la Figura 5 se representa la secuencia de aminoácidos de las proteínas CA de EIAV (p26), HIV (p24) y FIV (p24). De los 230

aminoácidos de los que se compone p26 de EIAV, 58 de ellos son idénticos a residuos de p24 de HIV, lo que supone un 25% de los residuos de la proteína de EIAV; además hay un gran número de sustituciones conservativas, de manera que el 36% de los aminoácidos son homólogos. Lo mismo ocurre con la proteína p24 de FIV, que guarda una identidad del 34% con EIAV, y del 29% con la proteína p24 de HIV. Así mismo, el suero de caballos infectados por EIAV precipita las proteínas de la cápsida de HIV (Montaigner *et al.*, 1984) y FIV (Egberink *et al.*, 1990; Steinmann *et al.*, 1990). Estos resultados son indicativos de la presencia de determinantes conservados entre las proteínas de las cápsidas lentivirales, sugiriendo que dichas proteínas están organizadas en dominios antigénicos similares (Egberink *et al.*, 1990; Chong *et al.*, 1991). Además, esta gran homología sugiere que todos los estudios dirigidos a la caracterización estructural de la proteína p26 de EIAV y p24 de FIV sean aplicables a la proteína p24 de HIV, lo que supondría un gran avance en los conocimientos sobre el HIV en particular y sobre los lentivirus, en general.

HIV	IVQNIETQMVHQALSRTLNAVVKVVEE-KAFSPQVIPMSALREGAFOBLNEMINTV	59
EIAV	IMIDGAINRNFRPLTRGYTTVNTIQTNGLLNEASONLIGILVDCISEENAFEDVV	60
FIV	ITQVNVVPOYVALDKMVSIFMEKAREGLIGGEEVOLWTAFAANLPTDMATLIMAA	58
HIV	GHHQAMOMAKETINEEAERLIVHAGPITPGOMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMT	119
EIAV	PIQAGOKQILDALDKIADDMNRILPNAELVAPPQGPIMPTRFIRGLGVPREROMP	120
FIV	PCAADKEIDESLQKLTAEYRTIPDAPRPLEYF-----TAAETMIGLITQEQQAEA	112
HIV	NNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSISSILDIIPPEPRDYVIFYKTLRAEQASQ	179
EIAV	AEDQFRQTYROWIIEAMSEGIKVMIGKKA-QNEIPDIPYEFVIELSQIKSIGHPO	179
FIV	REAPARMQCRAWYLEALGKLAATKAKSARA-VQLSAAIDYSSIEIALFAQIDQONTA	171
HIV	SVKNRTTETILVONIPDOKTILKANGAAVSMMTAQQGVGFGHARV	231
EIAV	ISKFLTDTITIGNEEDNNMRIRLEDKIKYKRDITTKQIMML-	230
FIV	IVKLYLKQSISIAADADCKKAMSHIKESDQKLRQQEISPGYDQL	223

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de la proteína de la cápsida de HIV (p24), EIAV (p26) y FIV (p24). Los números indican los residuos de los que se compone cada proteína. (■) Residuos conservados en las tres secuencias; (●) Residuos conservados en dos de las secuencias; (○) Cambio conservativo en la tercera secuencia. Las equivalencias empleadas son: H→R→K; N→Q; S→T; L→I→V; F→Y→W; A→G; M→C.

Hasta hace unos años había pocos datos acerca de la estructura de la proteína CA. De hecho, cuando se iniciaron los estudios que se recogen en esta memoria únicamente había un modelo teórico (Rossmann, 1988; Argos, 1989) basado en la analogía existente entre estas proteínas y las de la cápsida de virus de plantas y picornavirus. Según este modelo, la proteína podría adoptar una estructura de barril β compuesto de ocho cadenas. Sin embargo, estudios posteriores de difracción circular (Ehrlich *et al.*, 1994; Hausdorf *et al.*, 1994) y predicciones de estructura secundaria (Coates *et al.*, 1987; Ehrlich *et al.*, 1994), indican que la proteína adquiere una estructura principalmente en α -hélice, lo que es incompatible con los modelos anteriormente expuestos. La tendencia de la proteína CA a asociarse y formar oligómeros (Ehrlich *et al.*, 1992; Rosé *et al.*, 1992) hace difícil realizar estudios cristalográficos y de resonancia magnética nuclear (RMN). Aún así, se ha conseguido cristalizar la proteína p24 de HIV formando un complejo con un fragmento de un anticuerpo (Prongay *et al.*, 1990), aunque no se obtuvo ningún resultado sobre la estructura. Posteriormente, se ha determinado la estructura tridimensional parcial mediante técnicas de RMN y cristalógraficas. Hasta ahora, se ha resuelto la estructura del extremo amino-terminal (residuos 1-151), tanto en disolución (Gitti *et al.*, 1996) como en estado cristalino (Gamble *et al.*, 1996; Momany *et al.*, 1996). El extremo amino-terminal de la proteína p24 de HIV está constituido por siete hélices. Cinco de ellas, las de mayor extensión, forman una estructura superenrollada en la que las caras hidrofóbicas de las hélices están dirigidas hacia el interior de la super-hélice interactuando entre ellas hidrofóticamente. Estos residuos hidrofóbicos están altamente conservados en las secuencias de las proteínas de la cápsida de otros lentivirus, indicando la importancia de dichos residuos en el mantenimiento de la estructura. Las hélices más extensas están separadas por un largo péptido antigénico dentro del cual se encuentra el dominio de unión al fragmento de anticuerpo con el que se han obtenido cristales. El resto se encuentra conectado por pequeños lazos. En uno de ellos se encuentra el sitio de unión de la proteína a la ciclofilina A (CypA), una peptidil-prolil isomerasa humana, que se empaqueta en el virión en el proceso de replicación viral (Franke *et al.*, 1994b; Thali *et al.*, 1994). Tanto reactivos como mutaciones que impiden la formación del complejo proteína-CypA *in vitro*, bloquean el empaquetamiento de CypA y la replicación de HIV en cultivos, lo que indica que esta interacción es esencial para la infectividad viral (Franke *et al.*, 1994b; Thali *et al.*, 1994; Steinkaserer *et al.*, 1995; Braaten *et al.*, 1996). En la unión a CypA, la prolina de la posición 90 tiene una gran importancia. Este residuo adopta conformaciones *cis* y *trans* que se encuentran en equilibrio, lo que puede sugerir que la ciclofilina A cataliza la interconversión de dos estructuras del lazo en las que se encuentra la Pro90 en *cis* o *trans*, lo que facilitaría diferentes interacciones intermoleculares durante la morfogénesis del virión (Gamble *et al.*, 1996; Gitti *et al.*, 1996).

Recientemente, se ha determinado la estructura del extremo carboxilo-terminal (residuos 151-231) de la proteína de la cápsida de HIV (Gamble *et al.*, 1997). Cada molécula de CA (151-231) está compuesta de una lámina extendida seguida de cuatro hélices α . Este dominio adopta una forma ovoide de dimensiones de 27 Å x 29 Å x 38 Å. El fragmento MHR forma un motivo lámina-giro-hélice compacto que se empaqueta frente al extremo carboxilo-terminal de la hélice 2. Los cuatro residuos más conservados de este fragmento (Gln155, Gly156, Glu159 y Arg167) forman una red de puentes de hidrógeno que estabiliza esta estructura y la une a la hélice 2. Se postula que los dos dominios de la proteína de la cápsida se encuentran conectados por una secuencia de cinco aminoácidos que corresponden a los residuos 146 a 150, que hace posible que haya una dimerización entre los dominios CA (151-231). A estos dominios quedan unidos los extremos amino-terminales que no interaccionan entre sí (Gamble *et al.*, 1997). Sin embargo, esta es una modelización, ya que aún no se ha resuelto la estructura de la proteína intacta. En este sentido, utilizando los sistemas de expresión de la proteína CA que se describen en esta memoria, se puede obtener cantidad suficiente de proteína como para llevar a cabo los estudios estructurales de la proteína completa. Actualmente se está intentando poner a punto un sistema de expresión para obtener la proteína a altas concentraciones y llevar a cabo con ella estudios de RMN. Es necesario para ello expresar la proteína en un medio mínimo, para obtener la proteína marcada uniformemente con isótopos estables (^{13}C y ^{15}N) utilizando reactivos incluidos en el medio de cultivo (Cloruro de amonio, fuente del ^{15}N , y glucosa, fuente del ^{13}C). La obtención de proteína marcada es imprescindible para la resolución de los espectros de RMN, a la hora de asignar las posiciones de determinados residuos como las prolinas, así como disminuir las señales producidas por el disolvente, aumentando las señales propias de la proteína.

OBJETIVOS

Las proteínas de las cápsidas lentivirales guardan una gran homología de secuencia entre sí. En concreto, en su secuencia hay dos residuos de cisteína en el extremo carboxilo-terminal que se conservan en la mayoría de estas proteínas. La posible formación de un puente disulfuro generalmente supone un aumento de estabilidad de las proteínas. Por dicho motivo, en este trabajo se pretende hacer un estudio estructural de las proteínas mayoritarias de la cápsida del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y así mismo, estudiar el papel que desempeñan los tres residuos de cisteína presentes en estas proteínas en el mantenimiento de su estructura, para lo cual se pretende:

- ❶ Clonación, expresión y purificación de la proteína mayoritaria de la cápsida de EIAV para obtenerla en una cantidad tal que nos permita llevar a cabo estudios estructurales.
- ❷ Caracterización estructural y antigénica de esta proteína.
- ❸ Estudio del papel de los residuos de cisteína en el mantenimiento de la estructura de la proteína.

Así mismo, ante la escasez de datos acerca del mecanismo de plegamiento de todas estas proteínas, se pretende llevar a cabo un estudio del modo en que la proteína de la cápsida del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) adquiere su estructura tridimensional. Esta proteína posee en su secuencia dos residuos de triptófano, cuyas propiedades espectroscópicas nos van a permitir seguir mediante técnicas espectroscópicas como el dicroísmo circular o la fluorescencia los cambios que ocurren en el entorno tridimensional de estos residuos cuando se producen cambios que afectan a la polaridad de dichos entornos. Para ello se pretende:

- ❶ Clonación, expresión y purificación de la proteína mayoritaria de la cápsida de FIV (p24).
- ❷ Obtención de proteínas mutantes en las que se cambie uno o los dos residuos de triptófano por residuos de fenilalanina para disponer de dos mutantes sencillos (W40F y W126F) y un doble mutante (W40/126F).
- ❸ Clonación, expresión y purificación de estas proteínas mutantes.
- ❹ Caracterización estructural de la proteína rp24 de FIV y las proteínas mutantes.
- ❺ Estudio del mecanismo de plegamiento de esta proteína mediante la obtención y comparación de las curvas de desnaturalización por urea de la proteína original y de las proteínas mutantes.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

1. CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE EIAV

1.1. TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA CÁPSIDA DE EIAV

El RNA vírico se obtuvo a partir de suero de caballo infectado por EIAV mediante un método descrito previamente (Simmonds *et al.*, 1990), con algunas pequeñas modificaciones (Castillo *et al.*, 1992). Básicamente el método consiste en incubar 200 μ l de suero con 500 μ l de una disolución que contiene tiocianato de guanidinio 4.2 M, sarcosil al 0.5%, citrato sódico 25 mM, pH 7.0 y 5 μ l de β -mercaptoetanol. Una vez mezclada la disolución se añadieron 50 μ l de acetato sódico 50 mM, pH 4.0, 500 μ l de fenol y 200 μ l de cloroformo. Esta mezcla se incubó durante 15 min en hielo. Después de una centrifugación a 14000 g durante 15 min a 4 °C, la fase acuosa se extrajo dos veces con cloroformo. El RNA viral se precipitó con isopropanol a -70 °C durante toda la noche. El RNA precipitado se recogió centrifugando durante 30 min a 14000 g, se lavó con etanol al 70% y se secó. El precipitado se resuspendió en 3 μ l de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0. Este RNA se usó como un molde para la reacción de transcripción inversa. Se preparó una mezcla de reacción que contenía la enzima transcriptasa inversa, el RNA preparado y se utilizaron hexámeros random para iniciar la reacción. Después de una incubación de 10 min a 25 °C, la mezcla se incubó a 42 °C durante 20 min, 99 °C durante 5 min y finalmente, a 4 °C durante 5 min. Al producto de la reacción de la transcripción inversa, se le añadió la Taq polimerasa y el DNA viral sintetizado fue amplificado por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando las siguientes condiciones:

1. 5 ciclos de 94 °C (1 min), 42 °C (1 min) y 72 °C (1 min)
2. 35 ciclos de 94 °C (1 min), 55 °C (1 min) y 72 °C (1 min)
3. 1 ciclo de 72 °C (5 min)

Los precursores utilizados para la PCR se diseñaron de tal forma que el producto final tuviese un sitio de restricción *Nco*I en su extremo 5' y un codón de terminación seguido de un sitio de restricción *Hind*III en su extremo 3'. Se incorporaron dos nucleótidos adicionales después de los sitios de restricción para facilitar la rotura del producto de PCR por estas enzimas. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

p26-NcoI (+): 5' gc cCA TGg TAG ATG GGG CTG GAA ACA G 3'

p26-HindIII (-): 5' cg aAG ctt aAG TGC TTT TGC CAA TAA CAT 3'

En mayúscula aparecen los nucleótidos que coinciden con la secuencia publicada mientras que las minúsculas representan aquellos que se han cambiado para crear los sitios de restricción y los nucleótidos que se han añadido para facilitar la rotura del producto de PCR. Los sitios de restricción de las enzimas *NcoI* (CCATGG) y *HindIII* (AAGCTT) se encuentran subrayados en la secuencia.

1.2. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE EIAV

El producto de la reacción de PCR, un fragmento de 712 pares de bases correspondiente a los nucleótidos 839-1550 de la secuencia publicada del gen de EIAV (Stephens *et al.*, 1986), fue digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII* y clonado en el vector pUC18N, cortado con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pUC18N/EIAVp26. El plásmido pUC18N es idéntico a pUC18 excepto por el sitio de restricción *NcoI* del extremo 5' del sitio de clonación múltiple. El residuo iniciador de metionina es codificado por el triplete ATG dentro del sitio de restricción *NcoI*, asegurando que no se incorpora ningún aminoácido extraño al producto final. Sin embargo, la incorporación de un sitio de restricción *NcoI* requiere la alteración del cuarto nucleótido en el gen, de A a G, lo que cambia el segundo triplete de ATA (Ile) a GTA (Val). Ya que valina e isoleucina tienen cadenas alifáticas e hidrofóbicas, no es esperable que esta alteración conservativa suponga un cambio significativo en términos de la estructura global de la proteína. Como el precursor Gag de EIAV se sintetiza como una poliproteína en la que p26 se encuentra entre la proteína de la matriz (p15) y la de la nucleocápsida (p11), hubo que insertar un codón de terminación en el extremo carboxilo-terminal. Esto se consigue con la introducción del sitio de restricción *HindIII* en el extremo 3'. El gen de la cápsida de EIAV se clonó en el vector de expresión pKK223-3N. Este vector es una versión modificada del vector de expresión pKK223-3 (Pharmacia) y utiliza el promotor *tac* para dirigir la expresión de los genes clonados. La modificación consiste en la introducción de un sitio de restricción *NcoI* a continuación del promotor *tac*. El fragmento *NcoI/HindIII* que incluye el gen de la cápsida se cortó de pUC18N/EIAVp26 y se ligó en los sitios *NcoI/HindIII* del vector de expresión. Las características de los dos vectores de expresión utilizados para obtener la proteína p26 se detallan en las Figura 6. El gen clonado tiene una longitud de 699 pares de bases y codifica una proteína de 233 aminoácidos. La proteína p26 recombinante (rp26) difiere de la verdadera proteína de la cápsida, que posee 230 aminoácidos, en que tiene dos

aminoácidos menos en el extremo amino-terminal, Pro e Ile, y el residuo Val en lugar de Ile como segundo aminoácido, y en el extremo carboxilo-terminal una extensión de cinco aminoácidos correspondientes a la secuencia que hay entre p26 y p11, la proteína de la nucleocápsida (Henderson *et al.*, 1987).

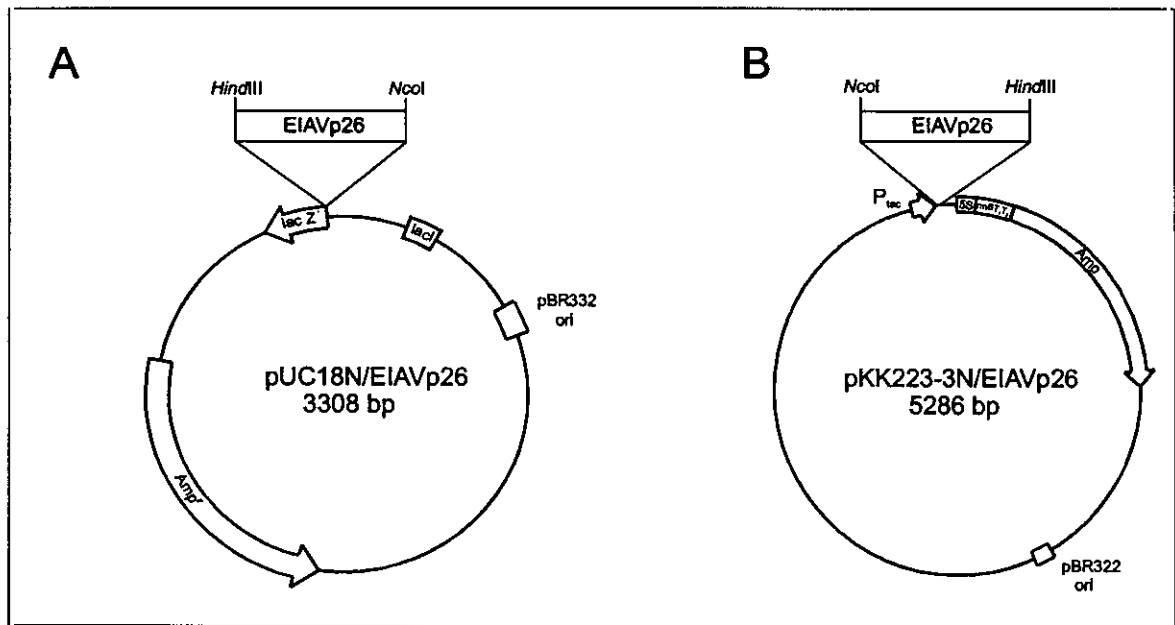


Figura 6. Construcción de los vectores de expresión pUC18N/EIAVp26 y pKK223-3N/EIAVp26. (A) Vector pUC18N/EIAVp26. El gen de la cápsida de EIAV se clona entre los sitios *NcoI* y *HindIII* del vector pUC18N, que se encuentran dentro del sitio de múltiple clonación. (B) Vector pKK223-3N. En este caso el gen de EIAVp26 también se clona entre los sitios *NcoI* y *HindIII* que se encuentran al lado del promotor *tac* (*P_{tac}*).

1.3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE EIAV

Células *E. coli* competentes (cepa TB1) se transformaron con 1 μ l de plásmido pKK223-3N/EIAVp26 o pUC18N/EIAVp26 mediante el método del CaCl_2 (Sambrook *et al.*, 1989) y se sembraron en una placa de medio LB (Luria Bertani) (10 g/L bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl, pH 7.0), suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina. Se seleccionó una colonia única que se usó para inocular 100 ml de medio TYN (10 g/L de bacto triptona, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, pH 7.4), suplementado con 1 g/L de glucosa y 50 μ g/ml de ampicilina. Este preinóculo se dejó crecer durante 8 h a 37 °C, usándose posteriormente para inocular 10 L de medio TYN; éste, a su vez, se dejó crecer 24 h a la misma temperatura, tras

las cuales se recogieron las células centrifugando durante 10 min a 6000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en agua (30 ml/L de medio) y las células se rompieron mediante 5 ciclos de sonicación de 30 s cada uno. El lisado celular se clarificó por centrifugación a 17000 rpm durante 30 min, y el sobrenadante se precipitó con sulfato amónico al 50% (313 g/L). El precipitado se resuspendió en fosfato sódico 10 mM, pH 6.8, antes de ser dializado frente al mismo tampón. La mezcla de proteínas dializada se cargó en una columna de DEAE-celulosa DE-51 (Whatman) previamente equilibrada en fosfato sódico 10 mM, pH 6.8. En estas condiciones la proteína rp26 no queda retenida en la columna, por lo que se recuperó en el excluido. Las proteínas no retenidas se precipitaron con sulfato amónico al 60% (390 g/L). Una vez recogido el precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y se dializó durante toda la noche frente a este mismo tampón a 4 °C. Esta proteína se cargó en una columna de Sephacryl S-100 equilibrada en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0. La proteína se eluyó con este mismo tampón recogiendo el eluido en fracciones de 6 ml. A lo largo de toda la purificación la presencia de rp26 fue seguida mediante geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La presencia de rp26 se determinó también mediante inmunodetección de geles de poliacrilamida transferidos a membranas de PVDF, utilizando suero de caballo infectado por EIAV como se describe más adelante para rp26. La pureza final de la proteína fue determinada mediante el densitometrado de los geles de poliacrilamida-SDS teñidos.

1.4. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA MUTANTE rp26-C48S

Para llevar a cabo la mutación del residuo de cisteína de la proteína EIAV-rp26 en la posición 48 por serina se ha utilizado la técnica de PCR. Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores:

rp26-C48S(+): 5' ac aGT ACT TCT GAA GAA ATG AAT GC 3'
rp26-C48S(-): 5' ga aGT ACT GTC TAC TGA TAA TAT CCC 3'

En cursiva aparece el único nucleótido cambiado para producir simultáneamente la mutación del residuo Cys48 (TGT) a Ser48 (AGT), a la vez que se introduce un nuevo sitio de restricción, *Scal* (AGTACT), que se encuentra subrayado. En minúscula aparecen aquellos nucleótidos que se han introducido para facilitar el corte de los fragmentos originados en la reacción de PCR. Además se emplearon otros dos oligonucleótidos, que son los cebadores utilizados en la clonación del gen de la

cápsida de EIAV en el plásmido pUC18N descritos en el apartado 1.1, esto es, p26-NcoI(+) y p26-HindIII(-).

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

1. 5 ciclos de 94 °C (30 s), 37 °C (12 s), 72 °C (20 s)
2. 30 ciclos de 94 °C (30 s), 55 °C (12 s), 72 °C (20 s)
3. 1 ciclo de 72 °C (7 min)

Se llevan a cabo dos reacciones de PCR utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos cebadores: p26-NcoI(+)/rp26-C48S(-) y rp26-C48S(+)/p26-HindIII(-). La digestión de estos fragmentos con la enzima *ScaI* y su posterior ligación dio lugar al DNA de rp26-C48S completo. Este DNA se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos p26-NcoI(+) y p26-HindIII(-), tras lo cual fue digerido por las enzimas *NcoI* y *HindIII* y clonados en el plásmido pUC18N digerido con las mismas enzimas. La mutación introducida se confirmó mediante digestión con la enzima *ScaI* y por secuenciación automática del DNA de la proteína mutante.

La expresión y purificación de la proteína mutante se llevó a cabo empleando el mismo protocolo que el empleado para la proteína EIAV-rp26 salvaje.

1.5. CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA rp26-His

La proteína EIAV-rp26 se clonó en el vector de expresión pQE30 aplicando de nuevo la técnica de PCR. En este caso, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando unas condiciones idénticas a las indicadas en el apartado anterior, empleando el siguiente par de oligonucleótidos cebadores:

rp26-His (+): 5' cc gga tcc ATG GGG CTG GAA ACA G 3'
rp26-His (-): 5' cg AAG CTT AAG TGC TTT TGC CAA TAA CAT 3'

En minúsculas aparecen los nucleótidos añadidos para crear el nuevo sitio de restricción *BamHI* (GGATCC) en el extremo amino-terminal de la proteína y los nucleótidos añadidos para facilitar el corte de los fragmentos de DNA originados en la reacción de PCR. El oligonucleótido rp26-His (-) es idéntico al p26-HindIII(-) empleado en la clonación de EIAV-rp26 en el plásmido pUC18N e introduce el sitio de restricción *HindIII* junto con el codón de terminación de la proteína.

El fragmento originado fue digerido con las enzimas *Bam*H1/*Hind*III y clonado en el vector de expresión pQE30, que añade una secuencia de seis residuos de histidina en el extremo amino-terminal de la proteína, además de otros cuatro residuos que se encuentran entre el sitio de unión a ribosoma y las seis His.

La proteína rp26-His se expresó y purificó empleando el protocolo utilizado en la purificación de la proteína FIV-rp24, que se describe con más detalle en el siguiente apartado.

2. CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE FIV

2.1. CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE FIV

El aislamiento del RNA vírico a partir de suero infectado por FIV, la reacción de transcripción inversa y la amplificación por PCR del gen que codifica la proteína p24 de la cápsida de FIV (Talbot *et al.*, 1989) se llevaron a cabo empleando las condiciones indicadas anteriormente para el gen de EIAV-p26. Los precursores utilizados para la PCR fueron diseñados de tal forma que el producto de la reacción tuviese un sitio de restricción *Nco*I en su extremo 5' y un sitio de restricción *Bgl*II en su extremo 3'. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

p24-*Nco*I(+): 5' gc cca TGG TAC CTA TTC AAA CAG TA 3'
p24-*Bgl*II(-): 5' gg aga tct AAG AGC TTC TGC CAA GAG 3'

En mayúscula aparecen los nucleótidos que coinciden con la secuencia publicada mientras que las minúsculas representan aquellos que se han cambiado para crear los sitios de restricción y los nucleótidos que se han añadido para facilitar la digestión del producto de PCR. Los sitios de restricción de las enzimas *Nco*I (CCATGG) y *Bgl*II (AGATCT) se encuentran subrayados en la secuencia.

El fragmento originado, de 699 pares de bases, fue digerido con las enzimas de restricción *Nco*I/*Bgl*II y clonado en el vector de expresión pQE60 (Figura 7), que añade una secuencia de seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal de la proteína FIVp24. Este vector de expresión contiene un elemento promotor/operador regulable, constituido por el promotor T5 de *E. coli*, y dos secuencias del operador *lac*.

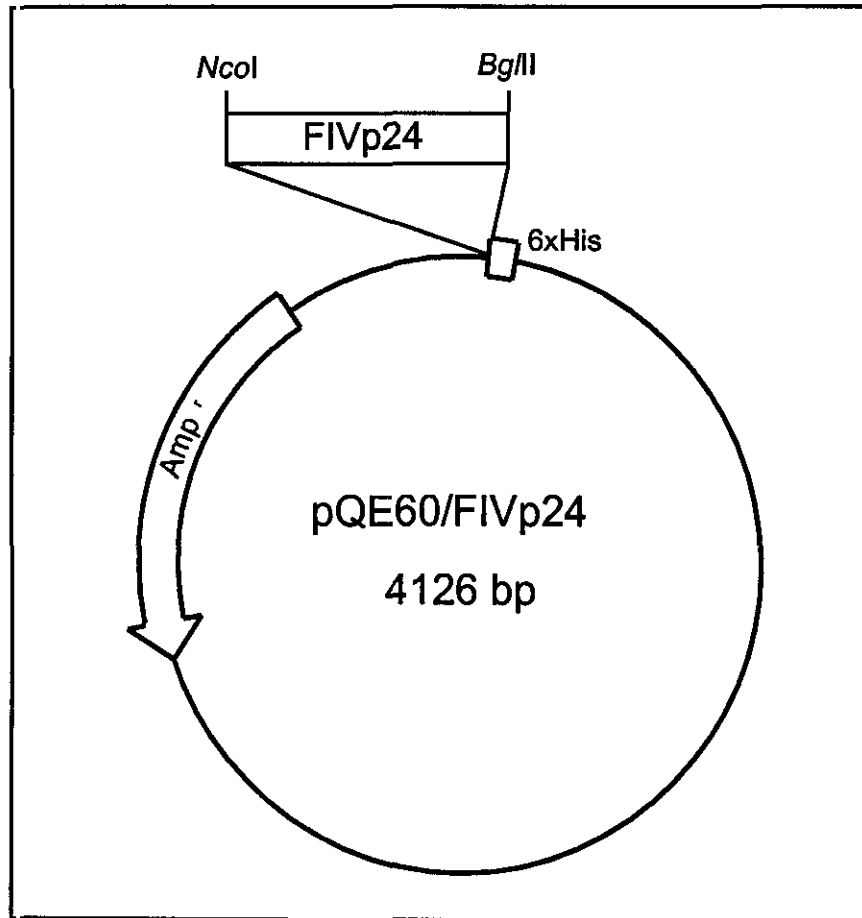


Figura 7. Construcción del vector de expresión pQE60/FIVp24. El gen que codifica la proteína FIVp24 se clonó entre los sitios *NcoI* y *BglII* del plásmido pQE60. Este último sitio de restricción se encuentra justo antes del fragmento de DNA que codifica los seis residuos de histidina (6xHis).

La expresión de la región promotor/operador es muy eficiente, y sólo puede ser impedida por la presencia de altos niveles del represor *lac*. Las células donde se expresan los plásmidos pQE contienen múltiples copias del plásmido pREP4, que porta el gen *lacI* (Farabaugh, 1978), que codifica el represor *lac* y confiere a la célula resistencia a kanamicina.

La proteína que se obtiene en estas condiciones (rp24), que tiene 237 aminoácidos, difiere de la original, que posee 223 aminoácidos, en los siguientes aspectos: al introducir el sitio de restricción *NcoI* se añaden dos aminoácidos, M y V, en el extremo amino-terminal; posee los cuatro aminoácidos que en la poliproteína se encuentran entre p24 y p10 (Talbot *et al.*, 1989); al generar el sitio de restricción *BglII* se añaden dos aminoácidos, R y S, en el extremo carboxilo-terminal y, al estar clonado en pQE60, posee el fragmento de seis histidinas que facilita su purificación.

2.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE FIV

La proteína p24 de la cápsida de FIV se expresó y purificó empleando el sistema QIAexpress que utiliza un adsorbente quelante metálico, la resina Ni-NTA (ácido nitrilotriacético) agarosa, que proporciona un método rápido de purificación en un sólo paso (Hochuli et al., 1987). La unión de la proteína a la resina se produce a través de un fragmento de seis residuos de histidina que se añade a la proteína en su extremo carboxilo-terminal. En la Figura 8 se observa la interacción que se produce entre los anillos imidazólicos de los residuos de histidina y los iones Ni^{2+} , así como el resto de las posiciones de coordinación de dicho ión. El ácido nitrilotriacético es el que queda unido a la resina.

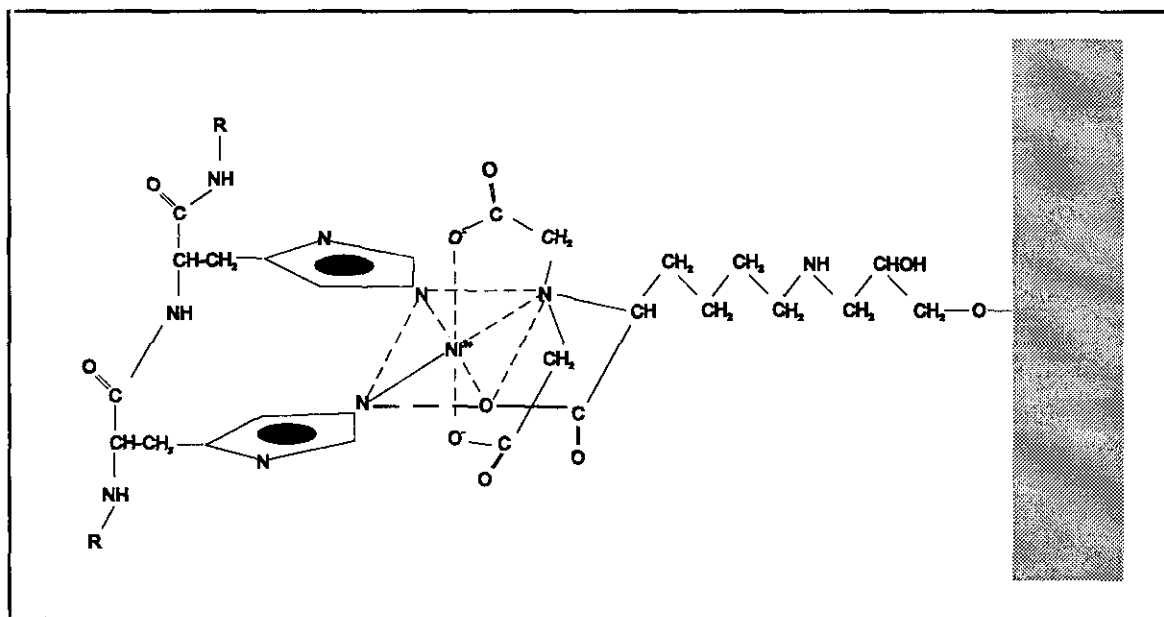


Figura 8. Interacción entre los anillos imidazólicos de los residuos de histidina y los iones Ni^{2+} . Los iones Ni^{2+} tienen dos de sus posiciones de coordinación ocupadas por dos átomos de nitrógeno de los anillos imidazólicos de los residuos de histidina. El resto de las posiciones están ocupadas por tres átomos de oxígeno y uno de nitrógeno del ácido nitrilotriacético. Este ácido queda unido a la resina mediante un enlace éter.

Las células empleadas para la expresión de la proteína fueron células *E. coli* de la cepa M15[pREP4]. Una alícuota de estas células competentes se transformó mediante el método del CaCl_2 con 1 μl del plásmido pQE60/FIVp24. Las células transformadas se sembraron en una placa de medio LB suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Se crecieron las células durante 16 h y una colonia de la placa se empleó para inocular un precultivo de 100 ml de medio LB suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Se crecieron

hasta saturación durante toda la noche y se inocularon entonces en 2 L de medio de cultivo creciéndose a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.5-0.6. La expresión de la proteína se indujo con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.25 mM durante 4 h a 37 °C. Las células se recogieron centrifugando el medio 10 min a 6000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en PBS (NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.6) y las células se rompieron mediante sonicación durante cinco ciclos de 30 s cada uno. El lisado celular se clarificó centrifugando 30 min a 26000 rpm. El sobrenadante resultante se llevó a Imidazol 10 mM y su pH se ajustó a 8.0, cargándose a continuación en una columna de Ni-NTA-agarosa previamente equilibrada con PBS, Imidazol 10 mM, pH 8.0. Una vez cargada la proteína se lavó con PBS, Imidazol 10 mM, pH 8.0 y posteriormente con PBS, Imidazol 30 mM, pH 8.0 para eliminar todas las proteínas contaminantes. La proteína se eluyó con PBS, Imidazol 200 mM, pH 8.0. La presencia de proteína en las diferentes fracciones eluidas se siguió mediante la medida de la absorción a 280 nm y se confirmó mediante PAGE-SDS.

3. OBTENCIÓN DE FORMAS MUTANTES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE FIV

La metodología empleada en la obtención de las formas mutantes es similar a la utilizada en el caso de la obtención de la proteína mutante rp26-C48S descrita en el apartado 1.4. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores que incluyen cambios específicos de bases correspondientes a la mutación y que generan un nuevo sitio de restricción, *MfeI*, en el caso del mutante W40F y *XbaI* para el mutante W126F.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para cada mutante:

W40F

W40F (+): cgg CAA tTg Ttc TTT ACT GCC TTC TCT GCA

W40F (-): AAA CCA Caa TTG AAC TTC CTC ACC T

W126F

W126F (+): TGG TAT CTa GAG GCA TTA GGA

W126F (-): cgg CTC tAG ATA aaA TGC TCT ACA CTG CAT CCT

En cursiva aparecen los nucleótidos cambiados para producir la mutación del residuo Trp40 (TGG) a Phe40 (TTC) y el Trp126 (TGG) a Phe126 (TTT) y en minúscula aquellos cambios, respecto de la secuencia original, que se introducen para

generar los sitios de restricción o añadir bases que faciliten el corte por la enzima de restricción correspondiente. Los sitios de restricción de las enzimas *MfeI* (CAATTG) y *XbaI* (TCTAGA) se encuentran subrayados en la secuencia. Además se emplearon otros dos oligonucleótidos, los mismos para los dos mutantes, que son los cebadores utilizados en el clonación del gen de la cápsida de FIV en el plásmido pQE60 descritos en el apartado anterior, esto es, p24-*NcoI* (+) y p24-*BglIII* (-).

Para cada mutante se llevan a cabo dos reacciones de PCR en las mismas condiciones empleadas en el caso de la obtención de la proteína mutante *rp26-C48S*, descritas en el apartado 1.4.1 Se utilizó, en el caso de W40F, los siguientes pares de oligonucleótidos cebadores: p24-*NcoI*(+)/W40F(-) y W40F(+)/p24-*BglIII*(-) en el caso de W40F (Fig. 9) y p24-*NcoI*(+)/W126F(-) y W126F(+)/p24-*BglIII*(-) en el caso de W126F, lo que genera dos fragmentos de DNA para cada mutante. La digestión de estos fragmentos con las enzimas correspondientes a los sitios internos (*MfeI* o *XbaI*) y su posterior ligación dio lugar a los DNAs de W40F y W126F completos. Éstos se amplificaron con una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos p24-*NcoI*(+) y p24-*BglIII*(-), tras lo cual fueron digeridos con las enzimas *NcoI* y *BglII* y clonados en el plásmido pQE60 digerido con las mismas enzimas. De esta forma, también se introduce una extensión de seis residuos de histidina en el extremo carboxilo-terminal de las proteínas mutadas. Las mutaciones introducidas se confirmaron mediante digestión con las enzimas *MfeI* (W40F) o *XbaI* (W126F) y mediante la secuencia completa del DNA de los mutantes por secuenciación automática.

El doble mutante se construyó mediante una las siguientes digestiones:

1. pQE60/W40F se digiere con las enzimas *NcoI* y *HindIII*, obteniéndose un fragmento de 216 bp que incluye la mutación W40F.
2. pQE60-W126F se digiere con *HindIII* y *BglII* y se obtiene un fragmento de 473 bp con la mutación W126F.
3. pQE60-FIVp24 se digiere con *NcoI* y *BglII*, recuperándose el fragmento de 3427 bp correspondiente a pQE60.

La ligación de los tres fragmentos obtenidos permitió obtener un DNA que incluye las dos mutaciones (Fig. 10).

Una vez obtenidas las diferentes formas mutantes se transformaron células de *E. coli* M15[pREP4] con los plásmidos correspondientes, y se expresaron y purificaron las proteínas mutantes empleando el mismo protocolo que el utilizado en la purificación de la proteína FIV-rp24 salvaje.

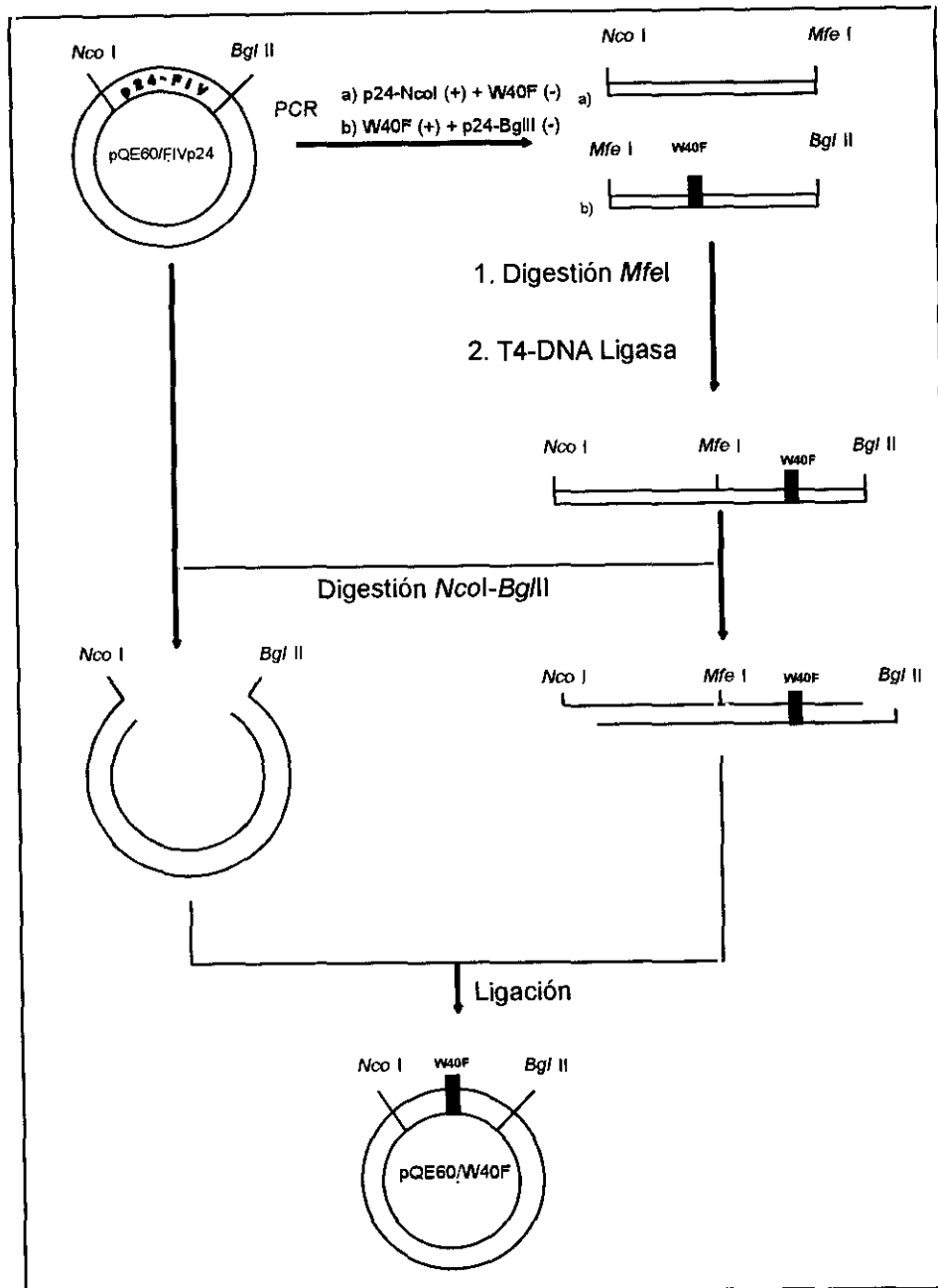


Figura 9. Metodología empleada en la obtención del mutante W40F. El gen de la proteína de la cápsida de FIV que se encuentra clonado en el plásmido pQE60 se emplea como molde en dos reacciones de PCR (a y b) empleando los oligonucleótidos cebadores correspondientes. Tras estas reacciones se obtienen dos fragmentos de DNA, en uno de los cuales (fragmento b) se introduce la mutación del Trp40 por Phe. Tras digerir primero los dos fragmentos con la enzima de restricción *MfeI* y posteriormente ligarlos se obtuvo el gen completo que codifica la proteína mutante. Para introducirlo en el vector de expresión pQE60 se digiere éste y el gen de W40F con las enzimas *NcoI* y *BglII*, y los fragmentos del tamaño adecuado se ligan, obteniéndose el plásmido pQE60-W40F. La misma metodología se emplea para la obtención del mutante W126, empleando en esta ocasión *XbaI* como enzima de restricción correspondiente al sitio interno.

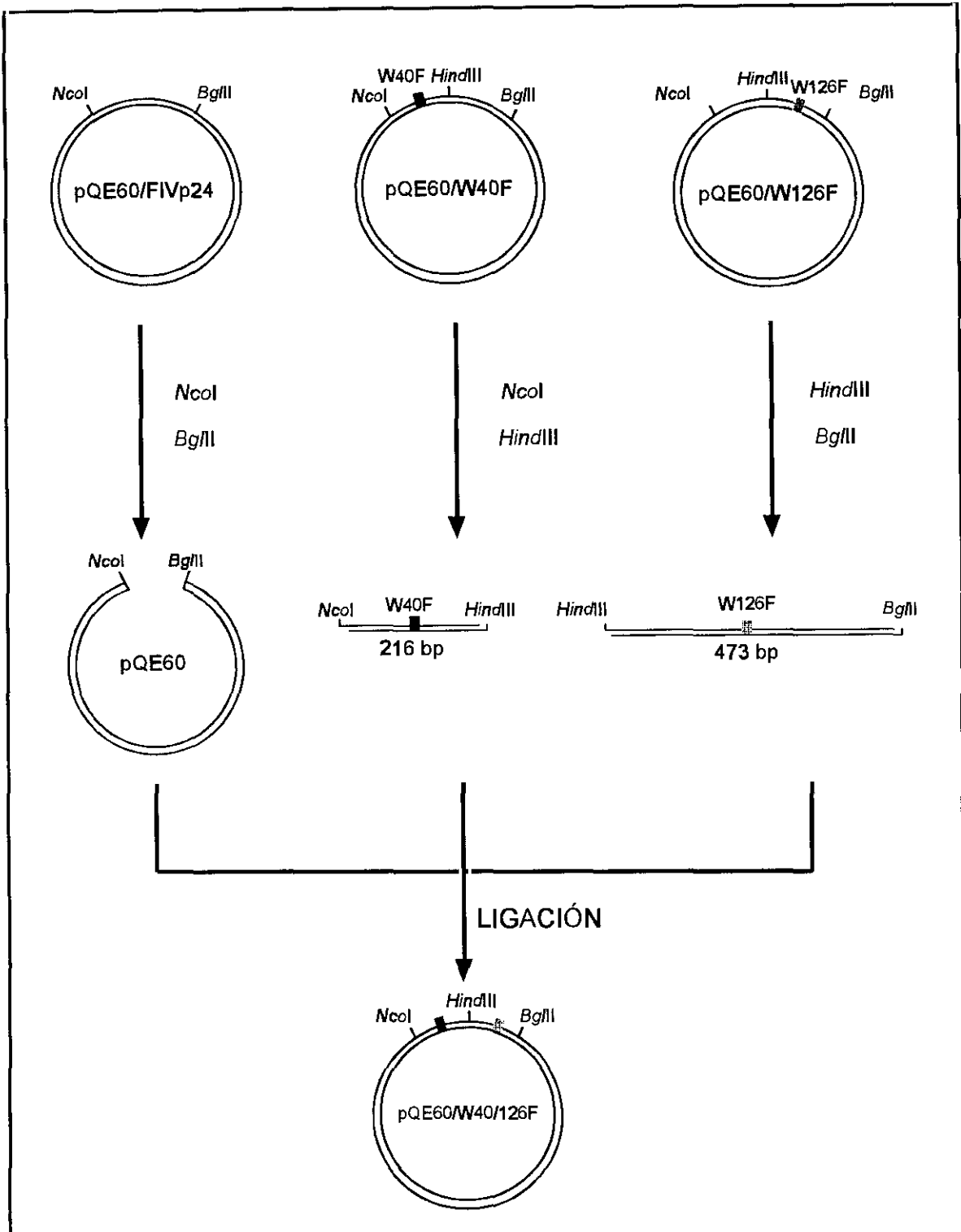


Figura 10. Metodología empleada en la obtención del doble mutante W40/126F. Tras llevar a cabo tres digestiones con las enzimas de restricción correspondientes y empleando los plásmidos pQE60/FIVp24, pQE60/W40F y pQE60/W126F, se obtuvieron tres fragmentos, que ligados originaron el plásmido pQE60/W40/126F.

4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para comprobar los resultados obtenidos en reacciones de PCR, de digestión de DNAs y ligaciones se prepararon geles de agarosa al 0.7-2% (p/v), según sea el tamaño del DNA que se quiera detectar, en tampón TAE (Tris-acetato 0.045 mM, EDTA 0.001 M, pH 8.0). A las muestras se les añade tampón de aplicación 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v)), que contiene los marcadores azul de bromofenol y cianol de xileno, que nos permiten seguir el desarrollo de la electroforesis. Para llevar a cabo la electroforesis se emplea un voltaje constante entre 80-100 mV. Las bandas de DNA se detectaron tiñendo el gel con una disolución de bromuro de etidio de 0.5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ durante unos 15 min y visualizando el gel bajo luz UV.

4.2. EXTRACCIÓN DE DNA DE GELES DE AGAROSA

La extracción de DNA de geles de agarosa se llevó a cabo con el sistema QIAEX (QiaGen) siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante. El proceso consta de las siguientes etapas. Las bandas correspondientes al DNA que se quiere extraer se cortan y se pesan. A continuación se solubilizan con 6 volúmenes del tampón QX1 y se añaden 10 μl de resina QIAEX II, incubándose a 50 °C durante 10 min. Se agita cada 2 min para que se una el DNA a la resina. Transcurrido este tiempo, se centrifuga durante 30 s, lavándose el sedimento con 500 μl de tampón QX1. El tampón se elimina centrifugando de nuevo 30 s. Posteriormente, se realizan dos nuevos lavados con 500 μl de tampón PE, que contiene etanol al 80%, y el sedimento se deja secar al aire. Para disolver el DNA se añaden 20 μl de agua estéril o TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) al sedimento y se incuba 10 min a 50 °C, tras lo cual, la mezcla se centrifuga y se recupera el sobrenadante. El DNA así extraído se puede almacenar a -20 °C.

4.3. PURIFICACIÓN DE DNA

La purificación de DNA se llevó a cabo con el sistema de purificación de QIAGEN. Una colonia de células transformadas con el plásmido apropiado se emplea para inocular 3-5 ml de medio de cultivo, complementado con el agente selectivo apropiado. El medio se crece hasta alcanzar saturación (12-16 h). Las células se recogen centrifugando 2-3 min y se lisan en NaOH/SDS, en presencia de RNAasa A, incubándose a temperatura ambiente durante 5 min, con agitación continua. El SDS

desnaturaliza las proteínas, las condiciones alcalinas provocan la desnaturalización de DNA cromosómico y plasmídico y la RNAasa digiere el RNA. El lisado se neutraliza con acetato potásico 3.0 M, pH 5.5 durante 10 min a 4 °C. La alta concentración salina precipita las proteínas desnaturalizadas, el DNA cromosómico y el SDS, mientras que el DNA plasmídico, más corto, se renaturaliza correctamente y permanece en disolución. El sedimento precipitado se elimina centrifugando. El sobrenadante se carga en la columna que contiene la resina a la que se unirá el DNA, equilibrada con tampón QBT (NaCl 0.75 M, MOPS 50 mM, etanol 15%, pH 7.0, Triton X-100 0.15%). La columna se lava con el tampón QC (NaCl 1.0 M, MOPS 50 mM, etanol 15%, pH 7.0) para eliminar todos los contaminantes. El DNA se eluye con tampón QF (NaCl 1.25 M, 50 mM Tris/HCl, etanol 15%, pH 8.5). El DNA eluido se desala y se concentra precipitándolo con isopropanol a temperatura ambiente y centrifugando durante 30 min a 10000 rpm. El sedimento se lava con etanol al 70% para eliminar las posibles trazas de sales y reemplazar al isopropanol, pues el etanol es más fácil de eliminar al ser más volátil. Después de secar el sedimento al aire, el DNA se resuspende en un volumen pequeño de TE o de agua estéril.

5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS (PAGE-SDS)

La preparación de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis se llevan a cabo en un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad. Los geles tienen 0.75 mm de espesor, 7 cm de alto y 8 cm de ancho.

En todos los casos se ha realizado la electroforesis a un 15% de acrilamida en el gel de desarrollo y con bisacrilamida al 0.25%, tampón Tris 0.38 M, pH 8.8 y SDS al 0.1% (p/v). El gel superior o concentrante, se prepara al 4% de acrilamida y 0.1% de bisacrilamida en tampón Tris 0.12 M, pH 6.8, conteniendo SDS al 0.1% (p/v). Para la polimerización de los geles se añaden disoluciones de persulfato amónico al 0.02% (p/v) como agente catalizador y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) al 0.075% (p/v) como propagador de la reacción.

Las muestras se disuelven en tampón de aplicación de electroforesis, que contiene SDS al 3% (p/v), β -mercaptoetanol al 1% (v/v) y azul de bromofenol al 0.02% (p/v) como indicador de la migración (Laemli, 1970), y se calientan a ebullición durante 10 min. Se aplica en los pocillos entre 10 y 15 μ l de disolución (generalmente alrededor de 1 a 2 μ g de proteína).

La electroforesis se desarrolla a temperatura ambiente en tampón Tris 0.025 M, glicocola 0.192 M, pH 8.3, conteniendo SDS al 0.1% y a 25 mA/gel hasta que el marcador llega al final del gel.

Los geles se tiñen empleando azul de Coomassie R-250 al 0.25% y se destiñen con metanol al 20% y ácido acético al 7.5%.

6. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN

La inmunodetección se ha llevado a cabo mediante el método de Burnette (Burnette, 1981). Después de una electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. La transferencia se realizó en un aparato de transferencia LKB, durante 1 h a 0.9 mA/cm² de gel, en ácido 3-(Ciclohexilamino)-1-propano sulfónico (CAPS), metanol 20% (v/v) y SDS 0.033%, pH 11. Posteriormente, la membrana se tapizó con albúmina de suero bovino (BSA) al 4% en PBS, pH 7.6 durante 2 h. A continuación, se incubó con suero de caballo infectado por EIAV en una dilución 1:50 en PBS a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras un lavado con PBS-Tween al 0.05% durante 30 min, la membrana se incubó durante 1 h con una dilución 1:3000 de peroxidasa anti-IgG de caballo (Sigma) en PBS-BSA al 0.1% (p/v). El revelado se realizó por adición de la solución de revelado que contiene tetrahidroclorato de 3,3'-diaminabencimida (DAB) 0.033% (p/v) y H₂O₂ 0.016% (v/v) en tampón PBS.

7. ENZIMOINMUNOENSAYO

Placas de 96 pocillos (Costar) fueron tapizadas con 50 µl de una disolución de rp26 a 5 µg/ml en tampón carbonato/bicarbonato sódico 20 mM, pH 9.0 durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron después con PBS y se guardaron a 0 °C hasta el momento de utilizarlas. La proteína recombinante se acopló con la peroxidasa de rábano activada con periodato en una relación molar 1:1, siguiendo procedimientos previamente descritos (Harlow y Lane, 1988). Se obtuvo un lote de sueros negativos y positivos del Departamento de Agricultura estadounidense (Ames, Iowa) y se analizó usando el siguiente procedimiento. Se añadieron 50 µl de suero sin diluir a dos pocillos, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min y se lavaron posteriormente con PBS. Se añadieron entonces 50 µl de peroxidasa conjugada con rp26 diluida (0.5 µg/ml de peroxidasa) a cada pocillo y se incubó durante 10 min. Los pocillos se lavaron con PBS y se

añadió el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TM Blue). El color se desarrolló durante 10 min y la reacción se paró con la adición de 100 μ l de ácido fosfórico 1 M, tras lo cual se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Titertek Uniskan II (Flow Labs.).

8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

8.1. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

La hidrólisis de la proteína (entre 15 y 20 μ g) se realiza a vacío, con 0.1 ml de HCl tridestilado azeótropo, 5.9 N, conteniendo fenol al 0.1% (p/v), a 115 °C durante 24 horas. Finalizado el proceso, las muestras se llevan a sequedad en un desecador a vacío añadiendo 2 veces un volumen de 0.1 ml de agua destilada y secando después de cada adición. Las muestras se disuelven en 50 μ l de tampón de aplicación, que contiene 19.61 g de citrato sódico, 20.0 ml de tiodiglicol, 16.5 ml de HCl concentrado y 1.0 ml de fenol, en un volumen final de 1 L, a pH 2.2. La muestra se pasa a un tubo cónico de teflón, analizándose, previa centrifugación, entre 10 y 30 μ l. Los análisis de aminoácidos se llevan a cabo en un analizador automático Beckman 6300. El número de nanomoles de cada aminoácido se calcula a partir del área del pico correspondiente comparando con los valores obtenidos para una mezcla estándar de aminoácidos. Para calcular las posibles pérdidas en el sistema de inyección se utiliza NLeu como estándar interno. Los análisis se procesan con el programa System Gold de Beckman.

8.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN

La concentración de las diferentes disoluciones de proteína empleadas se ha determinado también a partir de los espectros de absorción en el ultravioleta. Para ello se han determinado el coeficiente de extinción de las diferentes muestras cuantificando la cantidad de proteína mediante análisis de aminoácidos. Los espectros de absorción, realizados entre las longitudes de onda de 250 y 350 nm, se han obtenido en un espectrofotómetro Beckman DU-7 de un solo haz. Se ha empleado una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Cuando ha sido necesario, la contribución de la dispersión a la absorbancia se ha calculado suponiendo una proporcionalidad inversa entre la dispersión y la cuarta potencia de la longitud de onda a la que se mide en el intervalo 320-350 nm. El cálculo de la concentración de la proteína se ha realizado a partir de la ecuación [1]:

$$[1] \quad C(\text{mg/ml}) = \frac{A_{280} - D_{280}}{\frac{0.1\%}{\epsilon_{280}}}$$

donde:

- A_{280} es la absorbancia de la muestra a 280 nm.
- D_{280} es la dispersión óptica a 280 nm.
- $\epsilon_{280}^{0.1\%}$ es la absorción a 280 nm de una disolución de proteína a 1 mg/ml.

9. VALORACIÓN DE GRUPOS TIÓLICOS LIBRES

La valoración del número de grupos tiólicos libres se llevó a cabo mediante el método de Ellman (Ellman, 1959). Alrededor de 100 μg de proteína en condiciones nativas (fosfato sódico 10 mM, pH 7.0) o en condiciones desnaturizantes (fosfato sódico 10 mM, cloruro de guanidinio (HClGu) 6 M, pH 7.0) se incubaron con ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) 0.7 mM, siguiéndose la cinética de la reacción mediante medida de la absorbancia a 412 nm de forma continua. La concentración de los grupos sulfhidrilos libres se determinó dividiendo la absorción neta obtenida después de restar el valor de absorción de un blanco carente de proteína, entre el coeficiente de extinción del ácido nitrobenzoico, en presencia o ausencia de cloruro de guanidinio, 14200 y 13880 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, respectivamente. Para valorar el número de grupos tiólicos totales de la proteína, ésta se redujo previamente con ditioneitol (DTT) 100 mM durante 90 min. El exceso de agente reductor se eliminó cargando la muestra en una columna PD-10. Una alícuota de la fracción que contiene la proteína se valoró con DTNB en condiciones desnaturizantes.

10. MARCAJE DE CISTEÍNAS LIBRES

Una disolución de 1 mg de la proteína rp26 de EIAV se marcó con 5 μl de ^{14}C -iodoacetamida (58 mCi/mmol, Amersham) en presencia de HClGu 6 M durante 45 min a 37 °C. El exceso de ^{14}C -iodoacetamida se eliminó mediante una cromatografía de filtración en gel usando una columna PD-10 (Pharmacia). A continuación, la proteína se redujo con DTT 100 mM en HClGu 6 M y se volvió a alquilar con iodoacetamida 150 mM sin marcar. La proteína así marcada se dializó exhaustivamente frente a agua y se liofilizó. Posteriormente se disolvió en bicarbonato

amónico 0.1 M, pH 8.0 y fue digerida con tripsina a una relación enzima:sustrato de 1:150 en peso durante 4 horas a 37 °C. La proteína digerida se secó a vacío y se redisolvió en ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%. La separación de los péptidos resultantes de la digestión se llevó a cabo mediante HPLC (Beckman) utilizando una columna Ultrasphere-ODS y un gradiente lineal de acetonitrilo en TFA 0.1% (0-30%) durante 80 min. El flujo en la columna fue de 1.0 ml/min. Alícuotas de 50 μ l de las fracciones recogidas se contaron en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801 y aquéllas que poseían mayor radiactividad se hidrolizaron con HCl 6 N, 115 °C, 24 h y se analizaron en un analizador de aminoácidos Beckman 6300.

11. REDUCCIÓN Y CARBOXIAMIDOMETILACIÓN

Alrededor de 2 mg de proteína se incubaron durante 90 min a 37 °C en presencia de una disolución que contenía Tris 1 M, HClGu 6 M, DTT 100 mM, EDTA 2 mM. Transcurrido este tiempo se añadió iodoacetamida hasta alcanzar una concentración final de 125 mM y se incubó de nuevo a 37 °C, en oscuridad, durante 70 min. El exceso de iodoacetamida y DTT se eliminó dializando frente a fosfato sódico 10 mM, pH 8.0, durante toda la noche a 4 °C.

12. OXIDACIÓN Y REDUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

El estado de oxidación de los grupos SH en la estructura de la proteína se midió comparando con las formas extremas totalmente oxidada y reducida. Para llevar a cabo la oxidación se incubaron durante 90 min 0.3 mg de proteína en presencia de CuSO_4 2 mM. El sulfato de cobre se eliminó posteriormente de la disolución dializándose frente a Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 durante toda la noche a 4 °C.

La reducción se llevó a cabo incubando la proteína durante toda la noche a temperatura ambiente con DTT 200 mM, empleándose posteriormente para hacer estudios espectroscópicos. Parte de la proteína reducida se pasó a través de una columna PD10 para eliminar el exceso de DTT.

13. DICROÍSMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un dicrógrafo Jasco J-715. Se emplearon cubetas de cuarzo de 0.1 cm o 1 cm de paso óptico para las regiones del ultravioleta lejano (185-250 nm) o próximo (250-330 nm),

respectivamente. El tampón empleado fue fosfato sódico 10 mM, pH 7.0. Los valores de elipticidad molar media por residuo se calculan tomando como masa molecular por residuo el valor de 113. Estos datos se expresan en términos de $[\Theta]_{M.R.W.}$ (grado \times $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$). La concentración de proteína empleada fue de 0.1-0.2 mg/ml (UV lejano) y 1 mg/ml (UV próximo).

13.1. CÁLCULO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

La estructura secundaria de las proteínas se ha evaluado a partir de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano por el método *Convex Constraint Analysis* (CCA) (Perczel *et al.*, 1991). Este método permite deducir la contribución quiral de los elementos de estructura secundaria más comunes, directamente de los espectros de CD experimentales y no hace uso de los datos de rayos X de proteínas conocidas. El algoritmo descompone el espectro en sus componentes puras que resultan ser muy parecidas a los que se obtienen utilizando polipéptidos modelo.

13.2. DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA

Las curvas de desnaturalización térmica de las diferentes muestras de proteína se obtuvieron midiendo de forma continua la elipticidad a 208 nm en un intervalo de temperaturas de 25 a 70 °C. La temperatura de la cubeta se mantuvo mediante un baño Neslab RT-111 y se incrementó a una velocidad de 30 °C/h.

14. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

La predicción de estructura secundaria se ha llevado a cabo aplicando el método de Chou y Fasman (Chou y Fasman, 1978), en el que se calcula la probabilidad de que los distintos aminoácidos adopten un determinado tipo de estructura secundaria, basándose en proteínas de estructura tridimensional conocida, y mediante el programa ANTHEPROT (Geourjon y Dèlèage, 1993).

15. FLUORESCENCIA

15.1. ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA

Los estudios de fluorescencia se han realizado en un espectrofluorímetro SLM AMINCO 8000C (SLM Instruments), equipado con un arco de Xenon de 450 W. Se emplearon cubetas de cuarzo de 0.2 ó 0.4 cm de paso óptico de excitación y de 1 cm de paso óptico de emisión. La concentración de proteína se mantuvo entre 0.05-0.1 mg/ml. Los espectros de emisión de la proteína se midieron en un intervalo de longitudes de onda entre 285 y 450 nm y entre 305 nm y 450 nm excitándose a 275 o 295 nm, respectivamente. Se emplea una rendija de 4 mm tanto en excitación como en emisión, siendo la velocidad de barrido de 60 nm/min. La temperatura en la cubeta se mantiene constante mediante un baño termostatzado de agua circulante Polystat (Huber).

En general, es posible conocer la contribución de las tirosinas a la emisión de fluorescencia en el espectro registrado excitando a 275 nm. Para ello es necesario conocer un factor de normalización que se calcula midiendo la relación que existe entre los espectros de emisión obtenidos excitando a 275 y 295 nm a partir de una longitud de onda de 380 nm, en la que no existe contribución de las tirosinas. El espectro obtenido excitando a 295 nm se multiplica por este factor y la contribución de las tirosinas se obtiene como la diferencia entre el espectro de emisión con excitación a 275 nm y este espectro normalizado.

15.2. ESTUDIOS DE APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA

Los estudios de apagamiento de fluorescencia se han realizado añadiendo, de forma acumulativa, diversas cantidades de yoduro potásico 2 M a una disolución de 60 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, midiéndose el espectro de emisión a cada concentración del agente para una longitud de excitación de 290 nm. La disolución de IK contiene $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10^{-4} M para evitar la formación de I_3^- , que absorbe en la zona de los triptófanos y que además podría reaccionar con la proteína. Se elige un valor de $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm porque a esa longitud de onda no absorbe el yoduro y así se evitan los posibles errores debidos al efecto de filtro interno. Paralelamente se han llevado a cabo experimentos idénticos, sustituyendo las cantidades de agente de apagamiento por volúmenes iguales de disolución de NaCl 2 M, con el fin de tener en cuenta tanto el efecto de la dilución de la proteína como el posible efecto del aumento de fuerza iónica en la intensidad de fluorescencia.

Las intensidades de fluorescencia se han medido en el máximo del espectro de emisión de fluorescencia a 330 nm. El alto rendimiento cuántico del Trp relativo al de la Tyr, junto con la longitud de onda escogida permite considerar que la fluorescencia observada se debe, mayoritariamente, a los residuos de triptófano. Los cálculos de la constante de apagamiento se han realizado a partir de la ecuación de Stern-Volmer:

$$[2] \quad F_0/F = 1 + K_D \cdot [Q]$$

donde:

- F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia (obtenidas al añadir NaCl 2 M a la muestra) y en presencia de agente de apagamiento, respectivamente.
- $[Q]$ es la concentración de agente de apagamiento.
- K_D es la constante de apagamiento de Stern-Volmer: el inverso de su valor representa la concentración de agente de apagamiento a la que $F_0/F = 2$, es decir, a la que la intensidad de fluorescencia disminuye un 50%. El valor de K_D es la pendiente de la recta obtenida al representar F_0/F frente a $[Q]$.

Si al realizar la representación de Stern-Volmer no se obtiene una recta, el análisis de los experimentos de apagamiento debe realizarse por medio de una forma modificada de la ecuación de Stern-Volmer (Lehrer, 1971):

$$[3] \quad F_0/\Delta F = 1/f_a \cdot K \cdot [Q] + 1/f_a$$

donde $\Delta F = F_0 - F$, f_a es la fracción de fluorescencia inicial que es accesible al agente de apagamiento y K es la constante de apagamiento de Stern-Volmer de la fracción accesible de fluoróforos. Representando los valores de $F_0/\Delta F$ frente a los de $1/[Q]$ se obtiene una recta en la que se pueden calcular los valores de f_a y K a partir de la ordenada en el origen (f_a^{-1}) y de la pendiente ($f_a \cdot K$)⁻¹.

16. ESTUDIOS DE DESNATURALIZACIÓN POR UREA

Para estudiar la desnaturalización de la proteína FIV-rp24 y las diferentes formas mutantes, se prepararon disoluciones de las diferentes proteínas, a una concentración entre 0.1-0.15 mg/ml, con diferentes cantidades de una disolución de urea 10 M se incubaron durante 16 h a 4° C, condiciones en las que se alcanza una situación de equilibrio. El tampón empleado en todas las disoluciones fue fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, conteniendo el agente reductor Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 1 mM (Burns *et al.*, 1991). A continuación se midieron los espectros de dicroísmo en el UV lejano y los espectros de emisión de fluorescencia excitando a 275 nm y 295 nm de todas las disoluciones de proteína a 25 °C. La representación, bien de la elipticidad a 220 nm, bien de la longitud de onda a la que aparece el máximo de emisión, frente a la concentración de urea permite obtener las curvas de desnaturalización. Con estos datos se calcula la fracción de proteína que se encuentra desnaturalizada (F_{ap}) a cada concentración de urea mediante la ecuación [4] (Pace, 1986):

$$[4] \quad F_{ap} = \frac{Y_{obs} - Y_n}{Y_d - Y_n}$$

donde:

- Y_{obs} es el valor del parámetro estructural (Θ_{220} o $\lambda_{m\acute{a}x}$) de la proteína a cada concentración de urea.
- Y_n es el valor del parámetro de la proteína nativa a cada concentración de urea.
- Y_d es el valor del parámetro de la proteína desnaturalizada a cada concentración de urea.

El efecto de la urea en el valor de los parámetros estructurales de las formas nativa y desnaturalizada se evaluó midiendo los valores de Y_n e Y_d a cada concentración de urea y extrapoliando los tramos rectos obtenidos a baja y alta concentración de urea respectivamente (Pace, 1986).

La variación de energía libre de la desnaturalización en ausencia de agente desnaturalizante, $\Delta G_d^{H_2O}$ puede determinarse mediante dos modelos:

A. EXTRAPOLACIÓN LINEAL (Pace, 1986)

La manera más simple de estimar $\Delta G_d^{H_2O}$ es asumir que existe una dependencia lineal de ΔG con la concentración de agente desnaturizante.

$$[5] \quad \Delta G_d = \Delta G_d^{H_2O} - m \cdot [U]$$

donde:

- ΔG_d es la variación de energía libre de la desnaturalización
- m es la dependencia de ΔG_d con la concentración de urea.

Sólo los valores de ΔG_d del intervalo lineal de la región de transición se emplearon para la extrapolación de $\Delta G_d^{H_2O}$ a $[U] = 0$ M.

B. MODELO DE UNIÓN DEL AGENTE DESNATURALIZANTE (Tanford, 1970)

En este modelo se asume que la constante de equilibrio del proceso de desnaturalización que implica dos estados, nativo y desnaturizado, se ajusta al modelo lineal de la unión de agente desnaturizante:

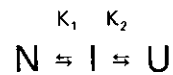
$$[6] \quad K_{ap} = K^{H_2O} \cdot (1 + k \cdot a)^{\Delta n}$$

donde:

- K_{ap} es la constante de equilibrio aparente a una actividad de urea.
- K^{H_2O} es la constante de equilibrio en ausencia de urea.
- k es la constante de unión del agente desnaturizante a la proteína.
- Δn es la diferencia en el número de sitios de unión de urea para la proteína nativa y desnaturizada .
- a es la actividad de urea cuyo cálculo se hace con la siguiente expresión (Bower y Robinson, 1963):

$$a \text{ (M)} = 0.9815 \times [U] - 0.02978 \times [U]^2 + 0.00308 \times [U]^3$$

Cuando las curvas de desnaturalización no pueden ser ajustadas con un modelo de dos estados, es necesario incluir otra especie más en el proceso de desnaturalización:



donde I es la especie parcialmente desnaturalizada y K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio. Se utilizó un programa de ajuste no lineal (Sigma Plot) que emplea el algoritmo de Marquardt-Levenberg (Marquardt, 1963; Press *et al.*, 1986) para estimar el valor de los parámetros de la siguiente ecuación:

$$[7] \quad K_{ap} = \frac{K_1 K_2 + Z K_1}{1 + (1 - Z) K_1}$$

donde:

- K_{ap} es la constante aparente de equilibrio.
- K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio de los procesos de desnaturalización y dependen de la concentración de urea según la ecuación [6].
- El parámetro Z es el cambio fraccional de las propiedades espectroscópicas en la transición de N a I y está definido por $Z = (Y_i - Y_n) / (Y_d - Y_n)$, donde Y_i es el valor de la propiedad espectroscópica de la especie intermedia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA. PAPEL DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO EN EL MANTENIMIENTO DE LA ESTRUCTURA

1.A. CLONACIÓN , EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EIAV-rp26 DE EIAV

Siguiendo la estrategia comentada en el apartado *Métodos Experimentales*, el gen que codifica la proteína mayoritaria de la cápsida de EIAV, p26, se transcribió a partir de RNA viral. Este RNA, que había sido extraído de suero infectado, se amplificó por PCR empleando los oligonucleótidos cebadores que aparecen en la Figura 11-A, que introducen los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII*. El DNA resultante se clonó en los sitios de restricción *NcoI/HindIII* del plásmido pUC18N y, posteriormente, se clonó también en otro vector de expresión diferente, el plásmido pKK223-3N. La secuencia de DNA del gen p26 generado por PCR se comprobó mediante secuenciación automática, siendo idéntica a la secuencia publicada del DNA proviral (Stephens *et al.*, 1986, Kawakami *et al.*, 1987), excepto en el cambio del cuarto nucleótido de adenina a guanina que cambia el segundo aminoácido de la proteína clonada de Ile a Val (Figura 11-B).

La expresión del gen, clonado en cualquiera de los dos plásmidos utilizados, origina la aparición de una proteína con una masa molecular de 26 kDa. En la Figura 12, pocillo 1, se observa la expresión de dicha proteína utilizando el vector pUC18N. La proteína se purificó mediante el método descrito anteriormente en *Métodos Experimentales*. En la Figura 12 se recogen los resultados de PAGE-SDS de algunas etapas de la purificación. El rendimiento obtenido fue de 1.2 a 1.5 mg/L de medio de cultivo. La pureza de la proteína se determinó mediante el densitometrado de geles de PAGE-SDS teñidos con azul de Coomassie, siendo ésta superior al 95%. Tanto el rendimiento como la pureza de la preparación final de EIAV-rp26 que se obtiene a partir del plásmido pUC18N/EIAVp26 (pUC/rp26) o pKK223-3N/EIAVp26 (pKK/rp26) son comparables. Los resultados de PAGE-SDS en presencia y ausencia de agente reductor (Fig. 12, pocillos 4 y 5) indican que la proteína EIAV-rp26 se comporta como un monómero de 26 kDa. Esta naturaleza monomérica se confirmó mediante cromatografía de penetrabilidad en Biogel P-100. El volumen de elución no varía en el intervalo de concentraciones estudiado, de 1 a 20 mg/ml, e indica que la proteína tiene 26 kDa. Además el volumen de elución no depende de la fuerza iónica del tampón de elución (0.05-0.25 M NaCl) (resultados no mostrados).

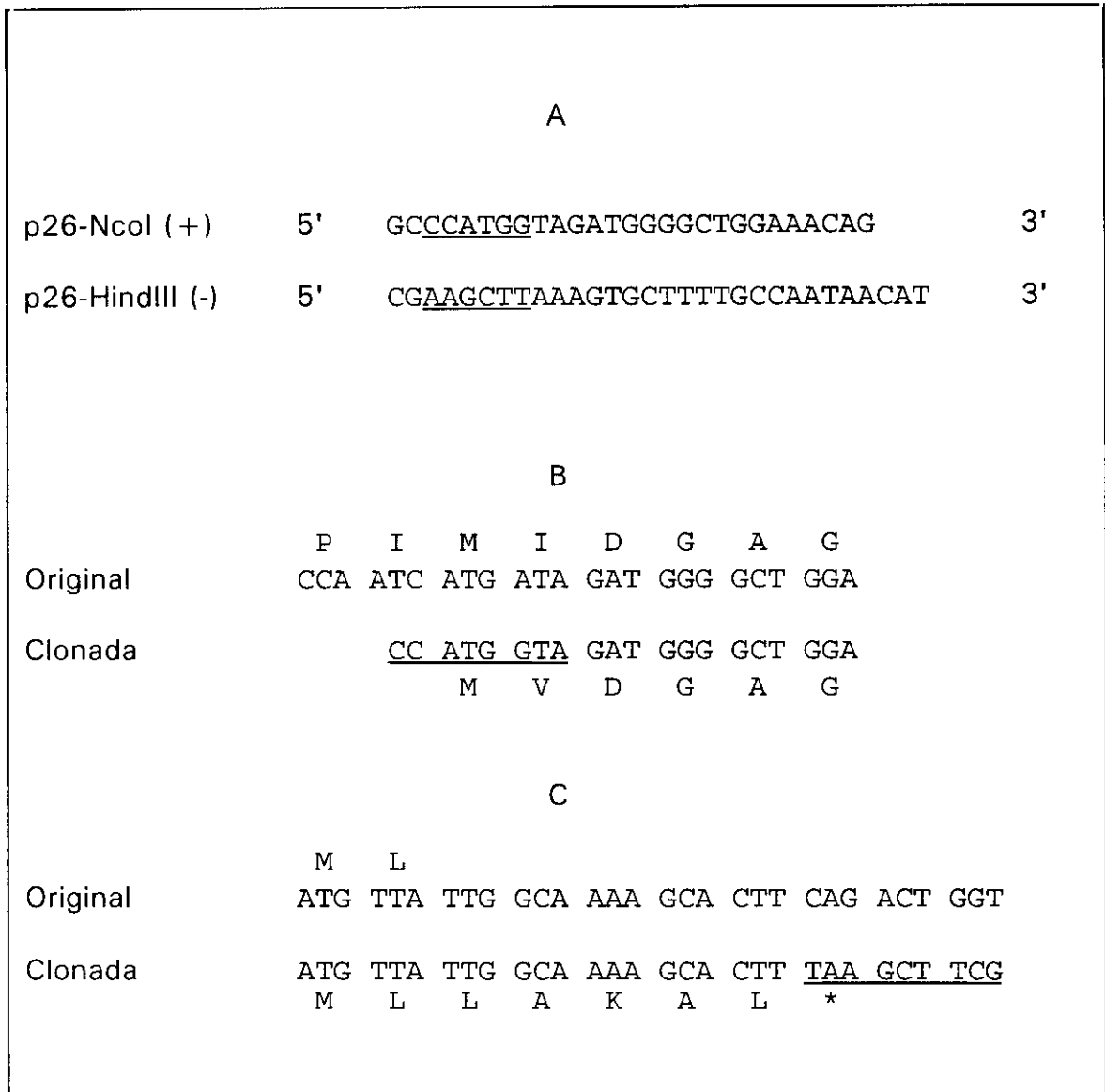


Figura 11. Estrategia de clonación de EIAV-rp26. (A) Secuencia de los oligonucleótidos cebadores empleados en la reacción de PCR para amplificar el gen de p26. El cebador 5' *NcoI* introduce un sitio de restricción *NcoI*, mientras que el cebador 3' *HindIII* introduce un sitio de restricción *HindIII* y un codón de terminación (*). (B) Alineamiento de las secuencias original y clonada del extremo amino terminal de la proteína p26. (C) Alineamiento de secuencias original y clonada del extremo carboxilo-terminal de la proteína p26. Los nuevos sitios de restricción se encuentran subrayados (*NcoI* - CCATGG; *HindIII* - TTCGAA) y 'TAA' (*) es el codón de terminación del gen clonado. Como la proteasa de EIAV rompe el enlace L-L (Henderson *et al.*, 1987; Tözser *et al.*, 1993) la secuencia carboxilo-terminal de p26 es M-L. Sin embargo, EIAV-rp26 contiene el pentapéptido L-A-K-A-L- que en el precursor Pr55gag se encuentra entre p26 y p11.

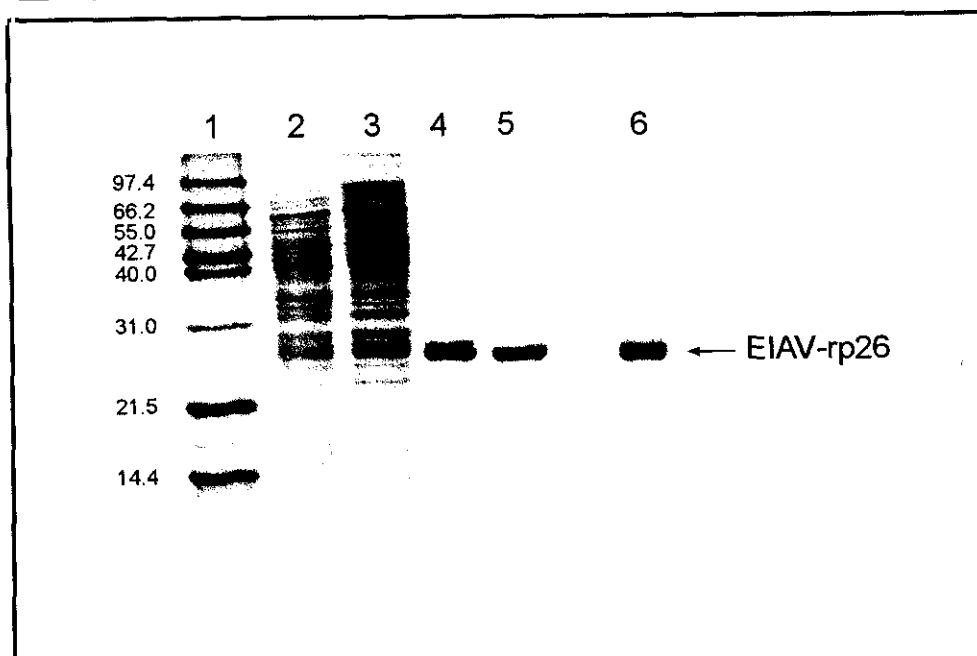


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS de los pasos de purificación de EIAV-rp26. Pocillo 1, lisado celular; pocillo 2, precipitación con sulfato amónico al 50%; pocillo 3, conjunto de fracciones del DEAE DE-51 que contienen rp26; pocillo 4, conjunto de fracciones del Sephacryl S-100 que contienen rp26; pocillo 5, rp26 purificada en ausencia de β -mercaptoetanol; M, marcadores de masa molecular.

La composición de aminoácidos de la proteína EIAV-rp26 aparece en la Tabla III, donde se compara con la composición teórica determinada a partir de la secuencia de DNA publicada (Stephens *et al.*, 1986; Kawakami *et al.*, 1987), observándose que son prácticamente coincidentes. Además, la identidad de la proteína se confirmó mediante el análisis de la secuencia amino-terminal. Los resultados de cinco ciclos de secuencia automática indican que los primeros cinco residuos de EIAV-rp26 son Val, Asp, Gly, Ala y Gly, los cuales coinciden con los residuos 2 a 6 de la secuencia clonada y los residuos 4 a 8 de la secuencia publicada (Henderson *et al.*, 1987). Es frecuente en proteínas que se expresan en *E. coli*, que éstas pierdan el residuo iniciador de metionina a través de la rotura proteolítica del residuo formil-metionina, catalizada por la desformilasa y la metionina aminopeptidasa. Según las observaciones de Hirel *et al.* (Hirel *et al.*, 1989), en el caso de EIAV-rp26, ya que el segundo aminoácido es valina, la eliminación del amino-terminal fMet sería esperable.

La proteína recombinante EIAV-rp26 posee 233 aminoácidos y difiere de la proteína de la cápsida viral p26, de 230 aminoácidos, en que posee dos aminoácidos menos en el extremo amino terminal, Pro e Ile, en el cambio del segundo residuo de Val a Ile, (Fig. 11-B) y en que posee una extensión de cinco residuos en el extremo

carboxilo-terminal que en el precursor Pr55gag se encuentra entre las proteínas p26 y p11 (Henderson *et al.*, 1987) (Figura 11-C). Cabe esperar que estos cambios sean poco significativos en lo que a estructura tridimensional de la proteína se refiere.

AMINOÁCIDO	COMP. TEÓRICA	COMP. EXPER.
ALA	18	18
ARG	16	17
ASX	26	25
CYS ¹	3	3
GLX	32	32
GLY	15	16
HIS	3	4
ILE	16	15
LEU	20	20
LYS	12	12
MET ²	10	9
PHE	8	8
PRO	17	16
SER	7	8
THR	14	14
TRP ³	3	3
TYR	4	4.5
VAL	9	9

Tabla III. Composición teórica y experimental de la proteína EIAV-rp26 de EIAV. La composición teórica se determinó a partir de la secuencia de DNA. (1) El número de residuos de cisteína se determinó como CmCys en la proteína reducida con DTT y carboxiamidometilada. (2) En el número de Met teóricas se incluye la correspondiente al extremo amino-terminal. (3) El número de residuos de triptófano se calculó mediante el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967).

1. B. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE EIAV-rp26

Las cápsidas lentivirales están constituidas por varias copias de una o más proteínas que interaccionan para formar una envoltura icosaédrica, la cual envuelve al RNA viral. Estudios de microscopía electrónica (Gelderblom *et al.*, 1989; Özel *et al.*, 1990; Gelderblom *et al.*, 1991; Höglund *et al.*, 1992) indican que la proteína adopta una estructura en forma de cono doblemente truncado. Ante la ausencia de datos cristalográficos o estudios estructurales detallados, algunos autores han postulado que la simetría cónica de la cápsida podría explicarse suponiendo una simetría con un número de triangulación, $T=3$ (Rossmann, 1988), mientras que la proteína adoptaría una conformación de barril β con ocho cadenas (Argos, 1989). Esta estructura permitiría la existencia de un orificio hidrofóbico en cuyo interior podrían alojarse sustancias antivirales tales como compuestos WIN encaminadas a la eliminación del virus (Argos, 1989; Phelps y Post, 1995). Sin embargo, la aplicación de métodos predictivos o de análisis mediante difracción circular indican una estructura secundaria inconsistente con el modelo de barril β , siendo la hélice α la estructura mayoritaria.

MÉTODOS PREDICTIVOS

La predicción de estructura secundaria se realizó aplicando el programa ANTHEPROT (Geourjon y Deléage, 1993), que engloba diferentes métodos, obteniéndose en todos los casos unos resultados muy parecidos, siendo el elemento mayoritario de estructura secundaria la α -hélice. En la Figura 13 aparecen los resultados de la predicción de la estructura secundaria de EIAV-rp26 por el método de Chou-Fasman (Chou y Fasman, 1978). Este método emplea una serie de valores correspondientes a la probabilidad que tiene cada aminoácido de ocupar una posición en una hélice α , estructura β o giro β ; a esta última estructura es a la que se da mayor importancia, pues la asignación de estructura secundaria para la proteína comienza con la determinación de los giros β que hay en la secuencia. Prácticamente, la mitad de la estructura es hélice α , estando los diferentes fragmentos helicoidales diseminados por toda la secuencia de aminoácidos. La composición de estructura secundaria de la proteína sería de un 46% de hélice α , 24% de estructura β , 12% de giro β y un 18% de estructura no ordenada.

El resto de los métodos empleados proporcionan unos resultados similares (Tabla IV), dando cuenta de la hélice α del 35-50% de la estructura secundaria, mientras que la lámina β daría cuenta del 10-20%.

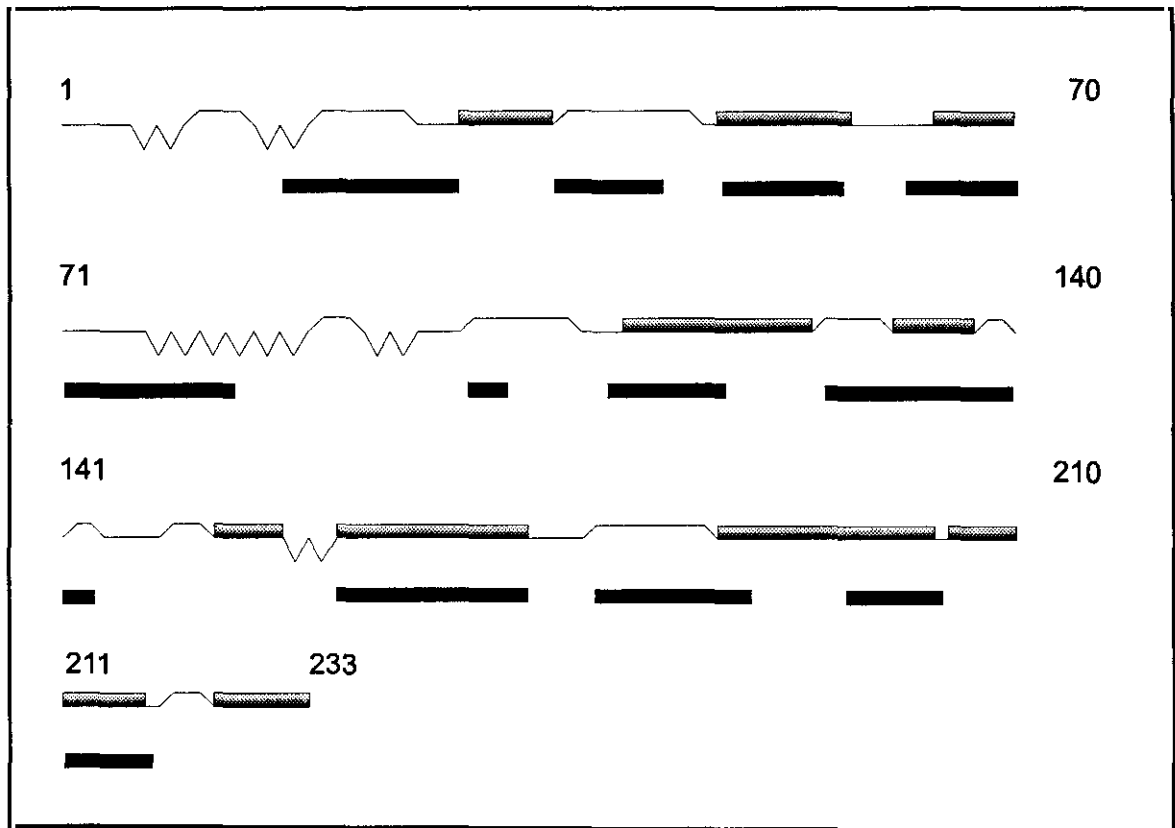


Figura 13. Predicción de estructura secundaria mediante el método de Chou-Fasman (Chou y Fasman, 1978). (■) α-hélice; (∩) estructura β; (▽) giro β. Debajo de la secuencia de EIAV-rp26 aparecen aquellas zonas que poseen estructura helicoidal en los dominios 1-151 y 151-231 en la proteína p24 de HIV-1 (■) (Gamble *et al.*, 1997; Gitti *et al.*, 1996).

MÉTODO	% estructura β	% α-hélice	% giro β	% estructura no ordenada
Garnier	11	33	8	48
Robson y Garnier	21	37	15	27
Gibrat	15	49	-	36

Tabla IV. Predicción de estructura secundaria de la proteína EIAV-rp26 de EIAV mediante diferentes métodos de predicción englobados en el programa ANTHEPROT (Geourjon y Deléage, 1993).

DICROÍSMO CIRCULAR

La proteína EIAV-rp26 purificada presenta un espectro de absorción característico de una proteína soluble, con un máximo de absorción alrededor de los 280 nm, sugiriendo que no contiene ácidos nucleicos. El coeficiente de extinción molar para esta proteína calculado experimentalmente mediante análisis de aminoácidos es $26974 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, es decir, una disolución de proteína a 1 mg/ml tendría un valor de A_{280} de 1.03.

Es ampliamente conocido que las diferentes formas de estructura secundaria regular encontradas en péptidos y proteínas poseen diferentes espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano. Las características de los espectros pueden depender de la longitud y regularidad de los elementos estructurales en las proteínas (Hirst y Brooks, 1994). Para determinar la composición de estructura secundaria de la proteína EIAV-rp26 de una forma experimental, se midió su espectro de dicroísmo circular en el UV lejano (Figura 14-A). En él se observan dos mínimos bien diferenciados a 208 y 220 nm, característicos de la estructura α -hélice. El valor de elipticidad a 208 nm es de -21400 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ y a 220 nm de -17960 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. A partir de los datos experimentales y utilizando el método *Convex Constraint Analysis* (CCA) (Perczel *et al.*, 1991) se determinaron los siguientes porcentajes de estructura secundaria: 50% de α -hélice, 1% de estructura β , 15% de giros β y 34% de estructura no ordenada. El espectro resultante del ajuste aparece representado en la Figura 14-A, junto con el espectro obtenido experimentalmente. Como se puede observar, ambos espectros son prácticamente coincidentes. Si el ajuste del espectro se realiza mediante el método de Bolotina (Bolotina *et al.*, 1980) se obtienen los siguientes resultados: 33% de α -hélice, 17% de estructura β , 20% de giro β y 30% de estructura no ordenada, donde el componente mayoritario sigue siendo la hélice α . Tanto los métodos predictivos como el dicroísmo circular indican que el elemento mayoritario de estructura secundaria es la α -hélice, por lo que el modelo de barril β que se ha propuesto para la proteína de la cápsida viral de HIV-1 parece poco probable (Argos, 1989). Por otro lado, la estructura propuesta por Argos no podría explicar las observaciones de Langedijk *et al.* (Langedijk *et al.*, 1990), quien asignó los sitios de unión de varios anticuerpos monoclonales anti-p24 a regiones de p24 que según el modelo de barril β resultarían inaccesibles.

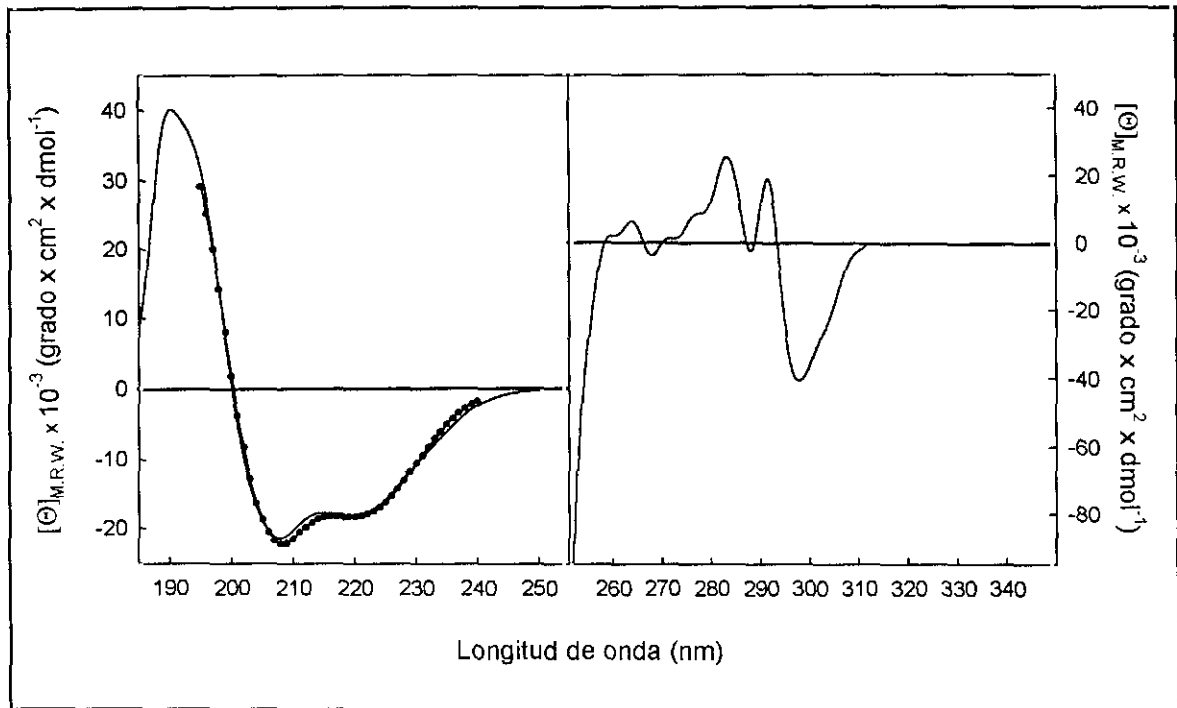


Figura 14. Espectros de dicroísmo circular de la proteína EIAV-rp26. (A) Espectro de CD en el UV lejano. Junto al espectro de la proteína medido experimentalmente, que aparece en línea continua, se representa el ajuste mediante el método CCA (●) (Perzel *et al.*, 1991). (B) Espectro de CD en el UV próximo. La concentración de proteína utilizada fue de 0.1-0.2 mg/ml para los espectros en el UV lejano y 1 mg/ml para los espectros en el UV próximo. Los espectros corresponden a la proteína obtenida cuando se utiliza el vector pUC18N/EIAVp26.

El espectro de CD de EIAV-rp26 es similar al descrito para la proteína homóloga p24 de HIV (Ehrlich *et al.*, 1994; Hausdorf *et al.*, 1994). En el primer caso se trata de una proteína que se obtiene clonando un precursor Gag-pol que sufre un procesamiento proteolítico cuando se expresa en *E. coli*. Esta proteína es capaz de formar estructuras oligoméricas no random a alta concentración, 2-30 mg/ml, manteniendo un espectro de CD similar (Ehrlich *et al.*, 1994). En el segundo caso se trata de la proteína p24 recombinante, que se obtiene renaturalizada a partir de cuerpos de inclusión (Hausdorf *et al.*, 1994). Por tanto, e independientemente del estado de agregación de la proteína, la hélice α es el elemento de estructura ordenada más abundante. En lo que a las características de la proteína responsables de la formación de la cápsida respecta, los resultados son contradictorios. Así, en el caso de EIAV se ha propuesto que es el precursor Pr55gag, y no la proteína p26

procesada, el responsable de la formación de partículas subvirales *in vivo* (McGuire *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha descrito que p24 forma estructuras alargadas tipo varilla (Ehrlich *et al.*, 1992), lo que indicaría la capacidad inherente de la propia proteína de formar estructuras oligoméricas estables. Si la formación *in vitro* de estructuras oligoméricas fuese responsable de la formación de la cápsida *in vivo*, dada la alta homología de secuencia entre todas estas proteínas, todas deberían ser capaces de formar estructuras oligoméricas. Como se ha indicado anteriormente, EIAV-rp26 permanece monomérica hasta una concentración de 20 mg/ml mientras que, como se indicará más adelante la proteína rp24 de FIV forma agregados a una concentración similar. Por tanto, parece claro que la secuencia de aminoácidos de cada proteína determina la diferente capacidad de formación de oligómeros pero que debe existir otro factor responsable de la formación de la cápsida.

El espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo de las proteínas surge de los entornos asimétricos de las cadenas laterales de los residuos aromáticos, así como de las posibles contribuciones de los puentes disulfuro, u otros cofactores de naturaleza no proteica que puedan absorber en esta región. El espectro de CD de la proteína EIAV-rp26 en el UV próximo (Fig. 14-B) presenta un mínimo alrededor de los 300 nm, zona donde absorben los residuos de triptófano (Strickland, 1974). La proteína EIAV-rp26 posee tres residuos de triptófano y cuatro residuos de tirosina, pero mediante el espectro de dicroísmo circular no se puede asignar la contribución de los residuos individualmente, ya sean residuos de triptófano, tirosina o fenilalanina.

ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

El entorno tridimensional de los residuos aromáticos de una proteína puede estudiarse también mediante espectroscopía de fluorescencia. En la Figura 15 aparecen los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína EIAV-rp26 excitando a 275 nm y 295 nm. El espectro de emisión obtenido excitando a 275 nm presenta un máximo de emisión entorno a los 324 nm. Como referencia, el triptófano libre en disolución tiene un máximo de emisión a 348 nm, mientras que cuando este residuo está en un entorno muy hidrofóbico el máximo de emisión se desplaza hacia longitudes de onda entre los 310 y 320 nm (Lackowicz, 1983). Por lo tanto, en la proteína EIAV-rp26 los residuos de triptófano están bastante ocultos en la estructura. En el espectro de emisión excitando a 295 nm se mide la fluorescencia emitida únicamente por los residuos de triptófano, que son los únicos fluoróforos que pueden excitarse a esta longitud de onda. Restando al espectro de emisión a 275 nm el de emisión a 295 nm una vez normalizado determinado considerando que a partir de

380 nm toda la emisión de fluorescencia es debida a los residuos de triptófano, se puede determinar la contribución de los cuatro residuos de tirosina al espectro de emisión de la proteína (Fig. 15). Se observa que esta contribución es muy pequeña; El valor de la intensidad de fluorescencia en el máximo de la contribución es alrededor de un 13% del valor en el máximo de emisión cuando se excita a 275 nm. Este valor tan pequeño podría indicar la existencia de procesos de transferencia de energía desde los residuos de tirosina a los de triptófano en la proteína o la mayor facilidad para la desactivación que presentan los residuos de tirosina. Esta contribución tiene un máximo cercano a los 300 nm, que es la longitud de onda a la que aparece el máximo de emisión de la tirosina en disolución.

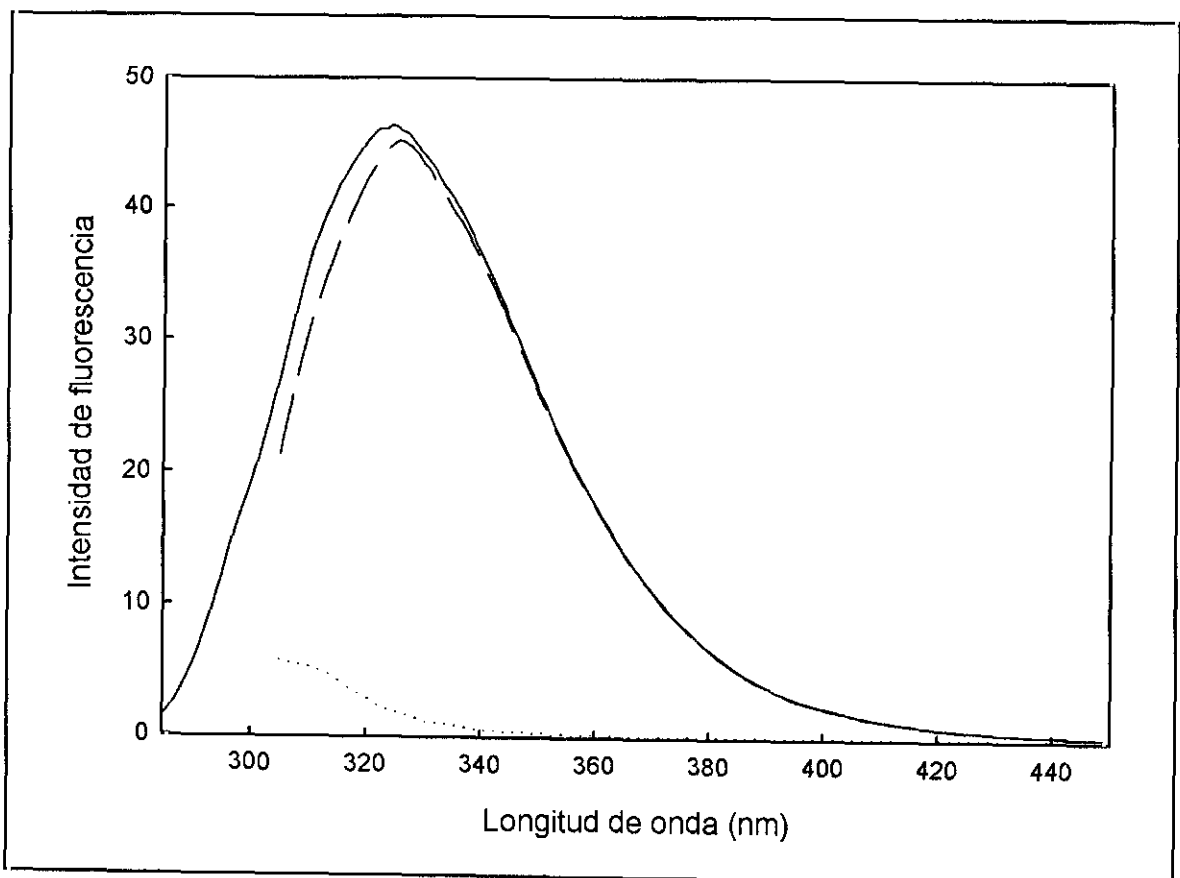


Figura 15. Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína EIAV-rp26 de EIAV. Espectros de emisión obtenidos con una longitud de excitación de 275 nm (—) y 295 nm normalizado (- - - -); contribución de los residuos de tirosina al espectro de emisión de EIAV-rp26 calculado a partir de los dos espectros anteriores (· · · · ·). Los espectros corresponden a la proteína obtenida cuando se utiliza el vector pUC18N/EIAVp26.

Los diferentes parámetros espectroscópicos de EIAV-rp26 indican que ésta posee una estructura tridimensional con un alto porcentaje de estructura ordenada. Además, EIAV-rp26 se produce en forma soluble y se ha purificado utilizando una metodología convencional no desnaturizante. Por tanto, se puede pensar que

EIAV-rp26 posee estructura nativa. Como indica su espectro de CD, aproximadamente el 50% de la estructura secundaria es hélice α , estando localizada dicha estructura tanto en la mitad amino como carboxilo-terminal. Recientemente, se ha determinado la estructura tridimensional del fragmento 1-151 de p24 de HIV-1 (Gitti *et al.*, 1996) y la del extremo carboxilo-terminal, residuos 151-232 (Gamble *et al.*, 1997). El extremo amino-terminal (residuos 1-151) adopta una estructura compuesta de siete hélices α , dos horquillas β y un giro expuesto parcialmente ordenado, mientras que en la región carboxilo-terminal hay otras cuatro hélices α que siguen a una lámina extendida. La estructura tridimensional de estos fragmentos se ha determinado suponiendo que ambos se comportan como unidades de plegamiento independientes y que poseen, de manera aislada, la misma estructura que en la proteína completa. Sin embargo, no existen datos de estructura tridimensional de la proteína entera y la suposición podría no cumplirse. De hecho, el dominio carboxilo-terminal posee estructura desordenada en cristales de dímeros de HIV-p24 (Momany *et al.*, 1996). Ahora bien, la localización en la secuencia de los fragmentos de hélice α de los fragmentos 1-151 y 151-232 de HIV-p24 coincide bastante bien con lo que se predice para la proteína homóloga p26 de EIAV (Fig. 13). Por ello, parece probable que dichos fragmentos se comporten como dominios y que posean la estructura descrita, aunque, evidentemente, son necesarios los datos de estructura tridimensional de la proteína completa.

ANÁLISIS ANTIGÉNICO DE EIAV-rp26

En la Figura 16 aparecen los resultados obtenidos en la inmunodetección de EIAV-rp26 con suero de caballo infectado por EIAV. Se utilizaron cuatro muestras de suero infectado por EIAV, elegidas al azar, (Fig. 16, pocillos 1-4), y dos muestras control, las dos no infectadas por EIAV (Fig. 16, pocillos 5 y 6). Como se puede observar, sólo en el caso de las muestras infectadas se produce la reacción con EIAV-rp26. Las líneas más débiles observadas en los pocillos 1 y 4 pueden deberse a fragmentos de EIAV-rp26 que reaccionaron con el suero correspondiente. Sin embargo, estos fragmentos no son visibles cuando los geles de poliacrilamida se tiñen con azul de Coomassie.

La antigenicidad de EIAV-rp26 también se determinó en condiciones en las que la proteína no se encuentra desnaturalizada. La Tabla V muestra los resultados obtenidos en un ensayo inmunoenzimático usando un lote de sueros positivos y negativos proporcionados por el Departamento de Agricultura de EEUU. Los valores de absorbancia de las muestras no infectadas fueron siempre inferiores a 0.04. Sin embargo, la mayoría de las muestras positivas dieron una absorbancia mayor de 1.0.

Las dos muestras positivas que dieron los valores más bajos de absorbancia, muestras 19 y 20, proceden de caballos que se consideran débilmente positivos.

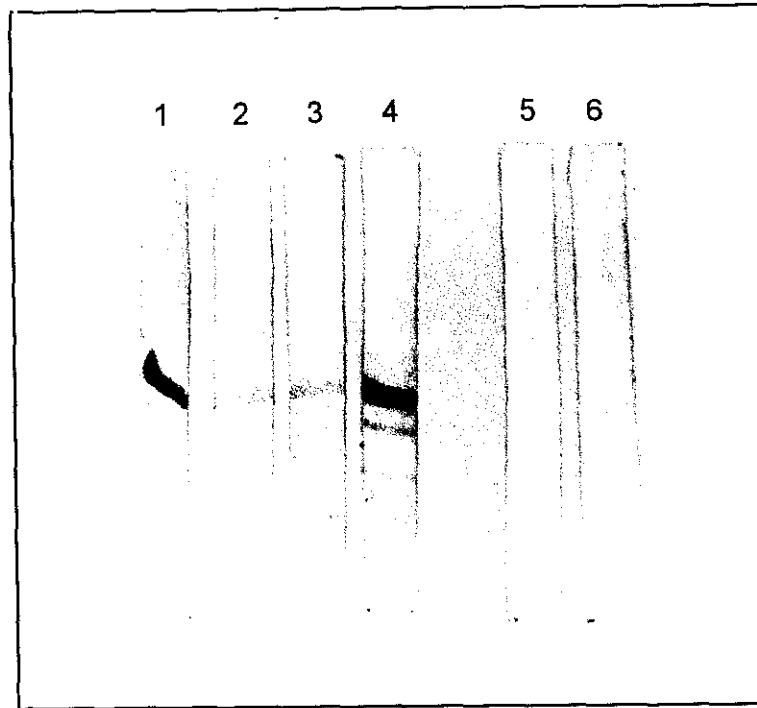


Figura 16. Inmunodetección de EIAV-rp26 con suero infectado por EIAV. La inmunodetección se llevó a cabo sobre membranas de PVDF como se describe en el apartado *Métodos Experimentales*. Pocillos 1-4, suero infectado por EIAV; pocillos 5 y 6, suero normal de caballo.

Al igual que ocurre con la proteína p24 de HIV, p26 de EIAV es una proteína muy inmunogénica que está altamente conservada entre diferentes cepas de virus (Salinovich *et al.*, 1986). Por ello, la respuesta de los anticuerpos anti-p26 constituye la base de los inmunoensayos diagnósticos. El ensayo estándar para determinar la infección por EIAV en caballos es el 'Test Coggins', aprobado por la USDA en 1972 (Coggins y Norcross, 1970). Este ensayo utiliza la inmunodifusión en geles de agar para detectar anticuerpos frente a p26. La proteína p26 utilizada en estos ensayos se obtiene a partir de cultivos de células infectadas por EIAV. La proteína recombinante EIAV-rp26 que se obtiene mediante el método descrito en esta memoria proporciona un método alternativo de obtención del antígeno para estudiar los aspectos inmunológicos de esta proteína. Los datos de inmunoblotting claramente demuestran que la proteína recombinante es reconocida por los anticuerpos presentes en los sueros de caballos infectados por EIAV, a pesar de que muchos epítopos dependientes de la conformación son destruidos mediante esta técnica. Además, la proteína recombinante se puede utilizar para detectar sueros positivos en un inmunoensayo que no desnatura la proteína. Por tanto, se puede pensar en la utilización de EIAV-rp26 en el desarrollo de nuevos ensayos diagnósticos de la infección por EIAV.

MUESTRA	ESTADO	A ₄₅₀
1	Negativo	0.013
2	Positivo	1.080
3	Negativo	0.009
4	Negativo	0.032
5	Negativo	0.002
6	Negativo	0.004
7	Negativo	0.013
8	Negativo	0.015
9	Negativo	0.003
10	Negativo	0.010
11	Positivo	>2.00
12	Positivo	>2.00
13	Positivo	>2.00
14	Positivo	1.940
15	Positivo	>2.00
16	Positivo	1.962
17	Positivo	1.787
18	Positivo	>2.00
19	Positivo	0.675
20	Positivo	0.459

Tabla V. Inmunoensayo enzimático de EIAV-rp26. La antigenicidad de EIAV-rp26 fue probada frente a un panel de sueros positivos y negativos. Los valores de absorbancia corresponden a la media de duplicados de cada muestra.

1.C. PAPEL DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN EL MANTENIMIENTO DE LA ESTRUCTURA DE EIAV-rp26

El análisis de aminoácidos de la proteína EIAV-rp26 alquilada confirma la existencia de tres residuos de cisteína. Según se deduce de la secuencia de DNA, los tres residuos de cisteína ocupan las posiciones 48, 198 y 218 de la secuencia clonada. Las dos cisteínas que se encuentran en el extremo carboxilo-terminal están muy conservadas en el resto de las proteínas de las cápsidas lentivirales (Stephens *et al.*, 1986; Talbott *et al.*, 1989; Gamble *et al.*, 1997). Además, en el caso de la proteína p24 de HIV-1 se ha descrito que entre estas dos cisteínas se forma un puente disulfuro intracatenario (Hausdorf *et al.*, 1994), por lo que podría pensarse que en el resto de las proteínas de las cápsidas ocurre lo mismo. Para determinar si en el caso de EIAV-rp26 se forma un puente disulfuro intracatenario se han llevado a cabo una serie de estudios encaminados a probar su existencia, y a determinar entre qué residuos de cisteína se forma dicho puente.

Dada la implicación estructural de este tipo de interacciones se ha estudiado el papel de los grupos SH en el mantenimiento de la estructura tridimensional de EIAV-rp26. Los estudios que se describen en esta memoria se iniciaron con la proteína EIAV-rp26 obtenida con el plásmido pKK223-3N/EIAVp26. Cuando esta proteína purificada se analiza mediante PAGE-SDS en presencia o en ausencia de agente reductor (β -mercaptoetanol al 5%), la proteína, tanto en condiciones reductoras (Fig. 12, pocillo 6) como no reductoras (Fig. 12, pocillo 7), migra como un monómero de 26 kDa, lo que indica que no hay puentes disulfuros formados entre dos moléculas de proteína. En algunas preparaciones, en ausencia de agente reductor se observa la presencia de un pequeño porcentaje de forma dimérica (5-10%).

El número de grupos SH libres de la proteína se puede determinar incubando EIAV-rp26 con DTNB en presencia o ausencia de agentes desnaturizantes como el cloruro de guanidinio o el SDS, que hacen que todos los grupos SH libres de la proteína queden totalmente accesibles al reactivo. Para las distintas preparaciones estudiadas, el número promedio de grupos SH libres, aún en presencia de agente desnaturizante, es 1.1. Este valor indica que la proteína pKK/rp26 se comporta, mayoritariamente, como un monómero en el que existe un puente disulfuro entre dos de las tres cisteínas de la molécula. Para determinar la posición de la cisteína libre, se procedió a marcarla con ^{14}C -iodoacetamida. Una vez marcada, la preparación se dializó y la proteína se redujo con DTT y se volvió a alquilar, pero esta vez con iodoacetamida sin marcar. La proteína entonces se digiere con tripsina y los péptidos resultantes de la digestión se separaron mediante cromatografía líquida de alta

presión (HPLC). El perfil de HPLC de los péptidos trípticos se recoge en la Figura 17. En él aparecen tres picos mayoritarios, señalados con una flecha, que tienen una radiactividad específica similar. Estos tres picos se analizaron y se comprobó que correspondían a los péptidos donde se encuentran los residuos de cisteína. Por lo tanto, ya que las tres cisteínas se marcan prácticamente en la misma proporción, no parece que haya ningún puente disulfuro estable formado entre dos de los residuos de cisteína, ya que de lo contrario se habría obtenido un único pico mayoritario marcado, que correspondería a la cisteína libre, que debería haber sido la Cys48. Estos datos podrían sugerir que las tres cisteínas se encuentran inicialmente en forma libre en la estructura plegada, y que, durante el proceso de purificación, se produce la oxidación de las tres Cys, formandose más de un puente disulfuro, implicando por igual a las tres cisteínas.

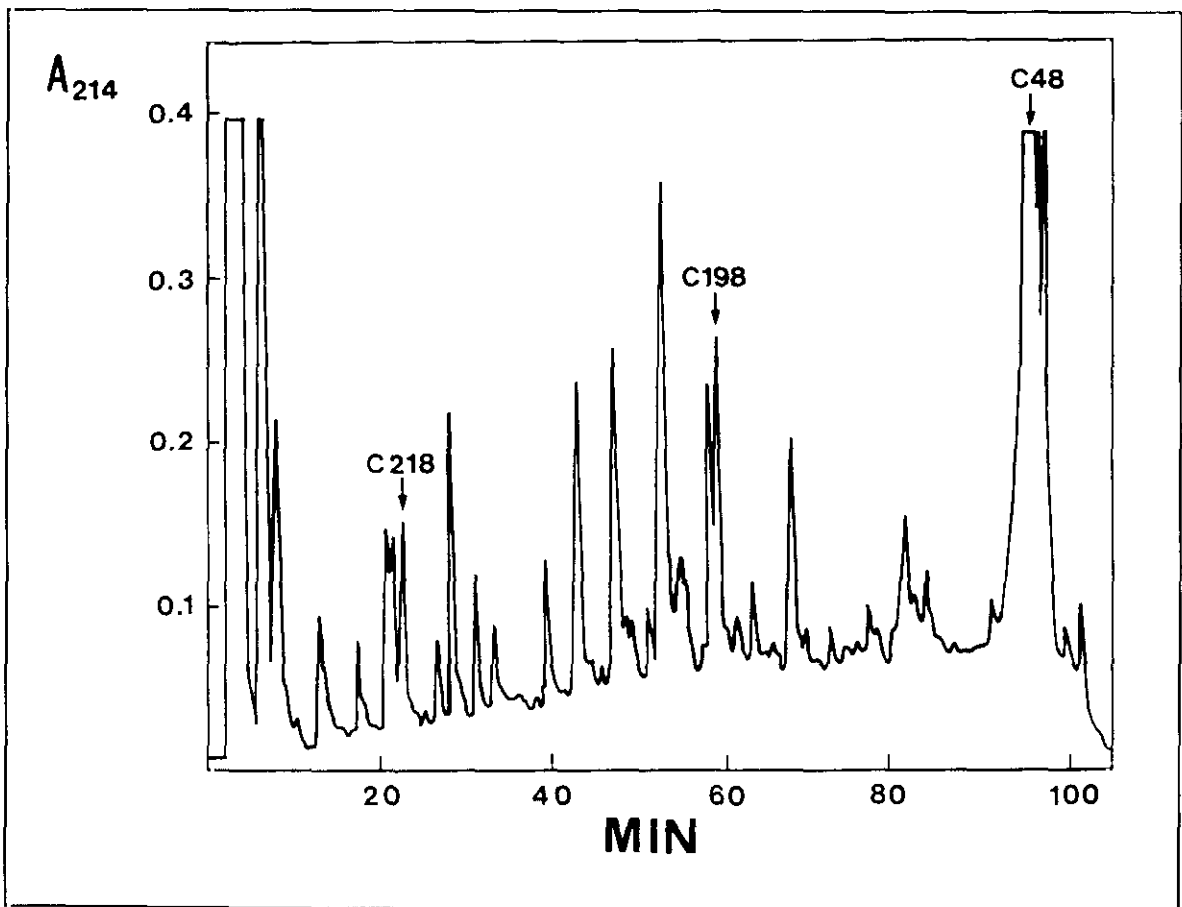


Figura 17. Perfil de elución de HPLC de los péptidos resultantes de la digestión de EIAV-rp26 marcada con $[1-^{14}\text{C}]$ -iodoacetamida con tripsina. Las fracciones radiactivas se hidrolizaron con HCl 6 N. La composición de los péptidos señalados como C48, C198 y C218, determinada mediante análisis de aminoácidos, coincide con la deducida de la secuencia de aminoácidos de los péptidos que contienen cisteína. Los péptidos que contienen residuos de cisteína.

En este mismo sentido apuntan los resultados que se obtienen cuando se utiliza la proteína EIAV-rp26 purificada a partir del vector pUC18N/EIAVp26. En este caso, el número de grupos tiólicos libres varió, para las distintas preparaciones, entre 2 y 2.6, con un valor promedio de 2.2. También en este caso se observa mediante PAGE-SDS en ausencia de agente reductor la existencia de un 5-10% de forma dimérica. Estos datos indican, efectivamente, que no hay un puente disulfuro formado entre dos de las tres cisteínas. Sin embargo, el hecho de que en ninguna preparación se observen 3 grupos SH libres, indica que también en este caso existe una cierta proporción de moléculas en las que sí se forma el puente disulfuro. Si se considera que en estas preparaciones hay un 5-10% de dímeros y que éstos tienen un solo puente disulfuro intercatenario, la preparación con 2.2 SH libres estaría formada por, aproximadamente, un 55-58% de proteína reducida (con 3 SH libres) y un 35-37% de forma monomérica con un puente disulfuro; si la forma dimérica tuviese todos los SH oxidados, en la preparación con 2.2 SH libres la forma monomérica reducida debería dar cuenta de un 60-61% del total. De cualquier manera, estos datos apuntarían hacia una gran proximidad de los residuos de cisteína en la estructura tridimensional.

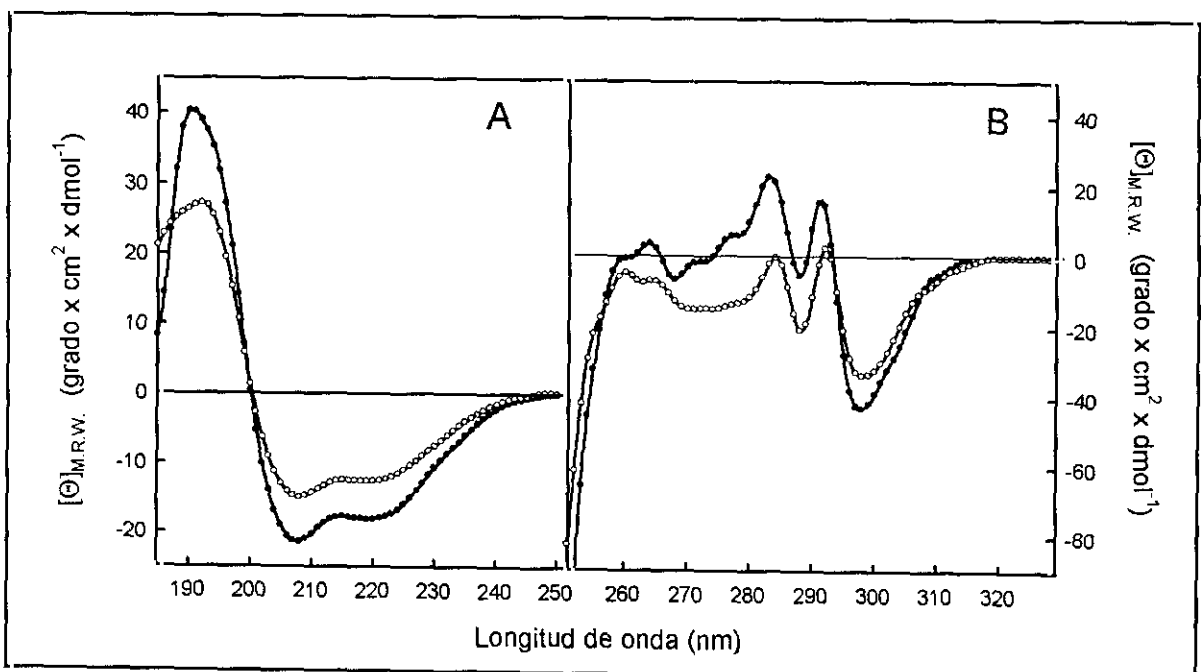


Figura 18. Espectros de CD en el UV lejano (A) y próximo (B) de las proteínas pUC/rp26 (●) y pKK/rp26 (○). La concentración de proteína utilizada fue de 0.1-0.2 mg/ml para los espectros en el UV lejano y 1 mg/ml para los espectros en el UV próximo.

Como indican los espectros de CD en el UV próximo y lejano (Fig. 18, A y B) el diferente contenido en grupos SH libres se traduce en un cambio tanto a nivel de estructura secundaria como tridimensional. Aunque en los dos casos la forma del espectro en el UV lejano es la misma, con dos mínimos a 208 y 220 nm, hay un cambio en la magnitud del espectro. Así, a 208 nm la elipticidad de la forma con 1.1 grupos SH libres es de -14940 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$, mientras que la de la forma con 2.2 SH libres es -21400 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. El ajuste del espectro de pKK/rp26 mediante el método CCA proporciona la siguiente estructura secundaria: 40% de α -hélice, 26% de lámina β , 12% de giro β y 22% de estructura no ordenada. Comparando con la estructura de pUC/rp26 se observa una disminución de la proporción de hélice α (del 50 al 40%) y un aumento considerable de la lámina β (de 1 a 26%). El entorno de los residuos aromáticos varía como consecuencia de la formación del puente disulfuro. Este cambio afecta fundamentalmente a las bandas dicroicas localizadas entre 270 y 290 nm.

De la comparación de los espectros de emisión de fluorescencia, tanto excitando a 275 nm como a 295 nm, de ambas proteínas no se deduce ningún cambio sustancial en la polaridad de los microentornos de los fluoróforos de EIAV-rp26. Sin embargo, sí se observan diferencias entre ambas proteínas cuando se estudia la desactivación (quenching) de fluorescencia por yoduro potásico.

La utilización de la técnica de desactivación de fluorescencia por agentes solubles, como es el yoduro potásico, proporciona información acerca del diferente grado de exposición de los distintos fluoróforos de la proteína. Como se ha comentado anteriormente, la proteína EIAV-rp26 posee cuatro residuos de tirosina y tres de triptófano, aunque a la vista de sus espectros de fluorescencia, la emisión se debe principalmente a los residuos de triptófano. Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia que se han utilizado en estos estudios se han obtenido con una longitud de onda de excitación de 295 nm, a la que sólo se excitan los residuos de Trp. Por tanto, estos estudios de desactivación por IK darán información acerca de la exposición de los Trp de EIAV-rp26. El IK ejerce su acción a través de un mecanismo fundamentalmente colisional, por lo que la eficacia para desactivar la fluorescencia de los triptófanos de EIAV-rp26 dependerá de si es capaz o no de interaccionar con ellos y, probablemente, del diferente grado de exposición en la molécula (Lehrer, 1971; Eftink y Ghiron, 1976). Según esto, un cambio en las características del apagamiento reflejará una variación en la accesibilidad al agente de apagamiento, y, por tanto, un cambio conformacional.

El yoduro potásico, al ser un compuesto iónico, cargado y fuertemente hidratado, únicamente va a actuar sobre los fluoróforos que estén en la superficie de

la proteína o cerca de ella (Lehrer, 1971). La representación de Stern-Volmer para la desactivación con yoduro de la proteína EIAV-rp26 nativa no es una línea recta, sino que a partir de 0.3 M presenta una curvatura hacia el eje de abscisas en el intervalo de concentraciones empleadas (datos no mostrados), lo que indica que:

a) a una concentración de 0.3 M de yoduro potásico la proteína no está desnaturalizada, ya que en ese caso se debería observar una curvatura hacia arriba (Eftink y Ghiron, 1976).

b) hay dos poblaciones de triptófanos, accesibles y no accesibles al agente de apagamiento. Es más, la población de fluoróforos accesibles al yoduro es homogénea, ya que cuando los datos obtenidos se representan siguiendo la ecuación de Stern-Volmer modificada se obtiene una línea recta (Fig. 19) (Lehrer, 1971).

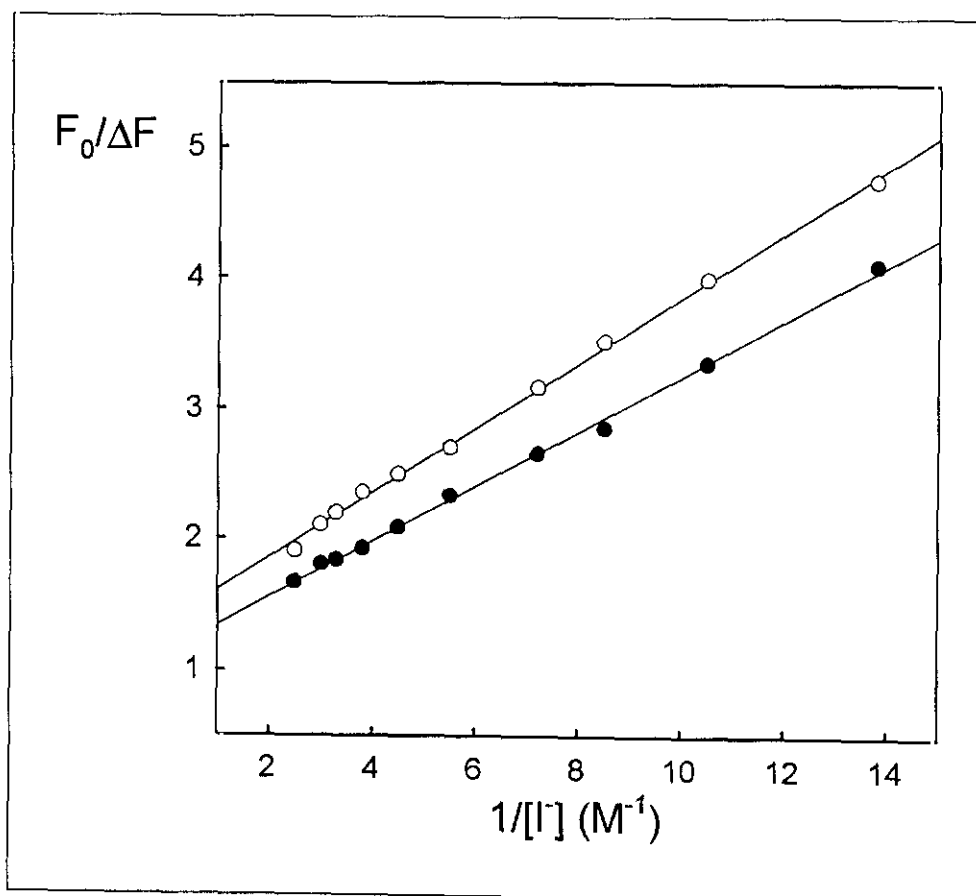


Figura 19. Representación de Stern-Volmer modificada para la desactivación por yoduro potásico de las proteínas pUC/rp26 (●), pKK/rp26 (○). A partir de los espectros de emisión de fluorescencia para una excitación de 295 nm de pUC/rp26, pKK/rp26 se obtienen los valores de intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión. El valor de F_0 se determina con una muestra control a la que se añade NaCl, según se describe en *Métodos Experimentales*.

En la Figura 19 se recoge la representación de Stern-Volmer modificada para la desactivación por yoduro potásico de las proteínas pUC/rp26 y pKK/rp26. A partir de esta representación se calcula la fracción de residuos accesibles al agente desactivador así como la constante de desactivación. Esta constante permite calcular la facilidad para producir la desactivación de la fluorescencia, ya que el inverso de su valor representa la concentración de agente de desactivación necesaria para reducir un 50% la intensidad de fluorescencia. Así, cuanto menor sea el valor de K más difícil será desactivar la fluorescencia y, por tanto, más internos deberán encontrarse los fluoróforos de la proteína. Estos valores aparecen en la Tabla VI.

	f_a	K (M^{-1})
pUC/rp26	0.73 ± 0.03	5.5 ± 1.0
pKK/rp26	0.88 ± 0.05	5.4 ± 0.9

Tabla VI. Parámetros de fluorescencia para la desactivación por yoduro potásico de pUC/rp26 y pKK/rp26. f_a , fracción de fluoróforos accesibles al agente de apagamiento; K, constante de apagamiento obtenida a partir de la ecuación de Stern-Volmer modificada.

En la proteína pUC/rp26 el 73% de los triptófanos son accesibles al IK, estando el resto en el interior de la estructura tridimensional. Cuando se forma el puente disulfuro en pKK/rp26 se produce un cambio conformacional que hace que aumente significativamente el número de Trp accesibles al yoduro. El valor de la constante no varía prácticamente de una proteína a otra. Además, este valor de $5.5 M^{-1}$ nos indica que los Trp accesibles no están en la superficie, ya que el valor de la constante de apagamiento de N-acetil-triptofanamida es de $17.5 M^{-1}$ (Eftink y Ghiron, 1976).

Otro de los parámetros estructurales empleados para comparar ambas proteínas es la temperatura de desnaturalización térmica, determinada a partir de la variación de la elipticidad a 208 nm con la temperatura (Fig. 20). Estas curvas de desnaturalización térmica se han medido siguiendo la variación continua de Θ_{208} al aumentar la temperatura a una velocidad de $30 \text{ }^\circ\text{C/hora}$. Como se puede observar, la proteína pKK/rp26, y a pesar de poseer una estructura más abierta en términos de la fracción de residuos accesibles al IK, posee una temperatura de desnaturalización térmica ligeramente mayor que la de la proteína pUC/rp26 ($55 \text{ }^\circ\text{C}$ y $53.8 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente). Teniendo en cuenta que el cambio conformacional inducido por la formación del puente disulfuro provoca un aumento en el porcentaje de lámina β , podría ser ésta la responsable de la ligera mayor estabilización de la estructura tridimensional.

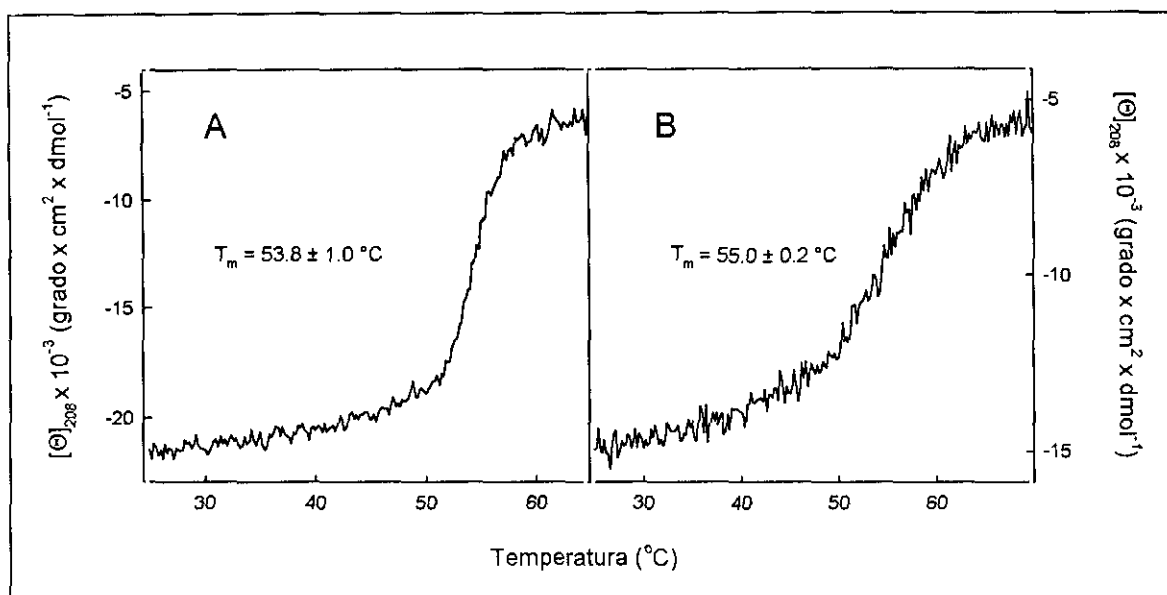


Figura 20. Curvas de desnaturalización térmica de las proteínas pUC/rp26 (A) y pKK/rp26 (B). La elipticidad a 208 nm se midió de forma continua y se la temperatura se incrementó a una velocidad de 30 °C/hora. La concentración de la proteína empleada estuvo entre 0.1-0.2 mg/ml y en todos los casos se empleó un tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.0. En cada caso se indica el valor de la T_m y la desviación estándar correspondiente.

REDUCCIÓN Y CARBOXIAMOMETILACIÓN DE EIAV-rp26

Con el objeto de determinar las características estructurales que tiene la proteína cuando los tres residuos de cisteína son incapaces de formar puentes disulfuros tanto intra- como intercatenarios, se modificaron los grupos SH con iodoacetamida después de que la proteína se hubiese reducido con DTT. El análisis de aminoácidos de la proteína reducida y carboxiamidometilada pone de manifiesto que las tres cisteínas se encuentran modificadas, pues se obtienen tres residuos de carboximetilcisteínas por molécula de proteína. Aunque los resultados que se presentan a continuación son los obtenidos con pUC/rp26, con la proteína pKK/rp26 se obtuvieron resultados similares.

El espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de la proteína reducida y carboxiamidometilada (rp26 CAM) se representa en la Figura 21, comparado con el de la proteína pUC/rp26. Tanto la forma del espectro como el valor de la elipticidad a 208 nm son prácticamente idénticos (-20250 para rp26 CAM frente a los -21400

de la proteína nativa), por lo que parece que la modificación de los grupos SH de la proteína no supone prácticamente alteración de la estructura secundaria. Sin embargo, los valores de la temperatura de transición térmica sí que son diferentes, ya que para la proteína nativa se obtiene un valor de 53.8 °C mientras que para la proteína reducida y carboxiamidometilada la temperatura de transición es de 48.3 °C (Fig. 22). Además, el proceso de desnaturalización térmica en el caso de la proteína rp26 CAM es menos cooperativo que el de la proteína nativa. La introducción del grupo carboxiamidometilo, voluminoso, hace que sea más fácil desnaturalizar térmicamente la proteína, a pesar de que la modificación química no altera prácticamente la estructura global.

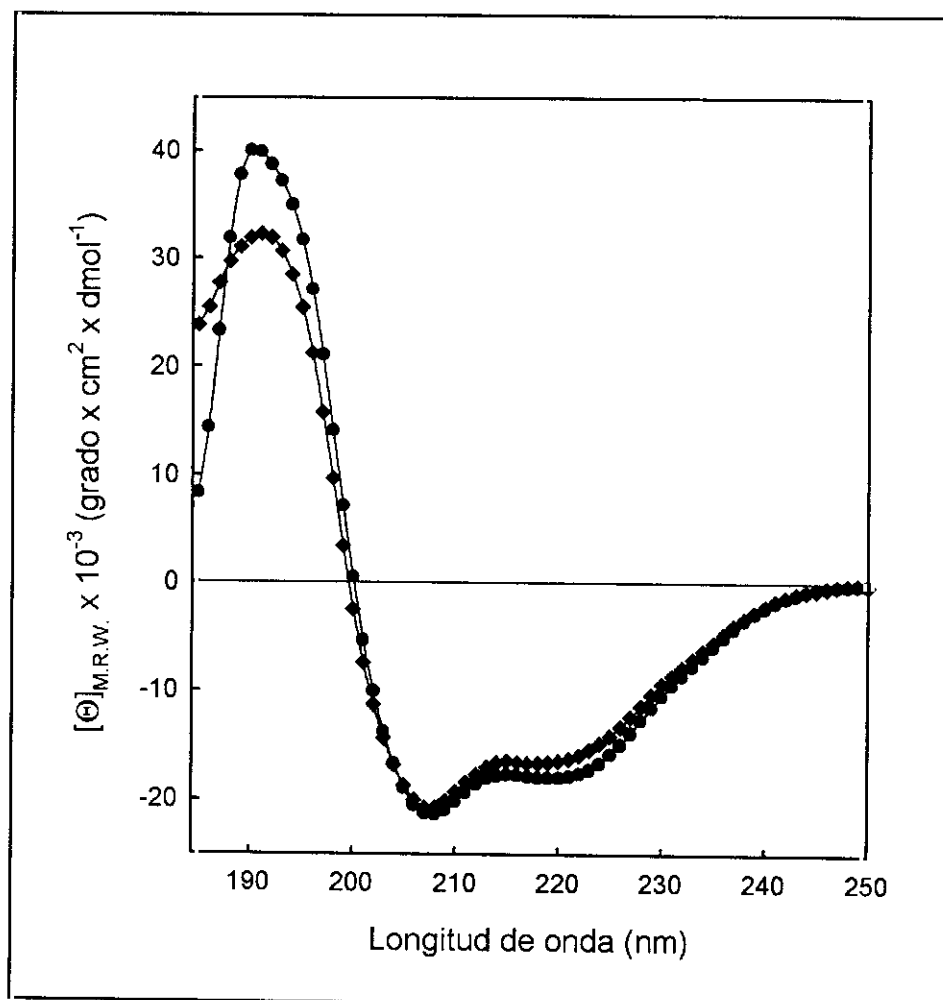


Figura 21. Espectros de dicroísmo de las proteínas pUC/rp26 (●) y rp26 CAM (◆). La concentración de proteína empleada estuvo entre 0.1-0.2 mg/ml.

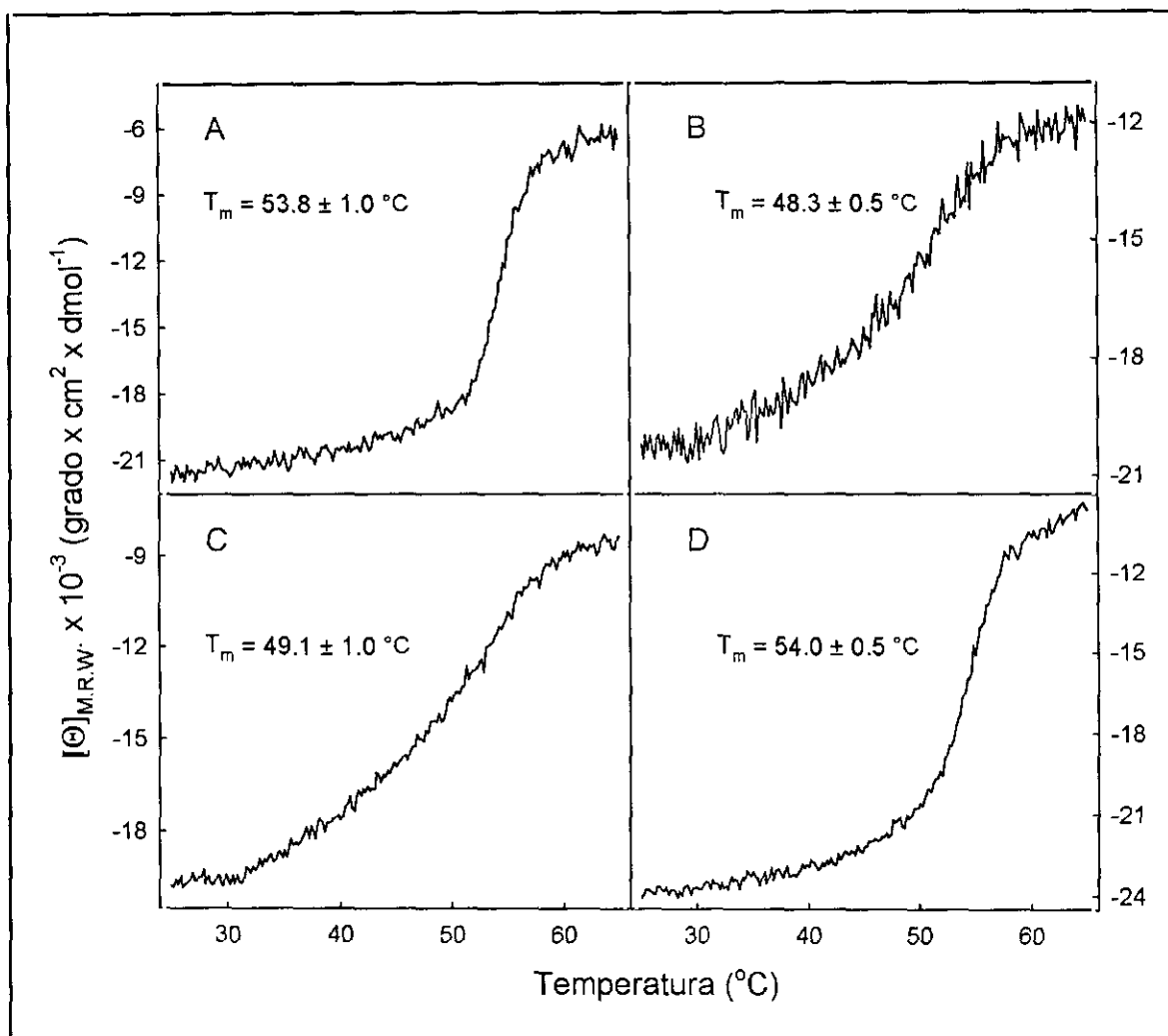


Figura 22. Curvas de desnaturalización térmica de las proteínas pUC/rp26 (A), rp26 CAM (B), rp26 OXD (C) y rp26 RED (D). En todos los casos la proteína utilizada fue pUC/rp26. La elipticidad a 208 nm se midió de forma continua y se la temperatura se incrementó a una velocidad de 30 °C/hora. La concentración de la proteína empleada estuvo entre 0.1-0.2 mg/ml y en todos los casos se empleó un tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.0. En cada caso se indica el valor de la T_m y la desviación estándar correspondiente.

En la Figura 23 se encuentran representados los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas nativa y carboxiamidometilada excitando a 275 y 295 nm. Como se observa, el máximo de emisión (324 nm) a las dos longitudes de onda de excitación no varía como consecuencia de la alquilación. En la proteína rp26 CAM hay una pequeña disminución de la intensidad de fluorescencia, que podría ser indicativo de una diferente estructuración tridimensional y, por tanto, de una mayor exposición al disolvente de los residuos de Trp que implicaría una mayor desactivación de la fluorescencia de estos residuos en rp26 CAM. Sin embargo, los espectros no experimentan ningún desplazamiento en el máximo de emisión. En el

caso de que los residuos de triptófano estuviesen más expuestos habría un desplazamiento del máximo hacia mayores longitudes de onda. Por tanto, esta diferencia de intensidad de fluorescencia podría ser debida a una diferencia en el valor de la concentración de la proteína. En relación a la contribución de los residuos de tirosina, ésta es muy pequeña en ambos casos, siendo ligeramente en el caso de la proteína rp26 CAM.

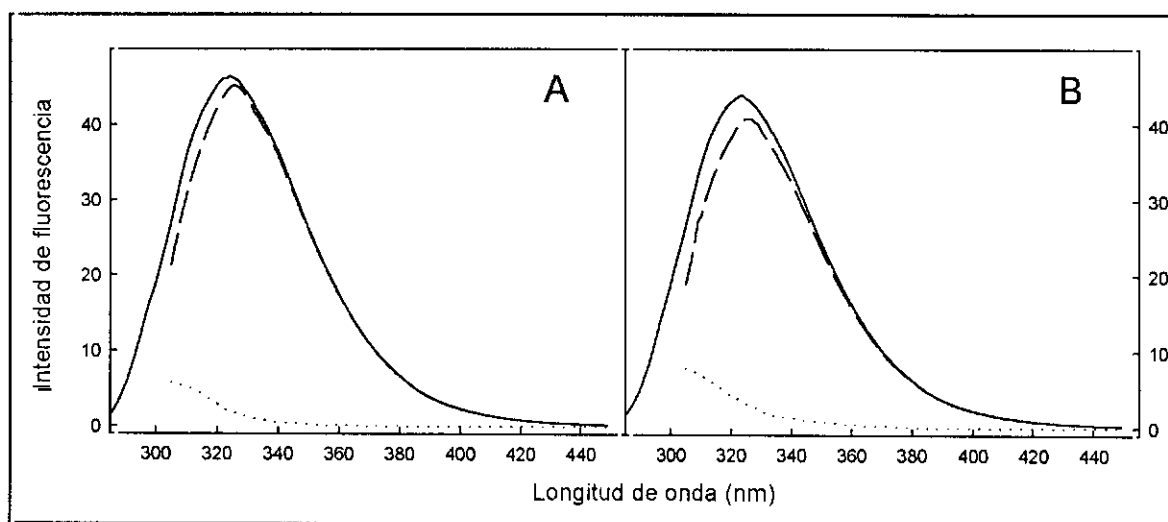


Figura 23. Espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas pUC/rp26 (A) y rp26 CAM (B). Espectro de emisión obtenidos con una longitud de excitación de 275 (—) y 295 nm (- - -); contribución de los residuos de tirosina al espectro de emisión (· · ·). Los espectros de emisión excitando a 295 nm están normalizados. La concentración de proteína utilizada fue de 40-60 $\mu\text{g/ml}$.

El efecto de la reducción y alquilación de los grupos SH se ha medido determinando la desactivación de fluorescencia por IK. En este caso la población de Trp accesibles al yoduro también es homogénea, como lo indica el hecho de que la representación de Stern-Volmer modificada es una línea recta (Fig. 24). A partir de esta representación se calcula la fracción de residuos accesibles al agente de apagamiento, f_a , y la constante de apagamiento, K , valores que se recogen en la Tabla VII. El valor de f_a sólo es ligeramente mayor que el que se obtiene para la proteína pUC/rp26. Sin embargo, es menor que el que se obtiene en el caso de pKK/rp26. Como se ha indicado anteriormente los resultados obtenidos al reducir y carboxiamidometilar los grupos SH tanto en pUC/rp26 como de pKK/rp26 son muy similares. Por tanto, al romper el puente disulfuro presente en pKK/rp26 se obtiene una estructura en la que los triptófanos poseen un grado de exposición semejante al que poseen en la proteína pUC/rp26. En lo que a la constante de desactivación respecta no se observa variación alguna como consecuencia de la modificación química.

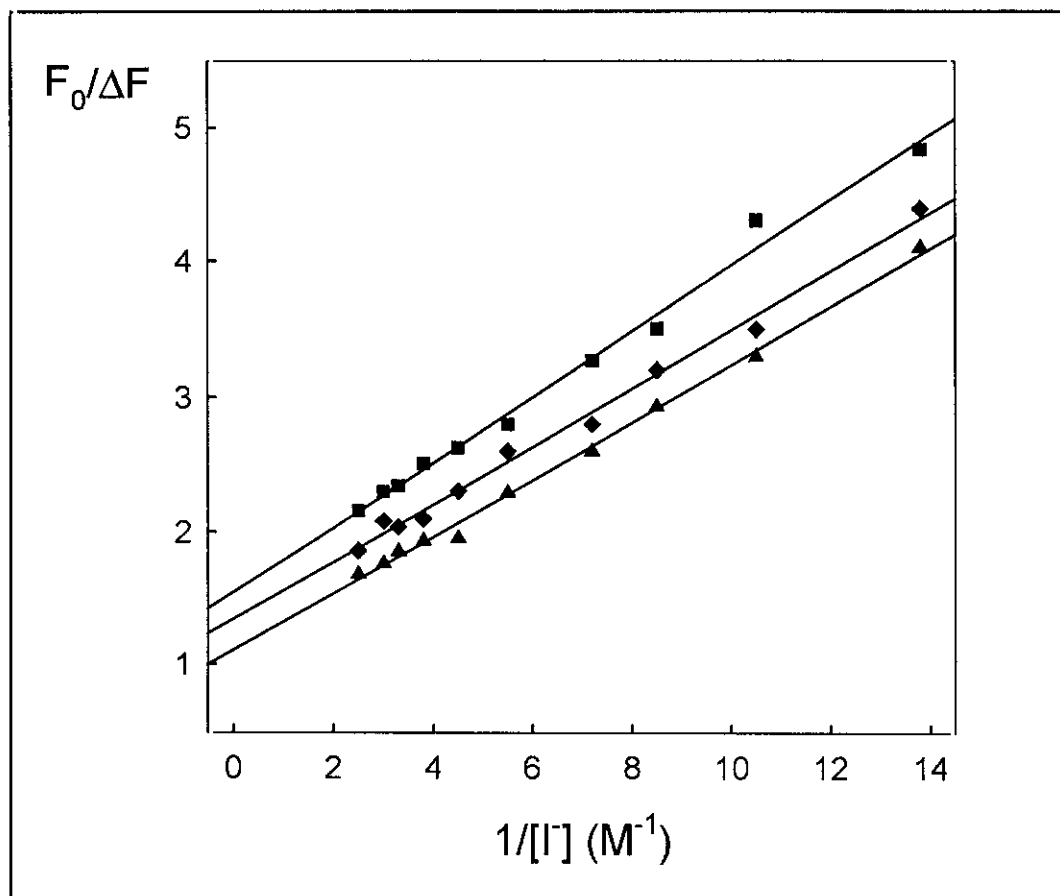


Figura 24. Representación de Stern-Volmer modificada para la desactivación por yoduro potásico de las proteínas rp26 CAM (◆), rp26 OXD (▲) y rp26 RED (■). A partir de los espectros de emisión de fluorescencia para una excitación de 295 nm de rp26 CAM, rp26 OXD y rp26 RED se obtienen los valores de intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión. El valor de F_0 se determina con una muestra control a la que se añade NaCl, según se describe en *Métodos Experimentales*.

PROTEÍNA	f_s	K (M^{-1})
rp26 CAM	0.77 ± 0.11	5.8 ± 1.5
rp26 RED	0.64 ± 0.10	6.6 ± 1.0
rp26 OXD	0.89 ± 0.11	5.3 ± 1.7

Tabla VII. Parámetros de fluorescencia para la desactivación por yoduro potásico para las proteínas rp26 CAM, rp26 RED y rp26 OXD. f_s , fracción de residuos fluoróforos accesibles al agente de apagamiento; K, constante de apagamiento obtenida a partir de la ecuación de Stern-Volmer modificada.

REDUCCIÓN Y OXIDACIÓN DE EIAV-rp26

A la vista de los resultados obtenidos con las proteínas pUC/rp26 y pKK/rp26 y con la proteína rp26 CAM, parece claro que el estado en el que se encuentren los grupos SH en la molécula de proteína tiene mucha importancia en la estructura que adopte EIAV-rp26. Por ello se procedió a estudiar la estructura cuando estos grupos sulfhidrilo se encuentran en diferente estado de oxidación. Para ello, la proteína pUC/rp26 nativa se redujo con DTT y se oxidó con CuSO_4 , midiéndose diferentes parámetros estructurales de la proteína reducida (rp26 RED) y oxidada (rp26 OXD). Los datos que se presentan para rp26 RED son los obtenidos tanto con pUC/rp26 como con pKK/rp26. Sin embargo, los de rp26 OXD son sólo los que se obtienen con pUC/rp26 puesto que en pKK/rp26 ya se encuentran parcialmente oxidados los grupos sulfhidrilos.

La proteína reducida debería tener unas características semejantes, en cuanto a su estructura, a las de la proteína pUC/rp26 puesto que esta proteína se encuentra con parte de sus tres grupos tiólicos libres sin formar ningún puente disulfuro (2.0-2.6 SH libres/molécula de proteína). Cuando la proteína se reduce con DTT y se mide su espectro de CD en el UV lejano en ausencia de agente reductor se obtienen los resultados que aparecen en la Figura 25. El exceso de DTT de la disolución se eliminó pasando la muestra a través de una columna PD-10 e inmediatamente se midió su espectro de dicroísmo, para evitar que la proteína se oxidara por la acción del oxígeno atmosférico. El valor de elipticidad a 208 nm disminuye significativamente respecto del de la proteína original (-21440 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ para la proteína sin reducir y -23970 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ para la proteína reducida). Mayor es la diferencia cuando se compara el espectro de CD de la proteína reducida con el de pKK/rp26 (Fig. 18). El valor de Θ_{208} para esta proteína es de -14940 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$, por lo que la reducción del puente disulfuro supone una disminución muy considerable, 1.6 veces, del valor de elipticidad. El espectro de la proteína oxidada con CuSO_4 es similar en forma al obtenido para la proteína sin reducir aunque la elipticidad a 208 nm es algo más baja, -19730 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. Para estas muestras se determinó el número de SH libres mediante reacción con DTNB, obteniéndose 2.7 grupos SH/molécula para la proteína reducida en ausencia de DTT y 0.8 para la proteína oxidada. Incluso después de reducir con DTT no llegan a observarse los tres grupos SH. Teniendo en cuenta que en preparaciones reducidas no se observan dímeros, el 85% de las moléculas deben tener todas las cisteínas reducidas y el 15% restante debe tener un puente disulfuro intramolecular. El CuSO_4 actúa favoreciendo la oxidación de los grupos SH libres de una proteína mediante la formación de puentes disulfuros tanto intramoleculares como intermoleculares, éstos últimos originarían la

aparición de dímeros. Por ello, es importante determinar el tipo de interacciones que se han producido por la oxidación de EIAV-rp26. Para ello, la proteína oxidada se sometió a un análisis por PAGE-SDS en condiciones no reductoras, densitometrando el gel teñido. Se observa que hay un aumento en la proporción de dímeros al tratar la proteína con CuSO_4 , (20-30% de dímeros frente a 5-10% en la proteína sin reducir), aunque el monómero sigue siendo la forma mayoritaria en la proteína oxidada. Como el número de grupos tiólicos libres de la proteína oxidada es de 0.8 y el 70% de la proteína es monomérica, con un grupo SH libre y un puente disulfuro intramolecular, los dímeros que se observan en la proteína oxidada con CuSO_4 deben tener prácticamente todas las cisteínas oxidadas, a diferencia de los dímeros que se observan en el resto de preparaciones en los que podría ocurrir que sólo una cisteína de cada molécula implicada en el dímero se encontrase oxidada.

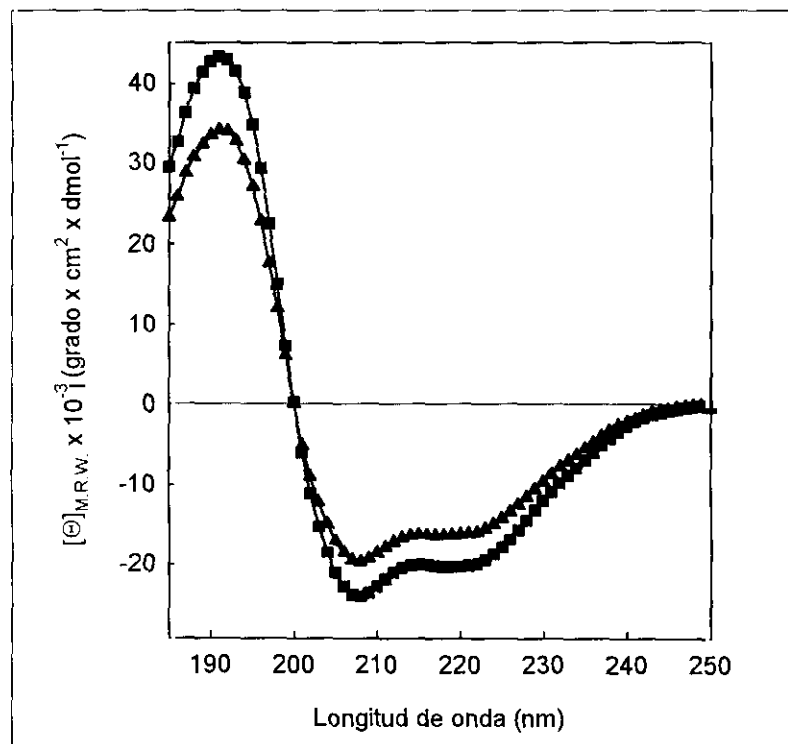


Figura 25. Espectros de dicroísmo circular de las proteínas rp26 RED (■) y rp26 OXD (▲). La concentración de proteína empleada estuvo entre 0.1-0.2 mg/ml.

A la vista de estos resultados parece claro que existe una relación entre el número de grupos SH libres y el espectro de CD. A partir del espectro de la muestra reducida, con 2.7 SH libres, y de la composición de formas reducida y oxidada que posee esta muestra, si suponemos que la forma monomérica oxidada coincide con pKK/rp26, se podría determinar el espectro teórico de la muestra

totalmente reducida. Así, la elipticidad a 208 nm para esta forma reducida con 3 grupos SH libres sería -25560 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. Considerando ésta y la forma pKK/rp26 como estructuras extremas se podría determinar la elipticidad de cualquier forma intermedia. Por ejemplo, la proteína pUC/rp26, que posee 2.2 SH/molécula, con los porcentajes de formas monomérica oxidada y reducida y formas dimericas señaladas anteriormente, 35-37%, 55-58% y 5-10% respectivamente, tendría un valor de Θ_{208} de -21600 a -21800 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$, valor próximo al experimental que es de -21440 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. Teniendo en cuenta los resultados de los ajustes de los espectros por el método CCA, el cambio conformacional inducido por la formación del puente disulfuro en la proteína en su forma monomérica puede llevar consigo un aumento en la proporción de lámina β . En este sentido apunta la existencia de un punto isodicroico a 200 nm que se observa en la Figura 25. El espectro de rp26 OXD debería ser similar en magnitud al de pKK/rp26 puesto que tienen un contenido similar en grupos SH. La diferencia entre ambas formas radica en la diferente proporción de dímeros, 30% en rp26 OXD, y pudiera ser ésta la responsable de la diferencia observada en los espectros de CD.

Los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína reducida y oxidada (datos no mostrados), excitando a 275 nm, no presentan ninguna variación ni en la longitud de onda del máximo de emisión, ni en el valor de la intensidad en el máximo. Éste sigue centrado a 324 nm. Sin embargo, sí se observan diferencia cuando se llevan a cabo estudios de desactivación de fluorescencia por yoduro potásico. Las representaciones de la ecuación de Stern-Volmer modificada para estas proteínas aparecen en la Figura 24. A partir de estas rectas se calculan la fracción de residuos accesible al agente de desactivación y la constante de desactivación, que se recogen en la Tabla VII. Se observa que la reducción de la proteína EIAY-rp26 supone una disminución en el valor de f_a . Como consecuencia de la reducción parte de los residuos de Trp pasan a ocupar una localización más interna, menos accesibles al agente de desactivación. Sin embargo, al oxidar la proteína parte de los residuos que antes no eran accesibles pasan a serlo. El valor de f_a de la proteína oxidada, 0.89, coincide con el de pKK/rp26, 0.88, que posee un valor similar de grupos SH libres. El valor de la constante de desactivación no varía prácticamente como consecuencia de la oxidación o la reducción. Si estos resultados los relacionamos con el número de grupos sulfhidrilo libres en la proteína, podemos observar que al aumentar el número de grupos SH libres se produce una disminución en la fracción de residuos accesibles al yoduro, pues se pasa de 0.64 para la proteína rp26 RED (2.7 SH libres) a 0.73 para pUC/rp26 (con 2.2 SH libres) y a 0.89 para rp26 OXD (0.8 SH libres). Esto supondría una mayor

estructuración de la proteína como consecuencia del aumento de grupos tiólicos libres en la proteína. De nuevo se comprueba que el estado de oxidación en el que se encuentran los residuos de cisteína en la proteína es importante en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína.

Por último, se han utilizado las curvas de desnaturalización térmica de las proteínas reducida y oxidada, obtenidas midiendo la elipticidad a 208 nm de forma continua al aumentar la temperatura, para determinar el efecto del estado de oxidación de los grupos SH en la estabilidad térmica de la estructura tridimensional (Figura 22). El proceso de desnaturalización térmica es cooperativo, aunque para la proteína rp26 OXD esta cooperatividad es menor. Los valores de la temperatura de transición térmica varían según sea el estado de oxidación de los grupos tiólicos de la proteína. Como puede observarse la proteína reducida tiene una T_m (54 ± 0.5 °C) muy similar a la de la proteína sin reducir (53.8 ± 1.0 °C). Sin embargo, la oxidación de la proteína produce una disminución en la temperatura de transición que pasa a ser de 49.1 ± 1.0 . Es decir, la proteína se vuelve menos estable térmicamente como consecuencia de la formación tanto de formas dimericas como de un puente disulfuro intramolecular. La T_m de la proteína oxidada (49.1 ± 1.0 °C) es muy parecida a la de la proteína reducida y carboxiamidometilada (48.3 ± 0.5 °C), pero diferente a la de pKK/rp26 (55 ± 0.2 °C), a pesar de tener un contenido de grupos SH libres similar. Esta diferente facilidad para desnaturalizar las proteínas pKK/rp26 y rp26 OXD será el reflejo de la diferente estructura tridimensional que indican sus espectros de dicroísmo circular.

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA MUTANTE rp26-C48S

Empleando las mismas técnicas que las utilizadas para clonar EIAV-rp26, se ha clonado el gen que codifica la proteína p26, cambiando el residuo de cisteína de la posición 48 por un residuo de serina, en el vector de expresión pUC18N. A esta proteína mutada la denominaremos rp26-C48S. El residuo cambiado corresponde a la cisteína que no se conserva en el resto de las proteínas lentivirales, esto es, aquella que se ha descrito que no forma un puente disulfuro intracatenario. Con el cambio de cisteína por serina se pretende influir lo menos posible en el entorno tridimensional de la proteína. El residuo elegido posee propiedades semejantes a la cisteína, pero sin la característica de poder formar puentes disulfuros. La expresión en *E. coli* y la purificación de la proteína se ha llevado a cabo empleando los protocolos utilizados para la proteína salvaje.

La mutación introducida se comprueba mediante secuenciación automática del DNA que codifica rp26-C48S. Además, por análisis de aminoácidos de la proteína reducida y carboxiamidometilada se comprueba que hay un aumento del número de residuos de serina en una unidad y una disminución en el número de carboximetilcisteínas. Mediante PAGE-SDS se comprueba que el grado de pureza de esta proteína es superior al 95%.

La reacción de la proteína rp26-C48S con DTNB indica que hay 1.6 grupos tiólicos libres. Si, como se ha descrito para otras proteínas de las cápsidas lentivirales, las dos cisteínas que se conservan en la secuencia de la proteína se encontrasen formando un puente disulfuro, el número de grupos SH libres de la proteína mutante sería cero. Sin embargo, el resultado obtenido indica que el 80% de las moléculas poseen los dos residuos de cisteína libres, sin formar ningún puente disulfuro. Además el análisis de la proteína por PAGE-SDS en condiciones no reductoras indica que el 20% restante de moléculas poseen un puente disulfuro intracatenario puesto que no se observa la aparición de formas diméricas. Esta proteína mutante sería, por tanto, similar a la pUC/rp26 en cuanto que las dos poseen la mayor parte de sus cisteínas en forma libre.

Puede ocurrir que la mutación introducida en EIAV-rp26 origine un cambio sustancial en la estructura tridimensional de la proteína, de manera que las dos cisteínas queden tan lejos en el espacio que no puedan interactuar entre sí y no se forme el puente disulfuro. Para comprobar este aspecto, se han determinado distintos parámetros estructurales de la proteína mutante y compararla con la proteína original.

El espectro de CD de la proteína mutante en el UV lejano se recoge en la Figura 26. Como puede observarse, la proteína rp26-C48S sigue presentando un espectro con dos mínimos a 208 y 220 nm y una forma idéntica a la de la proteína original. De la misma forma, ambas proteínas poseen un valor de elipticidad a 208 nm muy parecido (-21440 y -20650 grados x cm² x d mol⁻¹ para la proteína original y mutante, respectivamente). Por lo tanto, en relación a la estructura secundaria de la proteína, la mutación introducida en rp26-C48S no la afecta significativamente. El espectro de CD en el próximo indica una estructuración tridimensional muy parecida a la de la proteína pUC/rp26 (Fig. 26).

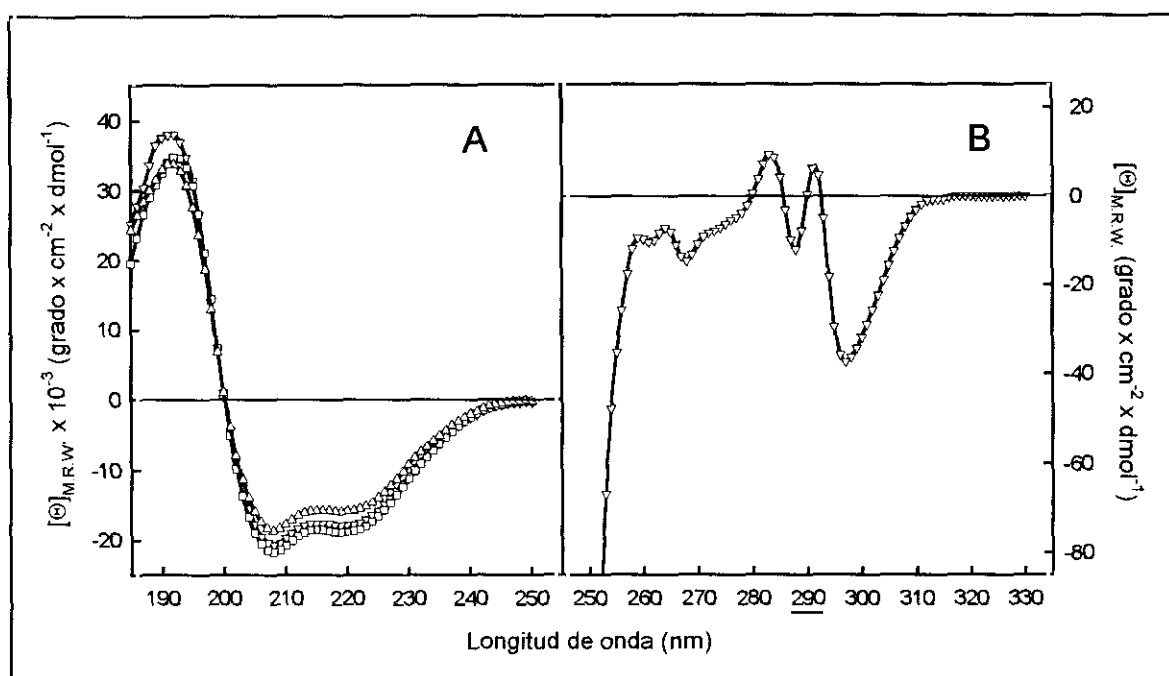


Figura 26. (A) Espectros de CD en el UV lejano de la proteína mutante rp26-C48S (∇), rp26-C48S OXD (Δ) y rp26-C48S RED (\square) y (B) en el UV próximo de la proteína rp26-C48S (B). La concentración de la proteína empleada fue de 0.1-0.2 mg/ml para el UV lejano y 1 mg/ml para el UV próximo.

En cuanto a la estabilidad térmica de la proteína, las curvas de desnaturalización indican que la temperatura de transición de la proteína mutante es ligeramente más baja que la de la proteína salvaje (53.8 °C para pUC/rp26 salvaje y 52.9 °C para rp26-C48S) (Tabla VII). Por lo tanto, el cambio de cisteína por serina afectar de manera poco significativa a la estabilidad térmica de EIAV-rp26. La variación en la T_m podría deberse a cambios en las interacciones entre residuos que se encuentran cercanos a la cisteína en la estructura tridimensional, pero no a un cambio en la estructura global. Al fin y al cabo, se cambia un residuo que posee un grupo SH por otro que tiene un grupo hidroxilo, que forma más fácilmente puentes de hidrógeno con otros grupos cercanos.

Los espectros de emisión de fluorescencia, excitando a 275 y 295 nm de la proteína mutante se representan en la Figura 27. El máximo de emisión, excitando a 275 nm, aparece a 324 nm, valor que coincide con el obtenido para la proteína EIAV-rp26 (Fig. 23). Cuando se utiliza una longitud de onda de excitación de 295 nm, el máximo aparece a 325 nm, prácticamente coincidente con el máximo del espectro

medido a 275 nm. Para la proteína mutante la contribución de los residuos de tirosina al espectro de emisión es pequeña, alrededor de un 13%, como ocurre en la proteína EIAV-rp26 (Fig. 23).

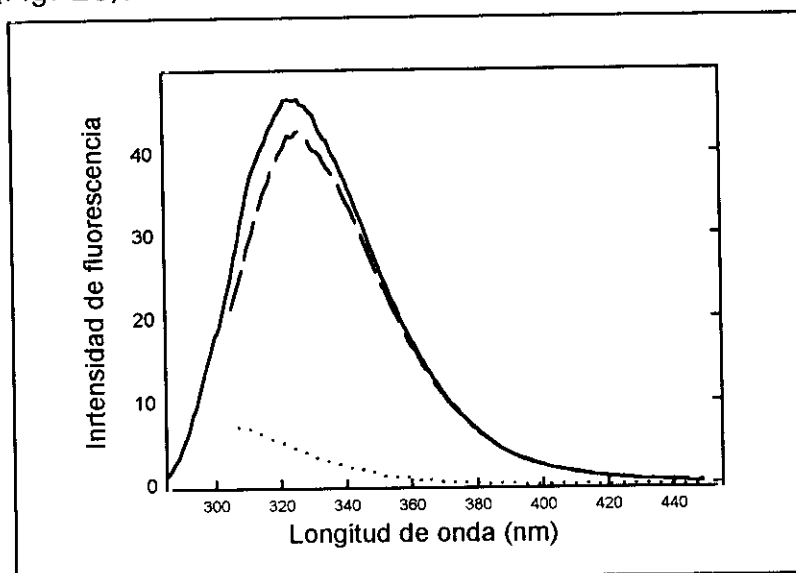


Figura 27. Espectros de emisión de fluorescencia de rp26-C48S. Espectros de emisión medidos con una longitud de onda de excitación de 275 (—) y 295 nm normalizado (- - -); contribución de los residuos de tirosina al espectro de emisión (· · · ·), determinada como la diferencia entre los dos anteriores.

Con objeto de determinar el papel que juega el estado de oxidación de los residuos de cisteína de la proteína mutante, ésta se redujo con DTT y se oxidó con CuSO_4 , estudiándose los mismos parámetros estructurales que en la proteína original.

El número de grupos sulfhidrilo libres de la proteína oxidada con sulfato de cobre valorada con DTNB, es cero. Para comprobar si el puente disulfuro se forma dentro de la cadena polipeptídica o bien entre diferentes moléculas de la proteína mutante, dicha proteína se sometió a un análisis de PAGE-SDS (datos no mostrados). No se observa la formación de dímeros, por lo que la ausencia de grupos SH libres en la proteína se debe íntegramente a la formación de un puente disulfuro intracatenario. El número de grupos SH libres aumenta ligeramente cuando la proteína se reduce con DTT, pasando de 1.6 a 1.7. Este número indica que el 85% de las moléculas están reducidas y el 15% restante poseen un puente disulfuro intramolecular puesto que no se detecta la formación de dímeros. Esta preparación de proteína mutante reducida tiene un contenido en grupos SH comparable a la proteína EIAV-rp26 reducida, en la que también el 85% de las moléculas están totalmente reducidas.

El espectro de CD en el ultravioleta lejano de la proteína rp26-C48S oxidada (Figura 26) indica un aumento en valor absoluto en la elipticidad a 208 nm cuando se compara con la proteína mutante nativa, aunque la forma del espectro sigue siendo la misma. De un valor de -20650 se pasa a -18600 grados x cm² x d mol⁻¹. Por el contrario, la reducción con DTT origina una disminución en el valor de la elipticidad a 208 nm (-21700 grados x cm² x d mol⁻¹). Por lo tanto, los resultados de dicrósmo circular de la proteína mutante son comparables a los que se obtienen con la proteína pUC/rp26. Conforme aumenta el número de grupos tiólicos libres aumenta, en valor absoluto, el valor de la elipticidad a 208 nm de la proteína, siendo máximo en el caso de la proteína reducida donde el número de grupos SH libre de la proteína es de 1.7. Los porcentajes de variación entre las diferentes formas de las dos proteínas son semejantes. Cuando se oxidan los grupos SH hay un aumento del 8-10% en el valor de Θ_{208} en las dos proteínas. Cuando se reducen hay una disminución del 12% en el valor de Θ_{208} de pUC/rp26 y del 5% en rp26-C48S, donde aumenta de 1.6 a 1.7. Para todas estas formas protéicas se midieron las curvas de desnaturalización térmica y de ellas se obtuvieron las temperaturas de transición obtenidas que aparecen en la Tabla VIII. Las diferencias entre las T_m de las diferentes formas son poco significativas. Se produce una ligerísima inestabilización de la proteína como consecuencia de su reducción, ya que la temperatura de transición es algo más baja en el caso de la proteína reducida con DTT que en el caso de la proteína nativa. Sin embargo la temperatura a la que se desnaturaliza la proteína oxidada es igual a la de la proteína nativa. En el caso de pUC/rp26 se produce una inestabilización considerable como consecuencia de la oxidación, aunque la proteína pKK/rp26 con un contenido en grupos SH libres semejante al de la proteína oxidada posee una T_m ligeramente mayor que la forma reducida.

	rp26-C48S	rp26-C48S RED	rp26-C48S OXD
T_m (°C)	52.9 ± 0.7	52.0 ± 0.2	52.8 ± 1.0

Tabla VIII. Temperaturas de desnaturalización térmica de la proteína mutante rp26-C48S y las proteínas modificadas rp26-C48S RED y rp26-C48S OXD. La elipticidad a 208 nm se midió de forma continua y se la temperatura se incrementó a una velocidad de 30 °C/hora. La concentración de la proteína empleada estuvo entre 0.1-0.2 mg/ml y en todos los casos se empleó un tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.0. En cada caso se indica el valor de la T_m y la desviación estándar correspondiente.

En la Figura 28 aparecen los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína mutante en sus formas oxidadas y reducidas. A la vista de estos espectros y comparándolos con los de la proteína mutante nativa (Fig. 27), no parece que haya ningún cambio significativo en el entorno en el que se encuentran los residuos de triptófano de la proteína mutante como consecuencia del cambio en el número de grupos SH libres; el máximo de emisión del espectro medido tanto con una longitud de onda de excitación de 275 nm como de 295 nm, coincide en todos los casos. La contribución de los cuatro residuos de tirosina al espectro de fluorescencia disminuye ligeramente como consecuencia de la reducción, que podría ser consecuencia de un mayor acercamiento entre los residuos de Tyr y Trp, que hiciese que el proceso de transferencia de energía fuese mayor. En el caso de la proteína oxidada la contribución es comparable a la que se determina en el caso de la proteína nativa.

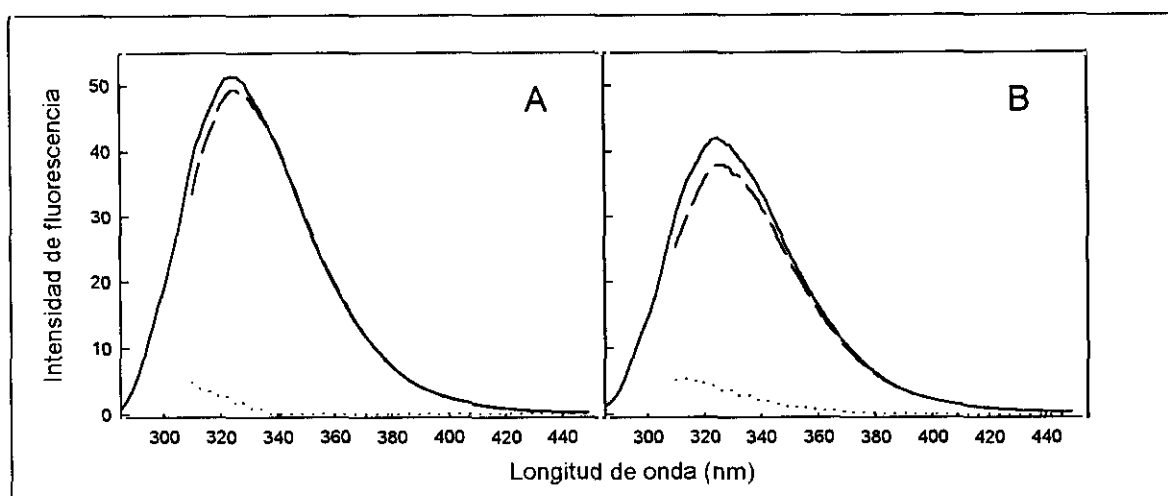


Figura 28. Espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas rp26-C48S OXD (A) y rp26-C48S RED (B). (—) Espectro de emisión obtenido con una longitud de excitación de 275 nm; (- - -) espectro de emisión normalizado obtenido con una longitud de onda de excitación de 295 nm y (· · · ·) contribución de los residuos de tirosina al espectro de emisión de rp26 calculado a partir de los dos espectros anteriores.

Los posibles cambios en la estructura tridimensional producidos como consecuencia de la mutación C48S y de la variación del estado de oxidación de las cisteínas de la proteína mutante se ha seguido también mediante estudios de desactivación de fluorescencia con yoduro potásico. En todos los casos, la representación de Stern-Volmer modificada es una línea recta, lo que indica el carácter homogéneo de la población de Trp accesibles al agente de desactivación. Los parámetros obtenidos se recogen en la Tabla IX. El valor de la fracción de Trp accesibles al IK es menor que el que se obtiene en el caso de pUC/rp26 (Tabla VI). Sin embargo, y como indican los máximos de los espectros de fluorescencia (Fig. 27), estos residuos de triptófano ocupan una localización con un grado de polaridad semejante. la diferencia entre los valores de f_a de la proteína mutante nativa y de

pUC/rp26 reducida (Tabla VII) es considerablemente menor y estas dos preparaciones poseen un contenido en grupos SH semejante (85% de forma totalmente reducida en el caso de pUC/rp26 y 80% en rp26-C48S). El aumento de 1.6 a 1.7 SH libres/molécula, consecuencia de la reducción de la forma mutante, no origina una variación en el valor de f_a . Por el contrario, la oxidación provoca que aproximadamente, el 50% de los Trp accesibles al IK en la forma nativa pasan a serlo cuando se forma el puente disulfuro intracatenario de la proteína mutante ($f_a = 0.78$). Estos Trp siguen ocupando una localización interna, el máximo de emisión está centrado a alrededor de 324 nm, y como indica el valor de la constante de desactivación, que no varía significativamente de una forma a otra, son fluoróforos difíciles de desactivar. Los resultados obtenidos con la forma mutante rp26-C48S indican que, al igual que ocurre en el caso de pUC/rp26, las otras dos cisteínas, Cys198 y Cys218, no se encuentran formando un puente disulfuro en la proteína purificada. Además, cuando se forma el puente disulfuro intracatenario mediante oxidación con CuSO_4 tiene lugar un cambio conformacional que se traduce en una modificación del espectro de CD en el UV lejano (Fig. 26), compatible, como ocurre en el caso de EI_{AV}-rp26, con una transformación de hélice α a lámina β , y en un aumento del número de residuos de triptófano accesibles a la desactivación por IK.

PROTEÍNA	f_a	K (M^{-1})
rp26-C48S	0.56 ± 0.07	5.9 ± 0.5
rp26-C48S OXD	0.78 ± 0.03	4.1 ± 1.5
rp26-C48S RED	0.53 ± 0.08	6.0 ± 1.6

Tabla IX. Parámetros de fluorescencia para la desactivación por ioduro potásico de las proteínas rp26-C48S, rp26-C48S OXD y rp26-C48S RED. f_a , fracción de residuos fluoróforos accesibles al agente de apagamiento; K, constante de apagamiento obtenida a partir de la ecuación de Stern-Volmer modificada.

Es bien conocido que el grupo tiólico de la cadena lateral de los residuos de cisteína es uno de los más reactivos de los que aparecen en las cadenas laterales de los aminoácidos naturales. Ya sea como grupo sulfhidrilo libre, ionizado como grupo tiolato u oxidado en forma de enlace disulfuro, tioéter o tioéster, los residuos de cisteína juegan un papel fundamental en las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas globulares (Doig y Williams, 1991; Creighton, 1992). Normalmente, desde un punto de vista estructural, las cisteínas forman puentes disulfuros que estabilizan la estructura terciaria de un gran número de proteínas. Debido a la inestabilidad relativa de los grupos tiólicos libres, en comparación con su forma

oxidada en presencia de oxígeno, los residuos de cisteína de las proteínas extracelulares generalmente aparecen formando puentes disulfuro, siendo ésta una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes, mientras que las proteínas intracelulares presentan normalmente grupos tiólicos libres (Fahey *et al.*, 1977). Además, es frecuente que en una proteína todos sus residuos de cisteína se encuentren en el mismo estado de oxidación, siendo raro encontrar a la vez puentes disulfuro y grupos tiólicos libres.

La formación de los puentes disulfuro requiere un entorno oxidante. En el caso de *E. coli*, sistema empleado en la expresión de las proteínas estudiadas, los puentes disulfuro se forman, generalmente, en proteínas extracitoplasmáticas, siendo más raro en proteínas citoplasmáticas (Schultz y Schirmer, 1979; Thornton, 1981). Se ha sugerido que el entorno redox del citoplasma es tan reductor que impide la formación de los puentes disulfuro (Ziegler y Poulsen, 1977; Gilbert, 1990). Como ocurre en las células eucariotas, el principal sistema redox en el citoplasma de *E. coli* es el glutation. *E. coli* contiene altos niveles de glutation (la concentración intracelular es 5 mM) que se mantiene prácticamente reducido (Kosower y Kosower, 1978). La relación de glutation reducido a oxidado varía entre 50:1 y 200:1 (Hwang *et al.*, 1992). Similares condiciones *in vitro* no permiten la formación de puentes disulfuro en proteínas (Lyles y Gilbert, 1991; Hwang *et al.*, 1992; Walker y Gilbert, 1994). De hecho, cuando muchas proteínas que son exportadas fuera del citoplasma y que forman puentes disulfuro, son expresadas en el citoplasma, no se forman los puentes disulfuro. Esto ocurre con la β -lactamasa, que es dirigida al periplasma por una secuencia señal. Sin embargo, cuando el precursor de la proteína se acumula en el citoplasma por inhibición de la secreción, el puente disulfuro no se forma (Pollit y Zalkin, 1983). Otro ejemplo se encuentra en la fosfatasa alcalina, donde todas sus cisteínas se encuentran reducidas durante largo tiempo cuando esta proteína es expresada en el citoplasma. Sin embargo, cuando se permite la secreción de la proteína al periplasma, la oxidación de los residuos de cisteína es inmediata (Derman y Beckwith, 1991). Son muy pocas las proteínas citoplasmáticas que pueden formar puentes disulfuro estables en el citoplasma (Schultz y Schirmer, 1979). Una de las excepciones se da con el inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI), en el que el plegamiento y la formación de los puentes disulfuro de la proteína bloquean su secreción al periplasma (Nilsson *et al.*, 1991). Sin embargo, el caso del BPTI es bastante raro porque es capaz de plegarse a su conformación nativa partir de un estado reducido en condiciones redox similares a las que existen intracelularmente (Harisch *et al.*, 1979; Creighton y Goldenberg, 1984).

La diferencia en el número de grupos SH libres de las proteínas obtenidas con los dos plásmidos de expresión podría ser debida a la diferente localización de ambas. Así, la proteína pUC/rp26 se expresaría intracelularmente mientras que la proteína pKK/rp26 sería exportada al periplasma de la célula. Es como si en el plásmido pKK233-3N hubiera alguna secuencia señal que permitiera la secreción de la proteína. El protocolo de purificación empleado es el mismo, sea cual sea el plásmido de expresión empleado, por lo que no puede distinguir entre proteína intracelular y periplásmica. Sin embargo, cuando se aplica un protocolo de purificación de fracción de periplasma se comprueba que, independientemente del plásmido utilizado, la mayor parte de la proteína se expresa intracelularmente. Por ello, el hecho de que en las preparaciones de proteína pKK/rp26 posean 1 grupo tiólico libre podría indicar que la proteína se puede oxidar durante el proceso de purificación ya que, al tratarse de una proteína intracelular, debería tener todos sus grupos sulfhidrilos totalmente reducidos por el entorno reductor en el que se encuentra.

Los puentes disulfuro juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura nativa de un gran número de proteínas. Una posible explicación de la contribución de los puentes disulfuro a la estabilidad de las proteínas residía en el incremento de la energía libre de la forma desnaturalizada por una disminución de la entropía (Cooper *et al.*, 1992). Sin embargo, los detalles termodinámicos del aumento de la estabilidad parecen ser más complejos e implican tanto efectos entrópicos como entálpicos. Así, hay otros modelos (Doig y Williams, 1991; Kuroki *et al.*, 1992; Tidor y Karplus, 1993) que sugieren que el efecto dominante de los puentes disulfuro es entálpico, disminuyendo la exposición de residuos hidrofóbicos al disolvente y modificando puentes de hidrógeno estables en el estado desnaturalizado. Sea cual sea el efecto, mediante técnicas de mutagénesis dirigida es posible crear puentes disulfuro que, en general, estabilizan la estructura de una proteína (Betz y Pielak, 1992; Clarke y Fersht, 1993; Hinck *et al.*, 1996), aunque algunas veces la creación de este tipo de enlace llega a desestabilizar la estructura de la proteína (Matsumura *et al.*, 1989).

Los estudios que se han llevado a cabo con la proteína EIAV-rp26 de EIAV indican claramente que los residuos de cisteína juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura de la proteína. Ésta se purifica en dos estados de oxidación diferentes: con casi sus tres grupos sulfhidrilo reducidos (pUC/rp26) o con dos de ellos oxidados formando un puente disulfuro (pKK/rp26). Este puente disulfuro no tiene un patrón único, ya que cuando se marca la cisteína libre con ¹⁴C-iodoacetamida se observa que las tres cisteínas están marcadas en, aproximadamente, la misma proporción. La formación del puente disulfuro lleva consigo cambios en la estructura secundaria y terciaria. El espectro de CD en el

ultravioleta lejano indica que al estar dos de los tres grupos SH oxidados se produce un aumento en la proporción de lámina β y una disminución en la proporción de hélice α . Además, el entorno de los residuos de triptófano cambia, haciéndose más accesibles, como indican los estudios de desactivación de fluorescencia con yoduro potásico.

Cuando la proteína pUC/rp26 se oxida, formándose fundamentalmente un puente disulfuro intramolecular, se origina una estructura que posee menor estabilidad térmica y una mayor proporción de residuos de triptófano accesibles a la desactivación por IK. Por otro lado, la mutación de la cisteína en la posición 48 no produce grandes cambios en la estructura de EIAV-rp26. Los resultados obtenidos con la proteína mutante están en la misma línea que los obtenidos con la proteína original, en el sentido de que el estado de oxidación en el que se encuentran los dos grupos tiólicos determina la estructura de la proteína. Cuanto mayor es el número de grupos SH libres mayor es el contenido en hélice α , menos accesibles a la desactivación por IK son los residuos de triptófano y más estable es la estructura, en términos de desnaturalización térmica. Estos resultados no permiten decidir cuál de las dos conformaciones de la proteína es realmente la nativa: la proteína con sus tres grupos SH libres, pUC/rp26, o la proteína en la que hay un puente disulfuro formado, pKK/rp26. La proteína rp24 de HIV-1, en la que se describe que hay un puente disulfuro formado entre las dos cisteínas que se conservan en todos los lentivirus (Hausdorf *et al.*, 1994) se expresa de manera intracelular, por lo que, en principio, debería tener sus grupos sulfhidrilo reducidos. Además, esta proteína recombinante se aísla de cuerpos de inclusión, lo que supone que para solubilizarla sea necesario tratarla con urea para, posteriormente, renaturalizarla mediante dilución. En el caso de la tirosina quinasa LCK humana (Yasukawa *et al.*, 1995), y comparando con la proteína nativa obtenida en forma soluble mediante un sistema en el que se coproduce con la tioredoxina de *E. coli.*, se concluye que sólo una pequeña proporción de la proteína solubilizada a partir de urea tiene la conformación nativa. Algo parecido podría entonces ocurrir con rp24 de HIV-1, de manera que el puente disulfuro sería un artefacto del proceso de renaturalización. La falta de actividad enzimática de estas proteínas hace más difícil distinguir la estructura nativa. Una posibilidad consistiría en clonar la proteína en algún plásmido que incluya una secuencia señal que permita comprobar que realmente la proteína que es exportada al periplasma tiene un puente disulfuro formado.

Como se conoce la estructura tridimensional de los dos posibles dominios de la proteína rp24 de HIV determinada tanto cristalográficamente (Momany *et al.*, 1996; Gamble *et al.*, 1997), como por RMN (Gitti *et al.*, 1996), se puede ver cuál es la posición que ocupan los residuos de cisteína. En el caso de los residuos conservados del extremo carboxilo-terminal de la proteína rp24, la cisteína de la posición 198 se encuentra situada en un hélice α de corto tamaño y la cisteína 218 está en una zona de la proteína que no presenta estructura ordenada. En la estructura cristalina del fragmento 151-231 ambos residuos se encuentran formando el puente disulfuro (Gamble *et al.*, 1997). La proteína p24 no posee ningún otro residuo de cisteína mientras que p26 de EIAV tiene otro situado en la posición 48. Si, como cabe esperar, la estructura de estas proteínas es similar, este residuo Cys48 se encontrará en un loop que une las hélices denominadas B y C en la estructura del fragmento 1-151 de rp24. A partir de las estructuras tridimensionales de los dos fragmentos se ha construido un modelo para el dímero de p24 (Fig. 29) donde se unen las estructuras de los dos fragmentos de rp24 a través de una secuencia de cinco aminoácidos. En este modelo, la tercera cisteína quedaría muy alejada de las otras dos como para que se produzca una interacción de este residuo con alguno de los otros dos del extremo carboxilo-terminal. Es decir, no parece que pueda haber un equilibrio de interacción entre los tres residuos de cisteína que haga que en ocasiones un grupo SH se encuentre libre y en otras formando parte de un puente disulfuro. Sin embargo, no hay que olvidar que la estructura de la proteína completa de la cápsida de lentivirus no ha sido determinada y que la estructura que aparece en la Figura 29 es un modelo siendo el extremo carboxilo-terminal el responsable de la formación del dímero, y que exista otro modelo según el cual los fragmentos amino-terminales de dos moléculas de proteína se encuentran interaccionando (Momany *et al.*, 1996). Por tanto, es necesario conocer la estructura tridimensional de la proteína completa para decidir cual es el modelo correcto de formación de los dímeros de p24.

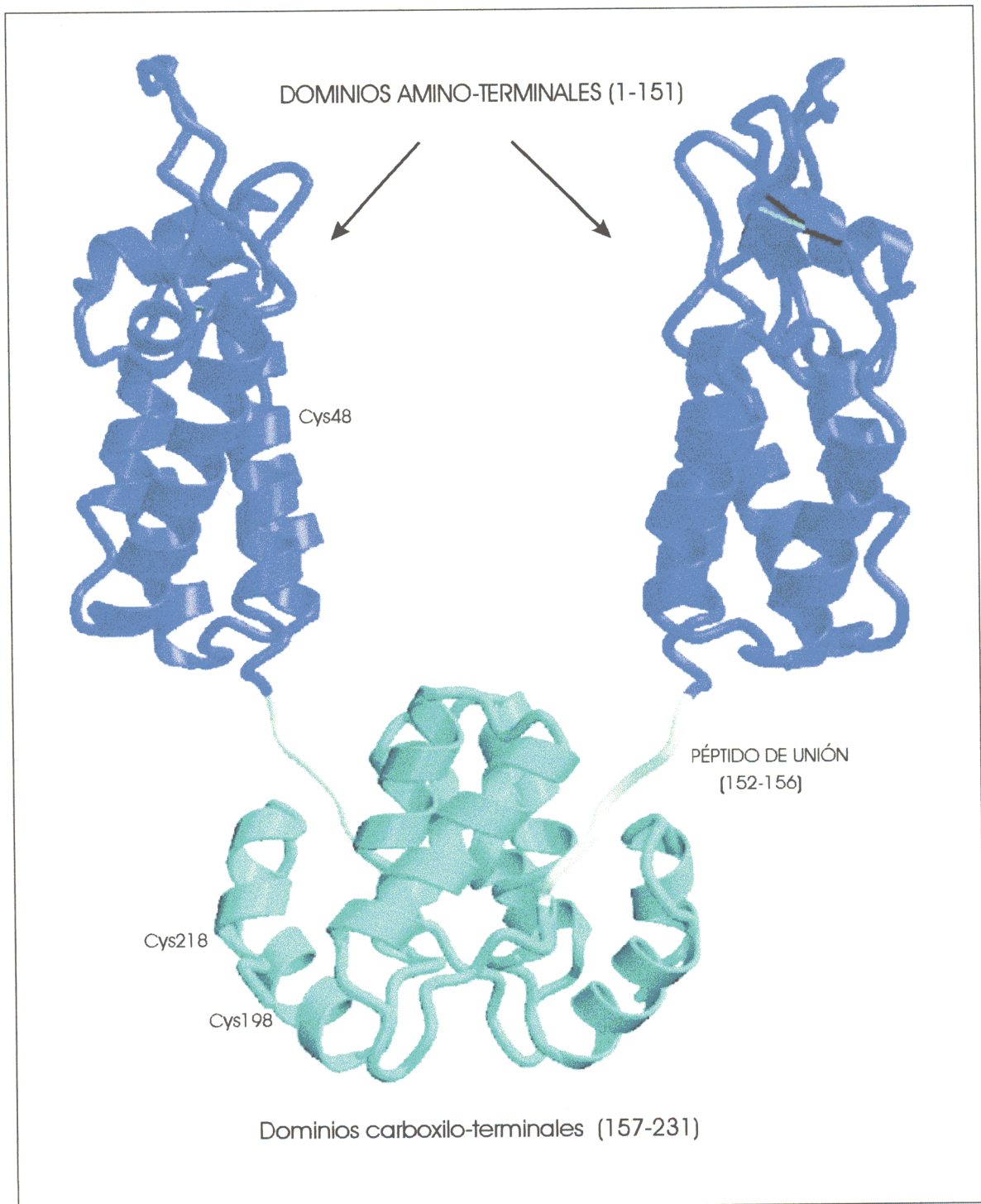


Figura 29. Modelo estructural del dímero formado por la proteína p24 completa de la cápsida de HIV-1. Los dominios amino-terminales se encuentran unidos a los carboxilo-terminales a través de un pentapéptido que permite un ángulo de rotación de 90°. Las posiciones que ocuparían los residuos de cisteína de la proteína p26 de EIAV se encuentran señalados. Entre los residuos Cys198 y Cys218 es donde se forma el puente disulfuro en la proteína p24 de HIV-1 (Gamble *et al.*, 1997).

1.D. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA rp26-His DE EIAV

Está claro que a pesar de conocerse la estructura tridimensional de los dos posibles dominios de p24 de HIV, es necesario disponer de datos estructurales de la proteína completa. Un posible candidato sería la EIAV-rp26, dado que posee una estructura globular que, en principio, se puede considerar nativa y, además, se mantiene monomérica en disolución hasta una concentración de 20 mg/ml. Para utilizar la resonancia magnética nuclear como método experimental de determinación de la estructura, y al tratarse de una proteína relativamente grande, 26 kDa, sería necesario disponer de 0.5 ml de una disolución 1 mM de proteína marcada con ^{15}N y ^{13}C . Como se obtienen 1.2-1.5 mg/L de medio, el precio de la preparación sería excesivamente alto. Una de las formas de aumentar el rendimiento consistiría en disminuir el número de etapas del proceso de purificación. Para ello se ha procedido a clonar la proteína p26 utilizando un vector de expresión que añade una extensión de seis histidinas en un extremo de la proteína. También se podía utilizar la proteína homóloga p24 de FIV que, como se indicará más adelante, se ha clonado con la extensión de seis histidinas. Sin embargo, esta proteína precipita a una concentración cercana a los 15 mg/ml, haciendo imposible su utilización en estudios estructurales que requieran una alta concentración.

CLONACIÓN , EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA rp26-His

La proteína de la cápsida de EIAV, p26, se ha clonado en el vector de expresión, pQE30, que tiene la característica de añadir en el extremo amino-terminal de la proteína un fragmento de seis residuos de histidina, lo que va a permitir obtener la proteína pura en un solo paso de purificación mediante una cromatografía de afinidad. Con este nuevo método se mejora el rendimiento de la purificación y se reduce de forma importante el tiempo que se emplea en obtener la proteína pura. La proteína, a través de los seis residuos de histidina, interacciona con la resina Ni-NTA-Agarosa, que posee iones níquel cargados, quedándose retenida en la columna. Para eluirla es necesario un cambio de pH que protone a las seis histidinas, un agente quelante de los iones Ni^{2+} , como el EDTA, o bien un compuesto como el Imidazol que compita con la histidina en su interacción con el Ni^{2+} . En nuestro caso se optó por eluir la proteína con Imidazol 200 mM. En la Figura 30 se muestra un gel correspondiente a la purificación de rp26-His. Como puede observarse la incubación de las células M15 con IPTG durante 4 h induce la aparición de una banda alrededor de 26 KDa correspondiente a la proteína rp26-His (Fig. 30, pocillos 1 y 2). Esta

proteína es la mayoritaria de las que se cargan a la columna de Ni-NTA-Agarosa y es, además, la única que interacciona con el soporte cromatográfico, como se desprende de la comparación de los pocillos 3 y 4 de la Figura 30. La proteína que se eluye con Imidazol 200 mM posee una pureza superior al 95% (Fig. 30, pocillo 5). De esta forma se obtienen alrededor de 4 mg/L de medio de cultivo, mientras que con el anterior método de purificación se obtenían unos 1.2 a 1.5 mg/L de medio. Además, el método anteriormente empleado comprendía etapas de precipitación con sulfato amónico, diálisis y dos cromatografías. Por lo tanto, además de mejorar mucho el rendimiento, se disminuye considerablemente el tiempo necesario para obtener la proteína pura.

La identidad de la proteína se determinó por análisis de aminoácidos. La composición de aminoácidos coincide con la composición teórica deducida a partir de la secuencia (Stephens *et al.*, 1986; Kawakami *et al.*, 1987), y coincide con la de EIAV-rp26 (Tabla III), excepto en el número de histidinas y en la existencia de cinco residuos adicionales que se introducen como consecuencia de la clonación en el plásmido pQE30.

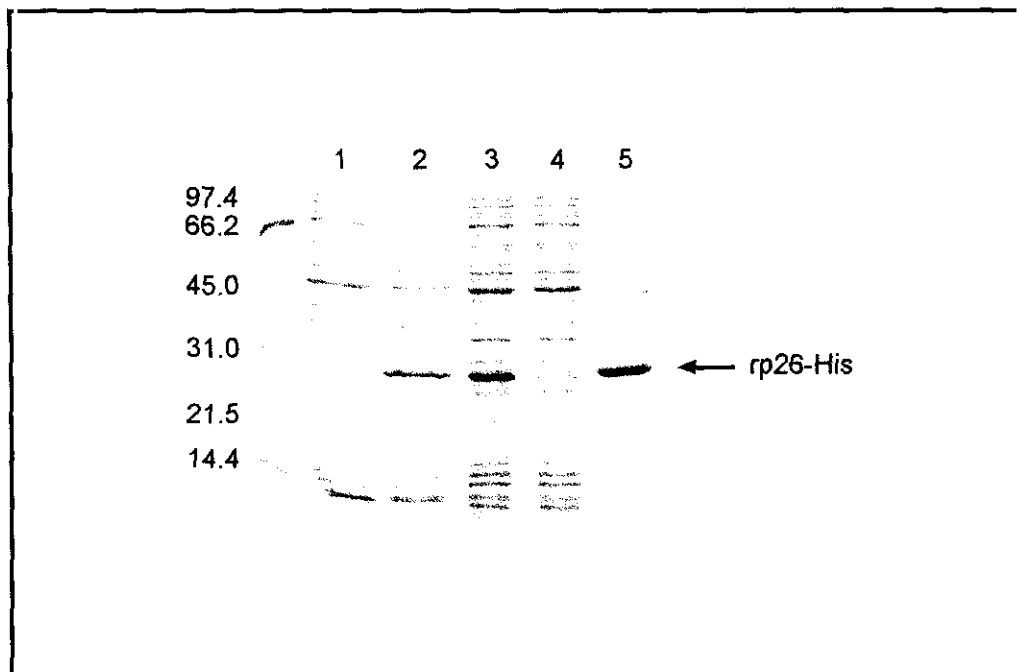


Figura 30. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de los pasos de purificación de rp26-His. Pocillo 1, células M15 sin inducir; pocillo 2, células M15 inducidas con IPTG durante 4 horas; pocillo 3, muestra que se carga en la columna de Ni-NTA-Agarosa; pocillo 4, proteínas no retenidas en la columna; pocillo 5, proteína rp26 eluida de la columna con Imidazol 200 mM.

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE rp26-His

Una vez comprobado que este método de purificación permite obtener la proteína p26 con mayor rendimiento, es necesario caracterizar estructuralmente esta proteína, para comprobar si la introducción de seis residuos de histidina afecta a su estructura tridimensional. Es de suponer que no habrá ningún gran cambio por la adición de seis residuos ya que la proteína consta de 233 aminoácidos y el cambio supone un aumento de un 3% en el número de residuos.

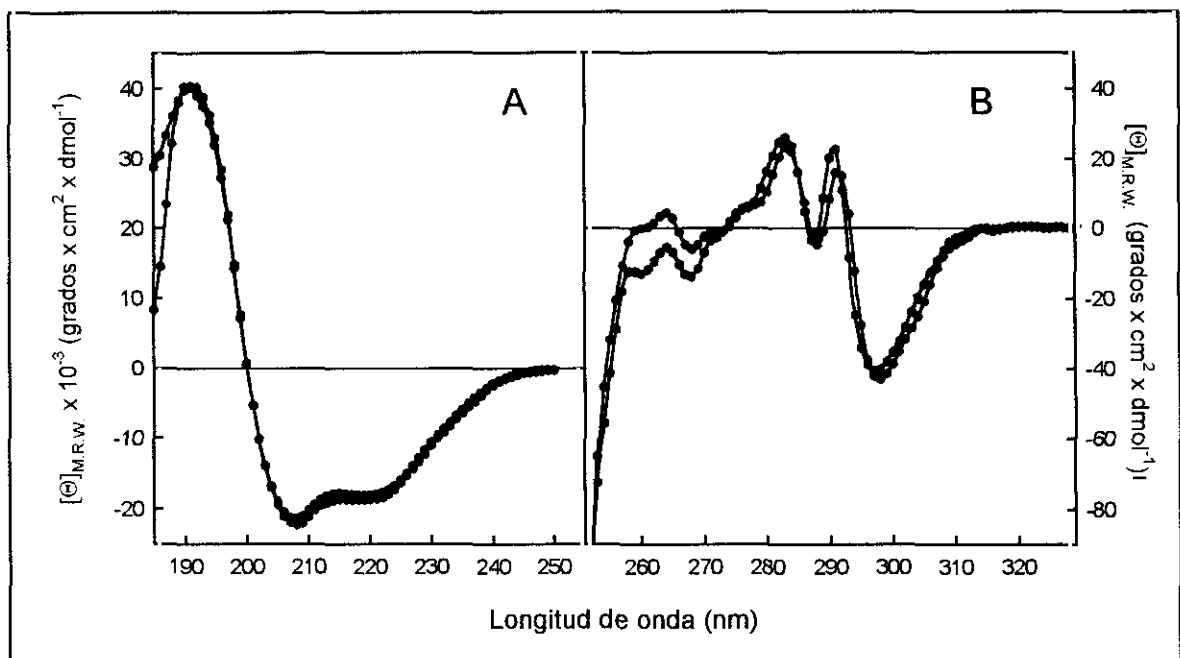


Figura 31. Espectros de dicroísmo circular de las proteínas pUC/rp26 (●) y rp26-His (■) de EIAV. (A) Espectros de dicroísmo en el UV lejano. (B) Espectros de dicroísmo en el UV próximo. La concentración de proteína utilizada se encontraba entre 0.1-0.2 mg/ml para los espectros de UV lejano y 1 mg/ml para los espectros de UV próximo.

En la Figura 31 se representan los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y próximo de la proteína rp26-His, donde se comparan con los de la proteína pUC/rp26. Como puede observarse, los espectros en el ultravioleta lejano coinciden totalmente, tanto en la forma como en el valor de la elipticidad. La adición del fragmento de seis residuos de histidina no modifica el porcentaje de α -hélice que sigue siendo la estructura secundaria mayoritaria. En cuanto a los espectros en el UV próximo, la forma del espectro de las dos proteínas es muy parecida siendo los valores de elipticidad prácticamente coincidentes. El resultado de la valoración con DTNB de la proteína con los seis residuos de histidina fue de 2.9 SH libres/molécula de proteína, valor que es ligeramente mayor que el que se obtiene con pUC/rp26. Al

igual que ocurre con la proteína pUC/rp26, no parece que en esta proteína haya un puente disulfuro formado entre dos de sus tres residuos de cisteína.

En lo que a la estabilidad térmica respecta, la proteína rp26-His posee una temperatura de desnaturalización ligeramente menor que pUC/rp26 (53.8 ± 1.0 frente a 52.9 ± 1.0 °C). La cooperatividad del proceso es la misma en los dos casos.

Los espectros de emisión de fluorescencia, excitando a 275 y 295 nm, de la proteína rp26-His, presentan un máximo a 322 y 325 nm, respectivamente (datos no mostrados). El espectro obtenido excitando a 275 nm está algo desplazado hacia una menor longitud de onda con respecto al obtenido para la proteína pUC/rp26 ($\lambda_{\text{max}} = 324$ nm). Sin embargo, a 295 nm, longitud de onda a la que sólo se excitan los triptófanos, el máximo coincide. Por tanto, la extensión de 6 His provoca una pequeña modificación del entorno de los fluoróforos de la proteína.

En resumen, los parámetros estructurales de la proteína rp26-His de EIAV indican que la introducción de los seis residuos de histidina no influye significativamente en la estructura de la proteína. Por ello y teniendo en cuenta el ahorro tanto de tiempo como económico que supone la purificación, esta proteína puede ser empleada en estudios posteriores encaminados a determinar su estructura tridimensional.

2. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA p24 DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA (FIV). MECANISMO DE PLEGAMIENTO

La proteína p24 de FIV, al igual que la proteína p26 de EIAV, posee una gran homología de secuencia con el resto de las proteínas que forman la cápsida de los lentivirus. Un alineamiento de secuencia indica que la proteína p24 de FIV tiene un 34% de identidad con p26 de EIAV, un 43% con la del virus visna y un 29% con la proteína p24 de HIV-1. Por ello, los datos estructurales que se obtengan para esta proteína serán representativos del resto de proteínas de esta familia. Además, y ante la escasez de datos al respecto, se han llevado a cabo diferentes estudios encaminados a conocer el mecanismo de plegamiento de la proteína. Por ello, se ha recurrido a la obtención de formas mutantes de la proteína en los que se ha cambiado los residuos de triptófano que aparecen en la secuencia de p24 (Fig. 32). Los datos obtenidos serán, igualmente, representativos de este grupo de proteínas.

1	PIQTVNGVPQ	YVALDPKMVS	IFMEKAREGL	GGEEVQLWFT	AFSANLTPTD
51	MATLIMAAPG	CAADKEILDE	SLKQLTAEYD	RTHPPDAPRP	LPYFTAAEIM
101	GIGLTQEQQA	EARFAPARMQ	CRAWYLEALG	KLAAIKAKSP	RAVQLRQGAK
151	EDYSSFIDRL	FAQIDQEQNT	AEVKLYLKQS	LSIANANADC	KKAMSHLKPE
201	STLEEKLRAC	QEIGSPGYKM	QLL		

Figura 32. Secuencia de aminoácidos de la proteína FIV-p24. En negrita se encuentran señalados los residuos de triptófano de la proteína.

Los aminoácidos aromáticos, especialmente los triptófanos, han sido utilizados a menudo como sondas intrínsecas de las proteínas para estudiar la estabilidad de las proteínas así como el proceso de desnaturalización-renaturalización (Loewenthal *et al.*, 1991; Royer *et al.*, 1993; Martensson *et al.*, 1995; Cai y Schirch, 1996; Nath y Udgaonkar, 1997). En la secuencia de p24 hay dos residuos de triptófano en las posiciones 38 y 124 que pueden ser cambiados por uno o dos residuos de fenilalanina y así obtener dos mutantes sencillos y uno doble. Aunque los dos residuos de triptófano de la proteína FIV-p24 no se encuentran conservados en el resto de las proteínas de las cápsidas lentivirales los estudios llevados a cabo con las proteínas salvaje y mutantes permitirán obtener información de cómo la proteína alcanza su estructura tridimensional y del modo de plegamiento de los dos posibles dominios de estas proteínas (residuos 1-151 y 152-231, en el caso de la proteína p24 de HIV-1).

2.A. CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE FIV-rp24 Y MUTANTES

Aplicando la estrategia descrita en el apartado *Métodos Experimentales*, se consiguió obtener el fragmento de DNA que codifica la proteína p24 de FIV y clonarlo en el plásmido pQE60 (Fig. 33), obteniéndose el plásmido pQE60/FIVp24. Este plásmido añade un fragmento de seis residuos de histidina en el extremo carboxilo-terminal de la proteína. Como se ha indicado anteriormente en el caso de p26 de EIAV, la introducción de los seis residuos de histidina no modifica prácticamente la estructura de la proteína y, sin embargo, facilita su purificación.

La secuencia de DNA del gen de p24 generado por PCR se comprobó mediante secuenciación automática, siendo idéntica a la secuencia publicada (Talbot *et al.*, 1989). La proteína p24 original tiene 223 aminoácidos mientras que la proteína FIV-rp24 posee 237. Los aspectos que diferencian a ambas proteínas son las siguientes: la introducción del sitio de restricción *NcoI* hace que se añadan dos aminoácidos, Met y Val, en el extremo amino-terminal de FIV-rp24. Por otro lado, en el extremo carboxilo-terminal, FIV-rp24 tiene el tetrapéptido AEAL que en el precursor se encuentra entre p24 y p10 (Talbot *et al.*, 1989). Además, el sitio de restricción *BglII* añade otros dos aminoácidos, Arg y Ser, en el extremo carboxilo-terminal. Por último, FIV-rp24 contiene los seis residuos de histidina procedentes del plásmido pQE60. Es de esperar que esta diferencia en tamaño, FIV-rp24 tiene un 6% más de aminoácidos que p24, no tenga un efecto apreciable en la estructura global de la proteína, máxime si se tiene en cuenta que las diferencias tienen lugar en los extremos de la cadena polipéptica. Por otro lado, ahora los residuos de Trp aparecen en las posiciones 40 y 126.

Una vez clonada la proteína salvaje se procedió a la obtención de los dos mutantes sencillos aplicando la técnica de PCR. Para ello se utilizó el plásmido pQE60/FIVp24 como molde junto con los oligonucleótidos apropiados para cada mutante (Fig. 34). En el caso del mutante W40F se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos cebadores: p24-*NcoI*(+)/W40F(-) y W40F(+)/p24-*BglIII*(-); en el caso del mutante W126F los pares fueron p24-*NcoI*(+)/W126F(-) y W126F(+)/p24-*BglIII*(-). Por tanto, para cada mutante se obtienen dos fragmentos de DNA. Tal y como puede observarse en la Figura 35, los fragmentos obtenidos en los dos mutantes tienen los tamaños esperados, esto es, 127 y 587 bp para el mutante W40F y 394 y 320 para el mutante W126F, utilizando los pares de cebadores indicados anteriormente. Además de la banda correspondiente al fragmento de DNA del tamaño apropiado, en algunas de las reacciones de PCR se obtienen bandas de otros tamaños que pueden

resultar de uniones inespecíficas de oligonucleótidos al molde como ocurre con el fragmento W126F (+) o W40F (-) (Fig. 35). En este último caso la banda inespecífica es la mayoritaria.

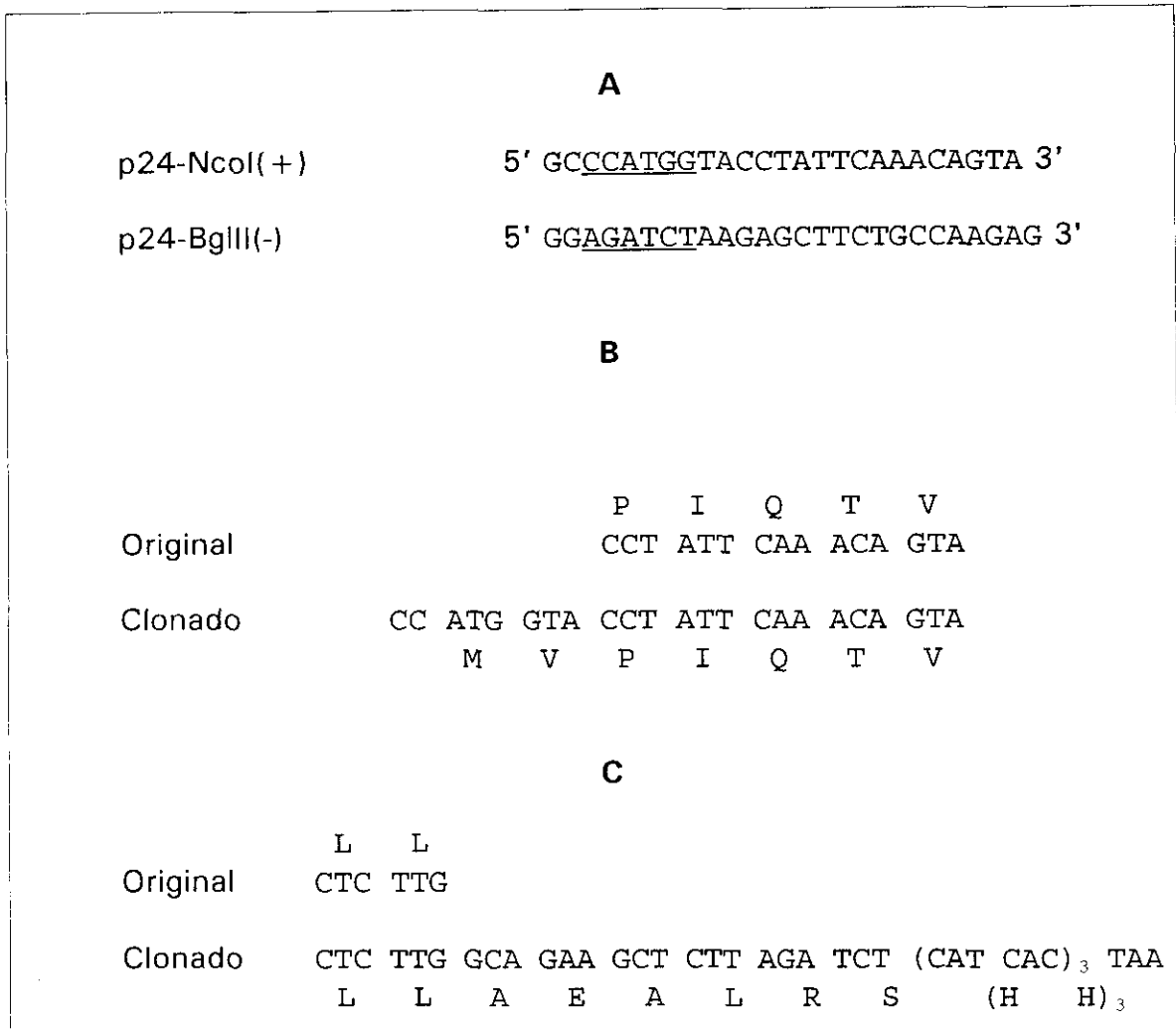


Figura 33. Estrategia de clonación de FIV-rp24. (A) Secuencia de los oligonucleótidos cebadores empleados en la reacción de PCR para amplificar el gen de p24. El cebador p24-NcoI(+) introduce un sitio de restricción *NcoI*, mientras que el cebador p24-BglII(-) introduce un sitio de restricción *BglII* y un codón de terminación (*). (B) Alineamiento de las secuencias original y clonada del extremo amino-terminal de la proteína p24. (C) Alineamiento de secuencias original y clonada del extremo carboxilo-terminal de la proteína p24. Los nuevos sitios de restricción se encuentran subrayados (*NcoI* - CCATTG; *HindIII* - AGATCT) y 'TAA' es el codón de terminación del gen clonado. La secuencia amino-terminal de p24 es PIQ y la de FIV-rp24 es MVPIQ. La secuencia carboxilo-terminal de p24 es L-L. La proteína FIV-rp24 contiene, además, el tetrapéptido AEAL, que en el precursor se encuentra entre p24 y p10 (Talbot, 1989), los residuos R y S, incluidos al crear el sitio de restricción *BglII* y las seis histidinas que facilitan la purificación de la proteína FIV-rp24.

		A									
W40F(+)											
Original		Q	L	W	F	G	A	F	S	A	
		CAA	CTA	TGG	TTT	ACT	GCC	TTC	TCT	GCA	
Mutado		<u>CAA</u>	<u>TTG</u>	TTC	TTT	ACT	GCC	TTC	TCT	GCA	
		Q	L	F	F	G	A	F	S	A	
W40F(-)											
Original		G	E	E	V	Q	L	W	F		
		GGT	GAG	GAA	GTT	CAA	CTA	TGG	TTT		
Mutado		GGT	GAG	GAA	GTT	<u>CAA</u>	<u>TTG</u>	TGG	TTT		
		G	E	E	V	Q	L	W	F		
		B									
W126F(+)											
Original		W	Y	L	E	A	L	G			
		TGG	TAT	CTC	GAG	GCA	TTA	GGA			
Mutado		TGG	<u>TAT</u>	<u>CTA</u>	<u>GAG</u>	GCA	TTA	GGA			
		W	Y	L	E	A	L	G			
W126F(-)											
Original		R	M	Q	C	R	A	W	Y	L	E
		AGG	ATG	CAG	TGT	AGA	GCA	TGG	TAT	CTC	GAG
Mutado		AGG	ATG	CAG	TGT	AGA	GCA	TTT	<u>TAT</u>	<u>CTA</u>	<u>GAG</u>
		R	M	Q	C	R	A	F	Y	L	E

Figura 34. Secuencia de oligonucleótidos de los cebadores utilizados en la obtención de los mutantes sencillos W40F (A) y W126F (B). Se recoge la secuencia de la zona donde se produce la mutación. En todos los casos la secuencia del cebador (mutado) se compara con la del DNA de FIV-rp24 en la zona donde se produce la mutación (original). (A) La mutación de W (TGG) a F (TTC) se introduce en la reacción de PCR en la que se utiliza el oligonucleótido cebador W40F(+). (B) La mutación de W (TGG) a F (TTT) se introduce en la reacción de PCR en la que se utiliza el oligonucleótido cebador W126F(-). Los sitios de restricción *MfeI* (CAA TTG) y *XbaI* (TCT AGA) se encuentran subrayados. Puede comprobarse como los cambios introducidos para crear los nuevos sitios de restricción no afectan al resto de la secuencia de aminoácidos de las proteínas mutantes.

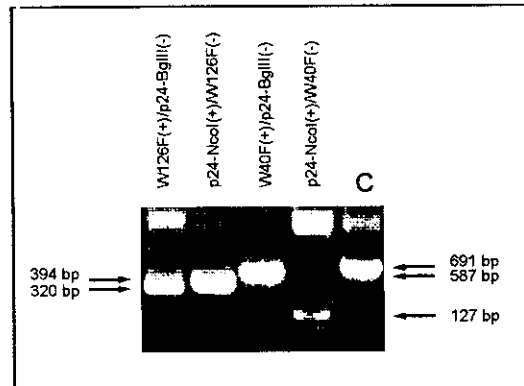


Figura 35. Electroforesis en gels de agarosa de los productos de las reacciones de PCR utilizadas para obtener los mutantes W40F y W126F. Se empleó como molde en todos los casos el plásmido pQE60/FIVp24, junto con los oligonucleótidos que se indican en cada uno de los pocillos. Como control se empleó el producto de PCR obtenido en una reacción en la que se emplea como molde el DNA de la proteína p24 de FIV y los oligonucleótidos p24-NcoI(+) y p24-BgIII(-).

Las bandas de tamaño adecuado del gel de agarosa se extrajeron obteniéndose los fragmentos puros. A continuación estos fragmentos se cortaron con las enzimas correspondientes a los nuevos sitios internos (*MfeI* en el caso de W40F y *XbaI* en el de W126F) y se ligaron. El producto de ligación se amplificó mediante otra reacción de PCR. Como puede verse en la Figura 36, en ambos casos se obtiene un fragmento de unos 700 bp que aparece a la misma altura que el control utilizado y que corresponde al fragmento de DNA de la proteína salvaje. Este DNA se clonó en el vector de expresión pQE60, que, como en el caso de la proteína p24 salvaje, añade seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal de las proteínas mutantes.

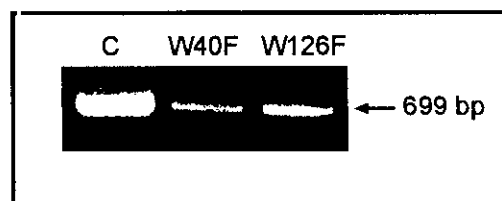


Figura 36. Electroforesis en gels de agarosa de los productos de PCR correspondientes a los mutantes W40F y W126F. Como control se empleó el producto de PCR obtenido en una reacción en la que se emplea como molde el plásmido pQE60/FIVp24 y los oligonucleótidos cebadores p24-NcoI(+) y p24-BgIII(-).

Para la obtención del doble mutante en el que los dos residuos de triptófano se cambian por fenilalanina, se llevaron a cabo una serie de digestiones empleando los plásmidos pQE60/FIVp24, pQE60/W40F y pQE60/W126F (Fig. 10). De esta forma, y ligando tres de los fragmentos obtenidos en las digestiones, se obtuvo el plásmido

pQE60/W40/126F, que lleva el inserto correspondiente a la secuencia del doble mutante.

Las mutaciones introducidas se comprobaron mediante digestión de los plásmidos pQE60/W40F, pQE60/W126F y pQE60/W40/126F con las enzimas de restricción *MfeI* o *XbaI*, obteniéndose los fragmentos con los tamaños esperados. Además, la identidad de las secuencias de DNA mutadas se llevó a cabo mediante secuenciación automática observándose el cambio del triplete TGG a TTC, que produce la mutación en W40F, y el cambio TGG a TTT para el mutante W126F. Estos dos cambios se observaron simultáneamente en el caso del doble mutante W40/126F.

El método de purificación de la proteína salvaje y los mutantes es el empleado en el caso de la proteína rp26-His de EIAV, ya que en todos los casos se incorporan seis residuos de histidina, lo que permite purificarlas mediante una cromatografía de afinidad con una columna de Ni-NTA-Agarosa. En la Figura 37 se muestra un gel de la purificación de FIV-rp24 salvaje, siendo los resultados que se obtienen en el caso de los mutantes totalmente comparables. La proteína FIV-rp24 es una de las mayoritarias de las que se cargan en la columna. La proteína que se eluye con Imidazol 200 mM tiene una pureza superior al 99% (Fig. 37, pocillo 5). La masa molecular calculada para FIV-rp24 (27.5 KDa) es superior a la esperada para su composición de aminoácidos (26 KDa). Esta diferencia se observa con otras proteínas que contienen la extensión de seis histidinas en uno de los extremos de la cadena polipeptídica.

El rendimiento de la purificación varía según sea la proteína que se purifica. A partir de 1 L de medio de cultivo se obtienen las cantidades recogidas en la Tabla X. Como puede observarse la mutación del triptófano 40 no afecta apenas a la expresión de proteína. Se obtiene, prácticamente, la misma cantidad de proteína que en el caso de la proteína salvaje. Sin embargo, la mutación del triptófano 126 produce una disminución en la expresión y, por tanto, en la posterior purificación de la proteína; esto se mantiene en el caso del doble mutante. En todos los casos la cantidad de proteína purificada permite llevar a cabo perfectamente los estudios estructurales y de desnaturalización-renaturalización.

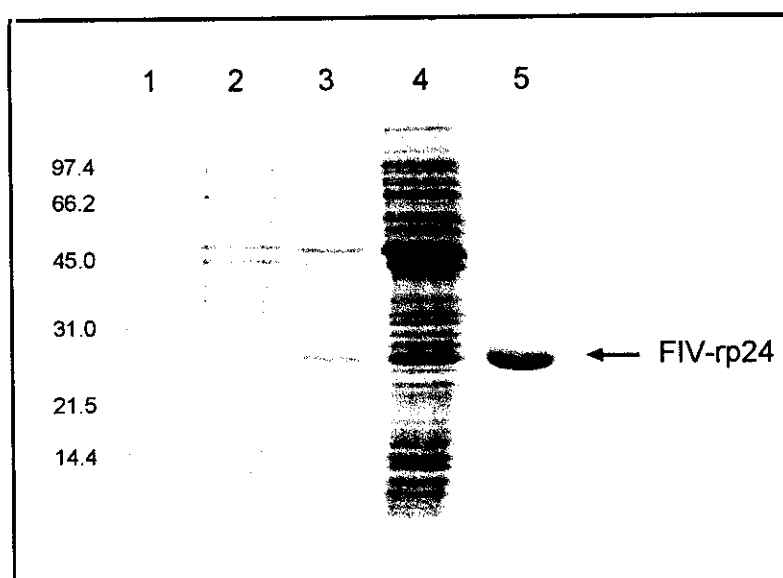


Figura 37. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de los pasos de purificación de FIV-rp24 salvaje. Pocillo 1, marcadores de masa molecular; pocillo 2, células M15 sin inducir; pocillo 3, células M15 inducidas con IPTG durante 4 horas; pocillo 4, muestra que se carga en la columna de Ni-NTA-Agarosa; pocillo 5, proteína FIV-rp24 eluida de la columna con Imidazol 200 mM. La masa molecular de los patrones se indica al margen de cada banda.

PROTEÍNA	CANTIDAD (mg)
FIV-rp24	4.5
W40F	4.0
W126F	2.0
W40/126F	2.0

Tabla X. Rendimiento de la purificación de FIV-rp24 y mutantes. Las cantidades recogidas en la tabla se obtuvieron a partir de 1 L de medio de cultivo.

Mediante análisis de aminoácidos se determinó la identidad de la proteínas purificadas. En la Tabla XI se compara la composición de aminoácidos de las cuatro proteínas con la composición teórica de p24 obtenida a partir de la secuencia de DNA publicada, teniendo en cuenta los aminoácidos que se añaden al clonar la proteína (Talbot *et al.*, 1989). Como puede observarse, la coincidencia entre la composición teórica y la experimental es prácticamente total. La no coincidencia en el número de Met puede ser debido a la eliminación de la metionina amino-terminal por la acción de la metionina amino-peptidasa, al igual que ocurre en el caso de EIAV-rp26 en la que el segundo aminoácido es también Val. En el número de histidinas teóricas se incluyen

las seis His que añade el plásmido pQE60. Para todas las proteínas obtenidas el número de residuos de histidina es de 9, ligeramente mayor que el valor teórico. Se puede observar el aumento en el número de residuos de fenilalanina que pasa de 7 residuos en la proteína salvaje a 8 en los mutantes sencillos y a 9 en el mutante doble. Por el contrario, el número de residuos de triptófano, que ha sido calculado mediante el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967; Gill y von Hippel, 1989), disminuye de 1.5 residuos para FIV-rp24 a 0.7 y 1.0 para los mutantes W40F y W126F, respectivamente, y 0 para W40/126F. La proteína FIV-rp24 tiene 4 Cys que podrían encontrarse en diferentes estados de oxidación. Dado que en el caso de EIAV-rp26 la formación de un puente disulfuro lleva consigo una modificación en la estructura proteica, se determinó el contenido en grupos SH libres de las diferentes proteínas utilizadas. Para las diferentes proteínas y en las diferentes preparaciones utilizadas, el número de grupos SH libres varió entre 2.0 y 3.0. El hecho de que en algunas preparaciones se obtengan 3 grupos tiólicos libres implica que no siempre se forma el puente disulfuro entre las dos Cys homólogas y que, al igual que ocurre en el caso de EIAV-rp26, el puente disulfuro se puede formar durante el proceso de purificación de la proteína.

AMINOÁCIDO	TEÓRICA	EXPER.	W40F	W126F	W40/126F
ALA	33	32	33	32	32
ARG	11	11	11	11	11
ASX	15	16	15	16	16
CYS ¹	4	4	N.D.	N.D.	N.D.
GLX	35	35	35	35	35
GLY	11	12	12	12	12
HIS	8	9	9	9	9
ILE	11	11	11	11	11
LEU	24	24	24	24	24
LYS	15	14	15	15	14
MET ²	9	8	8	8	8
PHE	7	7	8	8	9
PRO	14	15	15	15	15
SER	12	11	11	11	11
THR	11	11	11	10	10
TRP ³	2	1.5	0.7	1	-
TYR	7	7	7	7	7
VAL	8	8	7	8	8

Tabla XI. Composición de aminoácidos de la proteína FIV-rp24 salvaje y de las proteínas mutantes W40F, W126F y W40/126F. Se recoge la composición teórica y experimental de FIV-rp24 y la experimenta de los mutantes (1) El número de residuos de cisteína se determinó como CmCys en la proteína reducida con DTT y carboxiamidometilada. (2) En el número de Met teóricas se incluye la correspondiente al extremo amino-terminal. (3) El número de residuos de triptófano se calculó espectrofotométricamente (Edelhoeh, 1967).

2.B. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE FIV-rp24 Y MUTANTES

ESPECTROS DE ABSORCIÓN

En la Figura 38 aparecen representados los espectros de absorción en la región de ultravioleta de la proteína salvaje y de los mutantes. El espectro de absorción de la proteína salvaje, característico de una proteína, posee un máximo a 277 nm y dos hombros a 281 y 292 nm, con residuos de tirosina y triptófano, observándose una serie de hombros alrededor de 260-270 nm que representan la estructura fina de los siete residuos de fenilalanina. En el caso de los mutantes sencillos, el hombro a 292 nm se ve menos acentuado y en el espectro del doble mutante llega a desaparecer como consecuencia de la desaparición de los dos residuos de triptófano. Los espectros de los dos mutantes sencillos son prácticamente coincidentes, aunque el mutante W40F tiene una menor absorción y el máximo a 277 nm está algo más diferenciado. En estos espectros es más apreciable la contribución de los residuos de fenilalanina. El espectro del mutante W40/126F coincide con el espectro de la tirosina en disolución, aunque su máximo está desplazado hacia mayor longitud de onda, indicando que los residuos de tirosina en la proteína se encuentran en un entorno más hidrofóbico. Además, en este espectro se puede apreciar claramente la contribución de los residuos de fenilalanina en la región entre los 255 y 275 nm.

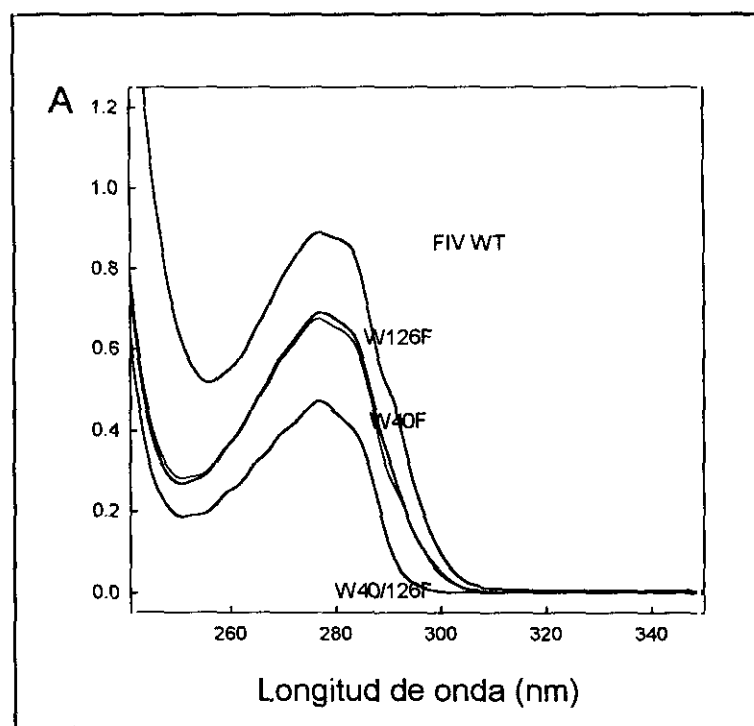


Figura 38. Espectros de absorción de la proteína FIV-rp24, de los mutantes sencillos W40F, W126F y del doble mutante W40/126F. En todos los casos la concentración de proteína es de 1mg/ml.

Mediante el análisis de aminoácidos de alícuotas de disoluciones de proteína de absorción conocida, se calcula el coeficiente de extinción molar de las proteínas salvaje y mutantes. Estos valores quedan reflejados en la Tabla XII, donde se comparan con los valores teóricos calculados a partir de la expresión que permite calcular el valor del coeficiente de extinción molar de una proteína en disolución acuosa (Pace *et al.*, 1995):

$$E_{280} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)} = n^{\circ} \text{ Trp} \times 5500 + n^{\circ} \text{ Tyr} \times 1490 + n^{\circ} \text{ cistina} \times 125$$

PROTEÍNA	E_{280} teor.	E_{280} exp. ¹
FIV-rp24	21430 (0.81)	23120 (0.88)
W40F	15930 (0.60)	17110 (0.65)
W126F	15930 (0.60)	17365 (0.67)
W40/126F	10430 (0.40)	11565 (0.44)

Tabla XII. Coeficiente de extinción molar a 280 nm teórico y experimental de la proteína FIV-rp24 y de los mutantes W40F, W126F y W40/126F. El valor teórico, con unidades $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se a calculado utilizando el método de Pace *et al.* (Pace *et al.*, 1995). El valor experimental se ha determinado mediante análisis de aminoácidos. Entre paréntesis se recoge $\epsilon^{0.1\%}$, esto es, el valor de la absorbancia a 280 nm de una disolución de proteína a una concentración de 1 mg/ml medida con un paso óptico de 1cm.

Los valores experimentales obtenidos son, aproximadamente, un 10% mayores que los teóricos en las cuatro proteínas. A partir de los valores indicados en la Tabla XII se puede calcular la contribución individual de los distintos componentes de los diferentes cromóforos al coeficiente de extinción. Así, expresado en términos de absorbancia de una disolución a una concentración de 1 mg/ml, el valor de $\epsilon^{0.1\%}$ del Trp40 sería de $0.23 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($6055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), el del Trp126 sería $0.25 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($5530 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el valor de las siete tirosinas sería $0.44 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($1650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por residuo. Estos valores indican el carácter aditivo de este parámetro, pues la suma de las contribuciones individuales de los dos residuos de triptófano y de las tirosinas nos da el valor del coeficiente de extinción de la proteína salvaje. La diferencia entre los valores del coeficiente de extinción de los dos triptófanos podría reflejar una diferencia en hidrofobicidad del entorno de ambos. Por ejemplo, se ha descrito que el valor de E_{280} del ester etílico del N-Ac-Trp es de $5630 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en agua y $6075 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en propanol (Pace *et al.*, 1995). El valor calculado de $1650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ /residuo de Tyr coincide bastante bien con el descrito para el ester etílico de N-Ac-Tyr en propanol (Pace *et al.*, 1995).

ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano se representan en la Figura 39-A. Las cuatro proteínas tienen un espectro que indica que la estructura secundaria mayoritaria sigue siendo la α -hélice, como ocurre en el caso de la proteína EIAV-rp26. En el espectro aparecen dos mínimos bien diferenciados a 208 y 220 nm, así como un máximo a 200 nm. Se puede observar que las mutaciones introducidas en las posiciones 40 y 126, bien por separado o de una manera conjunta, no tienen prácticamente ningún efecto sobre la forma y magnitud del espectro de dicroísmo circular. El valor promedio de elipticidad a 208 nm para la proteína salvaje y los mutantes W40F, W126F y W40/126F es -19110 , -19050 , -18330 y -18130 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$, respectivamente.

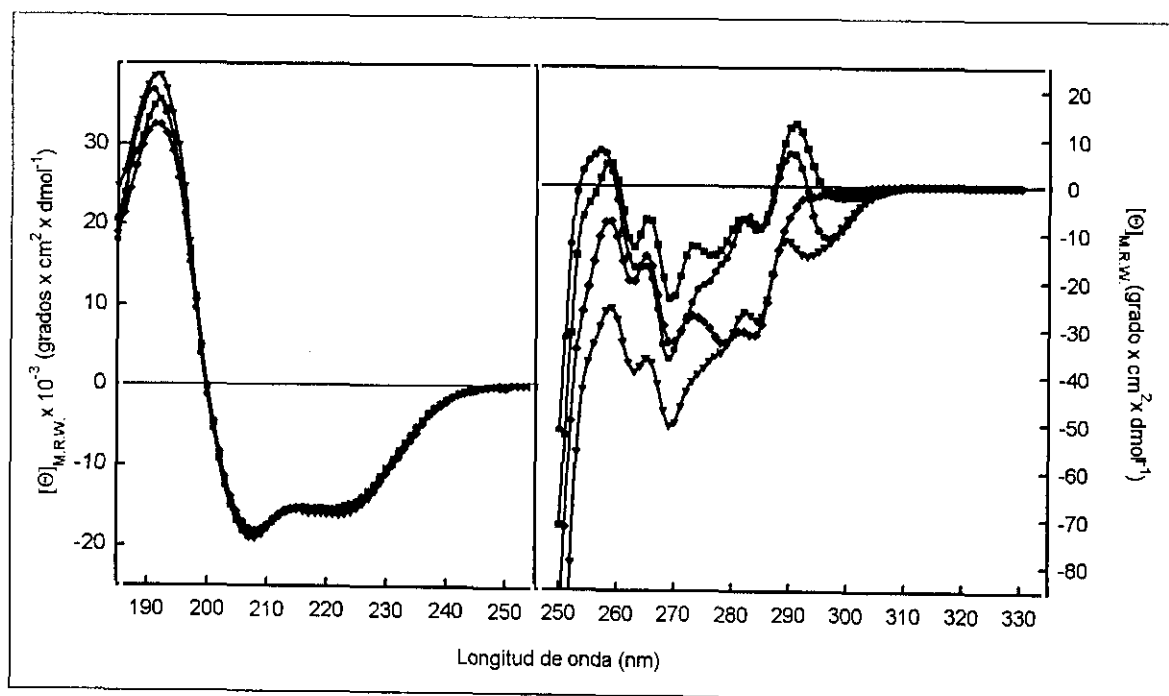


Figura 39. Espectros de dicroísmo de la proteína FIV-rp24 y de los mutantes. Espectros de CD el UV lejano (A) y en el UV próximo (B) de FIV-rp24 (\circ); W40F (∇); W126F (\square) y W40/126F (\diamond). La concentración de proteína utilizada fue de 0.1 mg/ml para el UV lejano y 1 mg/ml en el UV próximo. Los espectros son representativos de los obtenidos con cuatro preparaciones diferentes.

A partir de los espectros de CD y mediante el método CCA (Perczel *et al.*, 1991) se determinaron los porcentajes de estructura secundaria que aparecen en la Tabla XIII.

PROTEÍNA	% α -hélice	% estructura β	% giro β	% estructura no ordenada
FIV-rp24	48	0	20	32
W40F	52	0	18	30
W126F	51	0	20	29
W40/126F	49	5	14	32

Tabla XIII. Porcentajes de estructura secundaria de la proteína FIV-rp24 salvaje y las proteínas mutantes. Estos valores se han calculado a partir de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano mediante el método CCA (Perczel *et al.*, 1991).

Como reflejan los datos del ajuste del espectro de dicroísmo, el componente mayoritario de estructura secundaria en todas estas proteínas es la α -hélice, dando cuenta del 48-52% del total. La estructura β no aparece prácticamente en ninguna, salvo un pequeño porcentaje en el caso del doble mutante. El resto de estructura secundaria se reparte entre giro β , 20%, y estructura no ordenada, 30%. Por tanto, ninguna de las mutaciones introducidas modifican sustancialmente la estructura secundaria. Esta estructura es prácticamente coincidente con la obtenida para EIAV-rp26.

Los espectros de CD en el UV próximo se recogen en la Figura 39 (B). Como ya se ha indicado en esta región surgen de los entornos asimétricos de los residuos aromáticos, esto es, de un determinado ordenamiento tridimensional de las cadenas laterales. Normalmente la contribución de los residuos de Phe es considerablemente menor que la de los residuos de Tyr y Trp, por lo que suelen ser éstos los que determinan el espectro de CD en el UV próximo de una proteína. En el caso de FIV-rp24 salvaje se observan cuatro mínimos centrados a 262, 269, 284 y 296 nm así como un máximo a 290 nm. Alrededor de los 260 nm empieza a ser significativa la contribución de los enlaces peptídicos, por lo que alguna de las bandas observadas cerca de esta longitud de onda pueden no ser debidas a residuos aromáticos. Es difícil asignar estas bandas a residuos concretos debido a que pueden ser composición de otras bandas diferentes. La banda a 296 nm podría ser debida a un residuo de triptófano porque la tirosina no absorbe a esta longitud de onda; el resto pueden ser debidas tanto a tirosinas como a triptófanos. Analizando los espectros de CD de las formas mutantes se podría determinar a qué residuos de Trp se deben las distintas bandas, siempre y cuando los cambios de Trp por Phe no modifiquen la estructura tridimensional de la proteína. Los espectros de los mutantes W40F y W126F indican

que el residuo Trp40 es responsable de la banda positiva a 290 nm y que el residuo Trp126 lo es de la banda negativa centrada a 296 nm. Además, el espectro del doble mutante indica una contribución importante de los siete residuos de Tyr (Fig. 39-B), con bandas negativas a 262, 269, 278 y 284 nm. Si suponemos que las fenilalaninas que se han introducido por las mutaciones no influyen apenas en el espectro, la contribución de cada residuo de triptófano se puede calcular restando al espectro de la proteína salvaje el espectro del mutante sencillo correspondiente o restando el espectro del otro mutante al del doble mutante.

En la Figura 40 aparecen las contribuciones de los residuos de Trp40 (A) y Trp126 (B). Como se puede observar, independientemente del modo de cálculo utilizado, a partir de 265 nm, los resultados son prácticamente coincidentes. El espectro de cualquiera de los dos Trp es una combinación compleja de bandas. Así, la contribución del Trp40 al espectro es toda positiva y se puede observar que es el responsable de la banda del espectro de la proteína salvaje a 290 nm. Aparecen, además, otros dos máximos a 283 y 273 nm. En el espectro del Trp126 aparecen, fundamentalmente, dos bandas negativas, una a 272 nm, que coincide y anula la correspondiente positiva del Trp40 y otra situada a los 295 nm. Esta banda es la que aparece en la proteína salvaje a 296 nm. Las diferentes posiciones de los máximos de los triptófanos podrían indicar una diferente localización de ambos, estando el Trp126 algo menos expuesto al disolvente que el Trp40.

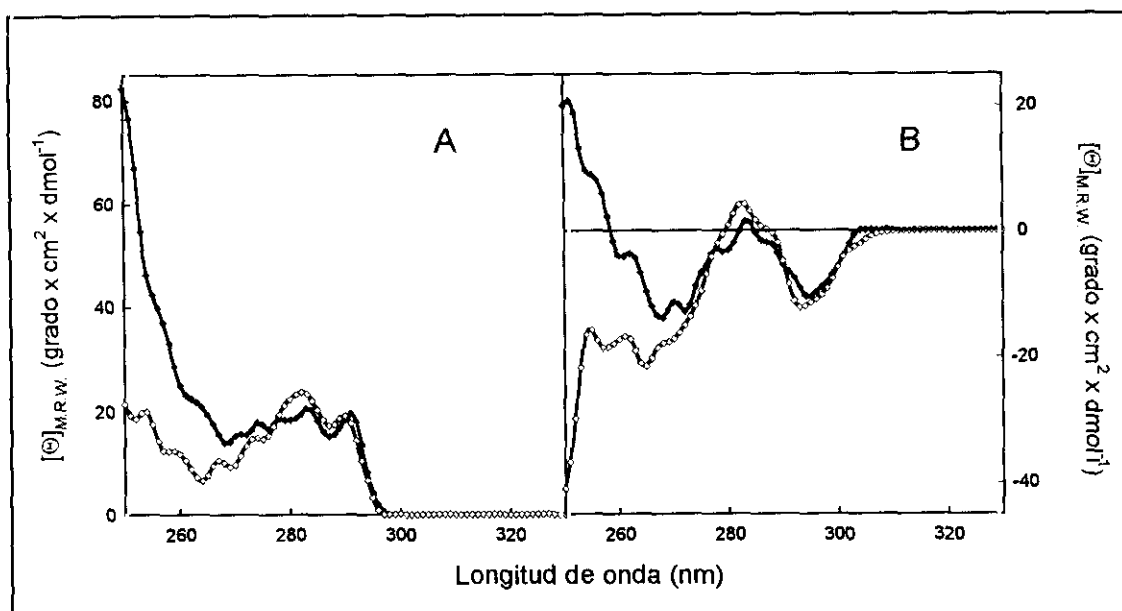


Figura 40. Contribuciones de los residuos de Trp40 (A) y Trp126 (B) al espectro de dicroísmo circular en el UV próximo de la proteína FIV-rp24. Estas contribuciones se han calculado restando al espectro de la proteína salvaje el espectro del mutante sencillo correspondiente (♦) o restando el espectro del otro mutante el correspondiente al doble mutante (◇).

A partir de las contribuciones individuales de los dos residuos de triptófano de la Figura 40 y la contribución de las Tyr que proporciona el espectro del doble mutante, se puede recomponer el espectro de la proteína salvaje (Figura 41). Como se puede observar, esta composición exhibe todas las características del espectro de la proteína salvaje, Independientemente de los espectros utilizados para recomponer el original, exceptuando en la zona entre los 250 y 265 nm, donde hay mayores diferencias en el resto del espectro, la coincidencia es prácticamente total. La no coincidencia en la zona de los 250-265 nm es debida a la alta contribución del enlace peptídico a los valores de elipticidad en esta zona del espectro; de manera que pequeñas variaciones en la determinación de la concentración de proteína se traducen en diferencias significativas entre los diferentes espectros. El hecho de que coincida el espectro experimental con los teóricos indica que no hay cambios conformacionales debido a las mutaciones introducidas, o más concretamente, que no ha habido distorsiones estructurales en los entornos de los residuos de triptófano como consecuencia de las mutaciones.

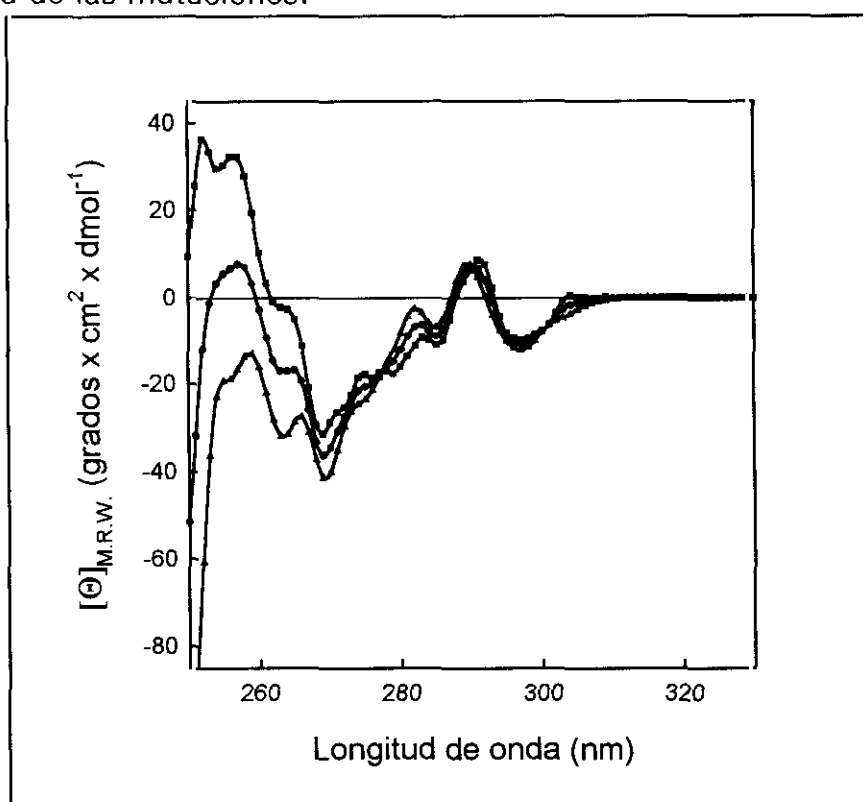


Figura 41. Espectro de CD en el UV próximo obtenido como la suma de las contribuciones de los triptófanos y de las tirosinas. Se compara el espectro experimental de FIV-rp24 (●) con los obtenidos a partir de la suma del espectro del doble mutante con los de los Trp obtenidos como diferencia entre el espectro de la proteína salvaje y el mutante correspondiente (■) o como diferencia entre el espectro del otro mutante y el doble mutante (▲).

ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

Como se ha comentado anteriormente, mediante esta técnica espectroscópica es posible estudiar el entorno tridimensional de los residuos aromáticos de una proteína. Generalmente, la mayor contribución al espectro de emisión de una proteína procede de los residuos de triptófano, debido a la mayor facilidad para la desactivación colisional o por transferencia de energía de los residuos de tirosina. Sin embargo, también los residuos de triptófano pueden estar afectados por procesos de apagamiento local o de transferencia. Así, la fluorescencia de un residuo de triptófano puede ser desactivada por distintas cadenas laterales, como los grupos sulfhidrilo libres y los puentes disulfuro (Hennecke *et al.*, 1997) o los grupos carboxilo, histidina, metionina, etc (Loewenthal *et al.*, 1991). Por otro lado, los procesos de transferencia de energía de un triptófano a otro en una proteína pueden hacer que la fluorescencia del triptófano donador desaparezca (Wu y Brand, 1994). Por ello, es difícil predecir la propiedades de fluorescencia de una proteína cuando contiene más de un residuo de triptófano, incluso cuando la estructura de la proteína es conocida o cuando se poseen los espectros de fluorescencia de mutantes sencillos de triptófano. En la Figura 42 se representan los espectros de fluorescencia, medidos con una longitud de onda de excitación de 275 y 295 nm, de la proteína FIV-rp24 salvaje, de los mutantes sencillos y del doble mutante. El espectro de emisión de la proteína salvaje al excitar a 275 nm presenta un único máximo a 321 nm, lo que indica que la fluorescencia está dominada por los residuos de triptófano y que éstos ocupan una localización bastante hidrofóbica. Como a esta longitud de onda contribuyen tanto los residuos de tirosina como los de triptófano, para aislar la fluorescencia de los de Trp se emplea una longitud de onda mayor, 295 nm. Como se observa (Fig. 42-A), el espectro de la proteína salvaje sigue presentando un máximo centrado a, prácticamente, la misma longitud de onda, 323 nm. El pequeño desplazamiento, desde 321 a 323 nm, puede ser debido a la ausencia de fluorescencia de tirosina, que tiene un máximo de emisión a 300 nm, en el espectro a 295 nm. A partir de estos espectros, y mediante la diferencia entre ambos, se calcula la contribución de los siete residuos de tirosina, que en el máximo de emisión resulta ser alrededor del 40%. Claramente, la contribución promedio de cada Tyr, 6%, es considerablemente menor que la de cada Trp, 31%.

A partir de los espectros de los mutantes se puede determinar la contribución de los diferentes residuos aromáticos al espectro de fluorescencia. Cuando se comparan los espectros obtenidos a 275 nm se observa que al pasar de la proteína salvaje (321 nm) al mutante sencillo W40F (320 nm) no hay desplazamiento en la

longitud de onda a la que aparece el máximo de emisión. Sin embargo, en el caso del mutante W126F (303 nm) sí hay un desplazamiento hacia menores longitudes de onda del máximo de emisión, lo que indica una menor contribución de las tirosinas en la proteína mutante. Además, la contribución de los dos triptófanos al espectro es diferente ya que la intensidad a 321 nm del mutante W40F representa el 70% del valor de la proteína salvaje mientras que la del mutante W126F sólo representa el 50%. En el caso del doble mutante, que carece de residuos de triptófano, el espectro representa la contribución de los residuos de Tyr, apareciendo el máximo de emisión a una longitud de onda característica de un espectro de tirosina, alrededor de los 300 nm. En ninguno de los espectros de los dos mutantes sencillos se observa un pico o un hombro a esta longitud de onda de una intensidad similar a la del doble mutante, lo que indica que puede existir una transferencia de energía de radiación desde los residuos de Tyr a los de Trp, más acentuada en el caso de la proteína salvaje y del mutante W40F que en el del mutante W126F, donde el máximo de emisión aparece a 305 nm.

La contribución de los residuos de tirosina al espectro se determina como la diferencia entre los espectros obtenidos al excitar a 275 nm y 295 nm, estando este último normalizado a partir de los 390 nm, longitud de onda a la que sólo emiten los residuos de Trp. En la Figura 42 se representa también la contribución de las tirosinas al espectro. Tanto para la proteína salvaje como para el mutante W40F, el valor de la intensidad de fluorescencia a 305 nm, cercano al máximo de 300 nm característico de la Tyr, es el 40% de la intensidad en el máximo del espectro obtenido al excitar a 275 nm. Sin embargo, en el caso del mutante W126F dicho valor aumenta hasta un 75%. Estas diferencias pueden reflejar, como se ha indicado anteriormente, la existencia de transferencia de energía de Tyr a Trp que será considerablemente mayor desde las Tyr al Trp126 que el Trp40. Sin embargo, también podría ocurrir que la disminución de la fluorescencia de las Tyr en la proteína salvaje o en los mutantes sencillos respecto del doble mutante reflejase una menor desactivación colisional en los primeros. Esto significaría la existencia de diferentes entornos en las diferentes proteínas, consecuencia de cambios conformacionales ocurridos al mutar los residuos de triptófano, aunque, como se indicara más adelante, esta posibilidad es más improbable.

La diferente contribución de los dos residuos de Trp al espectro de fluorescencia se pone claramente de manifiesto cuando se comparan los espectros obtenidos al excitar a 295 nm. En lo que a la longitud del máximo de emisión respecta, se observa que al pasar de la proteína salvaje (322 nm) a los mutantes

sencillos (321 nm) no hay desplazamiento del máximo de emisión, lo que indica que los residuos de triptófano que permanecen tras la mutación se encuentran en un entorno hidrofóbico similar al que tenían en la proteína salvaje. Sí hay en cambio, diferencias en la intensidad de fluorescencia; los mutantes sencillos presentan una menor intensidad de fluorescencia con respecto a la proteína salvaje, como es natural, ya que poseen un solo residuo de Trp. Esta diferencia de intensidad se acentúa en el caso del mutante W126F con respecto a la del otro mutante sencillo, W40F. La intensidad de fluorescencia del mutante W40f en el máximo es el 68% del valor de la proteína salvaje mientras que la del mutante W126F es el 63%. Por tanto, la contribución del Trp126 al espectro es el doble que la del trp40. Como se trata de intensidad al excitar a 295 nm, la diferencia entre ambos triptófanos debe reflejar una diferente desactivación colisional mayor en el caso del Trp40 que en el Trp126. En el caso del doble mutante no debería observarse fluorescencia al excitar a 295 nm puesto que esta proteína no tiene triptófanos; sin embargo, la intensidad a 321 nm es un 7% del valor de la proteína salvaje. Esta fluorescencia podría ser debida a los residuos de tirosina que, como indica el espectro de absorción del doble mutante (Fig. 38), absorben a 295 nm. Sin embargo, si fuese fluorescencia de Tyr, el espectro a 295 nm normalizado debería coincidir con el de 275 nm, cosa que no ocurre. Otra posibilidad es que esa fluorescencia sea debida a tirosinato, como se ha descrito en otras proteína (Szabo *et al.*, 1994). Aunque el valor de pKa de Tyr en el estado fundamental es de 10.3, en el estado excitado dicho valor es 4 o menos; por ello, puede ocurrir una ionización favorecida por la presencia de grupos aceptores próximos si bien, el tirosinato posee un máximo a 345 nm y en este caso hay un máximo poco definido entre 320 y 330 nm.

A partir de las contribuciones individuales de los Trp a 295 nm se puede reconstruir el espectro de la proteína salvaje (Fig. 43). Como el doble mutante posee una cierta intensidad de fluorescencia, es posible que ésta también se manifieste en los dos mutantes sencillos. Por ello, a los espectros de los mutantes individuales se ha restado la intensidad residual del doble mutante y, a la hora de reconstruir el espectro de la proteína salvaje, se ha sumado a las contribuciones de los triptófanos el espectro del doble mutante. Como se puede observar el espectro de la proteína salvaje coincide bastante bien con el espectro suma. La intensidad de fluorescencia del último es el 95% del de la proteína salvaje, pudiendo reflejar el 5% restante errores en la determinación de la concentración de proteína de las diferentes muestras utilizadas. El hecho de que el espectro combinado sea muy similar al de la proteína salvaje indica que los residuos de triptófano en los mutantes están en un entorno tridimensional muy parecido al que ocupan en la proteína salvaje. Por tanto, parece

claro que no hay cambios conformacionales como consecuencia de las mutaciones introducidas, al menos, cambios que tengan un reflejo en los espectros de fluorescencia y, como se ha indicado anteriormente, de dicroísmo circular.

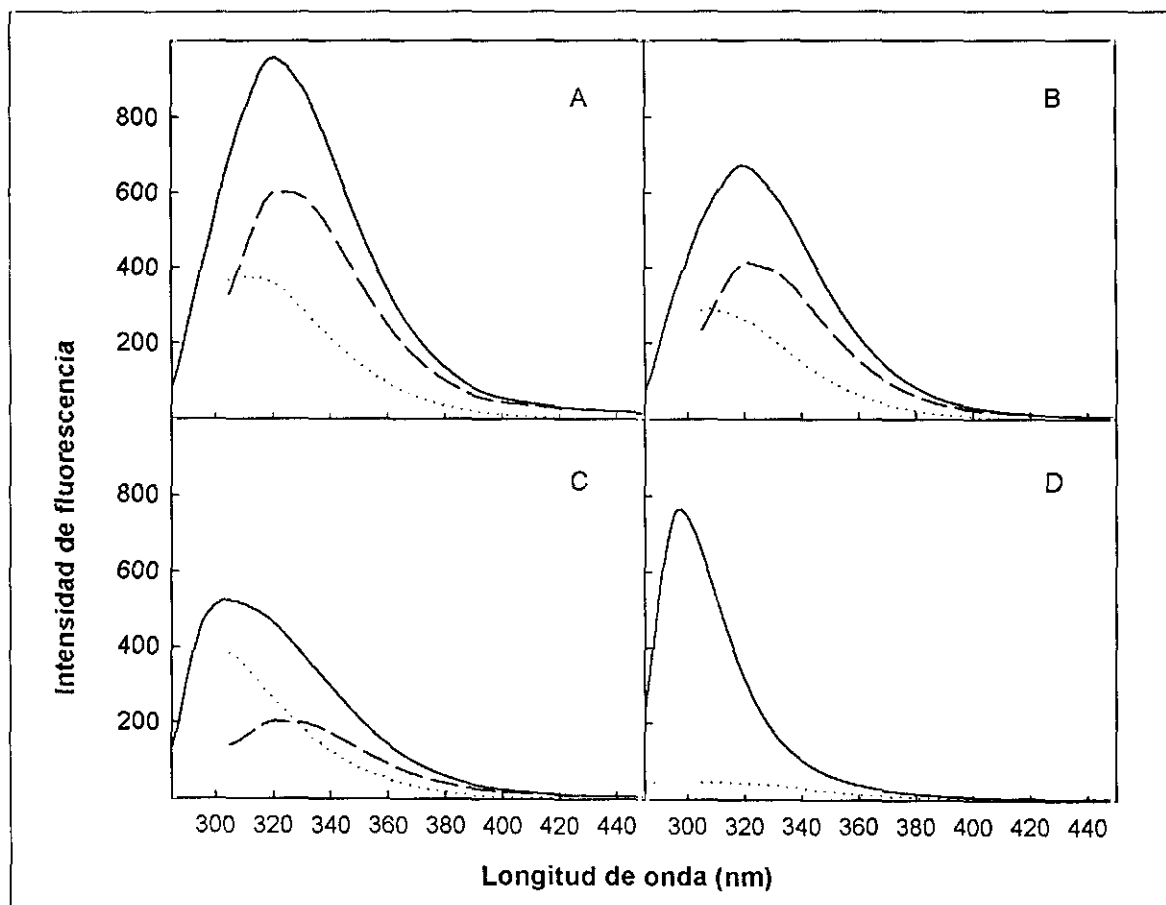


Figura 42. Espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas FIV-rp24 salvaje (A), W40F (B), W126F (C) y W40/126F (D). Espectros de emisión obtenidos con una longitud de onda de excitación de 275 nm (—) y 295 nm (---); contribución de los residuos de tirosina al espectro de emisión de la proteína (· · · · ·). Los espectros a 295 nm se encuentran normalizados. La contribución de tirosinas se calcula como la resta de los dos espectros anteriores.

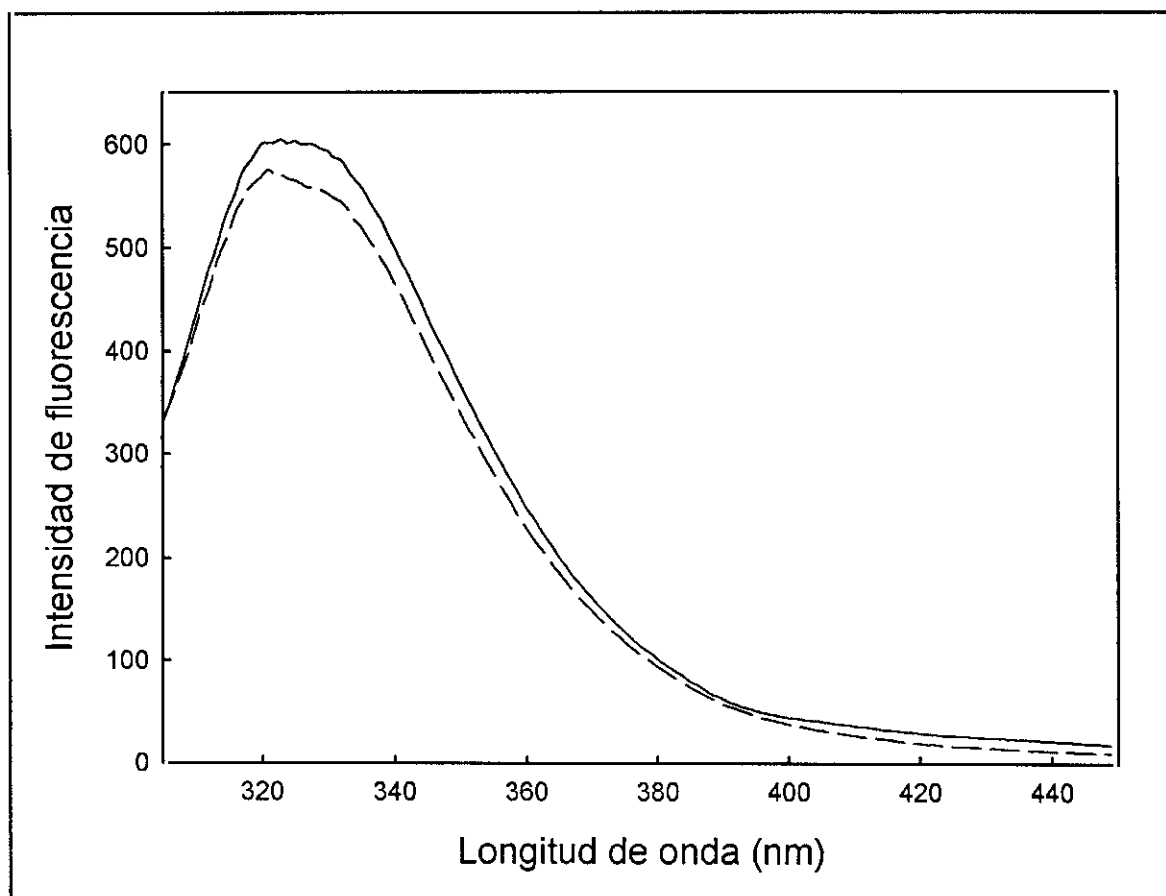


Figura 43. Espectro de fluorescencia obtenido como suma de las contribuciones individuales de los triptófanos medido con una longitud de onda de excitación de 295 nm. A los espectro de emisión se ha restado el espectro del doble mutante. Suma de los espectros de emisión excitando a 295 nm de los mutantes W40F, W126F y W40/126F (- - -); espectro de la proteína FIV-rp24 salvaje (—).

ESTABILIDAD TÉRMICA

Mediante la técnica de dicroísmo circular se obtuvieron las curvas de desnaturalización térmica de las proteínas salvaje y mutantes, midiendo la señal de dicroísmo a 208 nm al aumentar la temperatura de forma continua. Estas curvas se encuentran representadas en la Figura 44. En primer lugar, lo que se observa es que el proceso de desnaturalización es cooperativo en las cuatro proteínas. Sin embargo, la temperatura de transición térmica varía entre las diferentes proteínas. En el caso de la proteína salvaje y el mutante W40F se obtiene parecido valor de T_m (64 °C para

la proteína salvaje y 61 °C para el mutante W40F), mientras que esta temperatura es algo menor en el caso del mutante W126F (53 °C) y el doble mutante (54°C). Por lo tanto, parece que la mutación del Trp126 sí parece afectar algo a la estabilidad térmica de la proteína y esta inestabilidad se sigue manteniendo para el doble mutante.

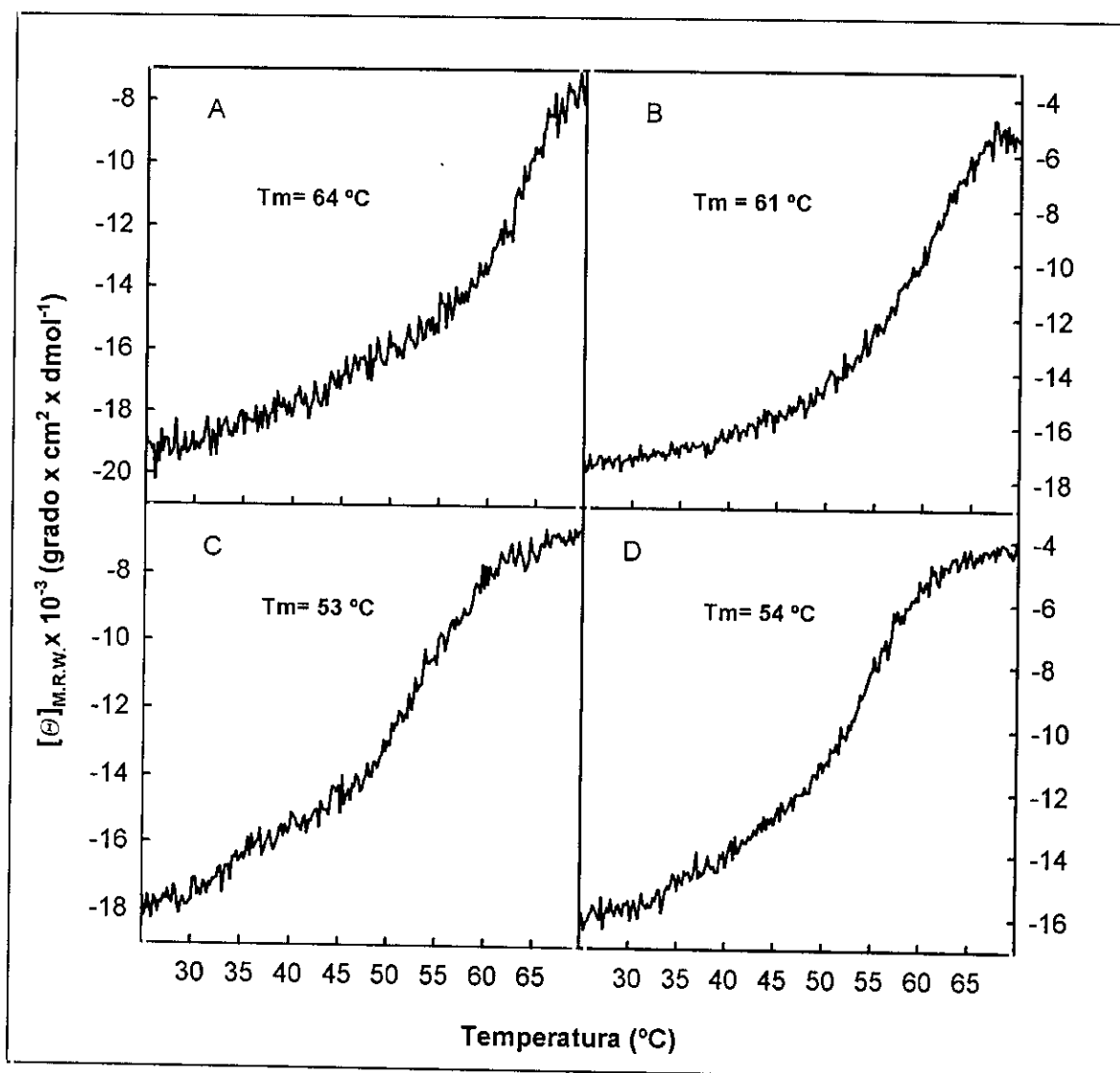


Figura 44. Curvas de desnaturalización térmica de las proteínas FIV-rp24, W40F, W126F y W40/126F. La temperatura se incrementó a una velocidad de 30 °C/hora. La concentración de la proteína empleada estuvo entre 0.1-0.2 mg/ml y todas ellas se encuentran en un tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.0.

Ya que la estructura tridimensional de la proteína p24 de HIV-1 es conocida, y hay una gran homología de secuencia entre esta proteína y p24 de FIV, podemos hacer una comparación entre ambas y observar qué posiciones ocuparían los residuos de triptófano de p24 de FIV en la estructura de p24 de HIV-1. Uno de los residuos, el que se encuentra en la posición 126 en la secuencia de p24 de FIV, se encuentra conservado en la secuencia de p26 de EIAV y hay un residuo de triptófano muy próximo en la secuencia de p24 de HIV. Ambos residuos se encuentran en dos hélices alfa, las denominadas B y G, que aparecen en el extremo amino-terminal de p24 de HIV-1 (Momany *et al.*, 1996). Estas dos hélices junto con otras tres hélices alfa más (A, C, y D) forman una estructura superenrollada (*coiled coil*). Las secuencias de aminoácidos de las hélices tienden a una repetición en heptadas (a, b, c, d, e, f, g) presentes en las secuencias de estructuras superenrolladas (Cohen y Parry, 1990). En la estructura de la proteína p24 de HIV, las posiciones a, d y e tienen tendencia a estar ocupadas por aminoácidos hidrofóbicos, mientras que las posiciones b, c, f y g son más hidrofílicas y se encuentran en el exterior de la estructura. Una vista desde el interior de la proteína de la cápsida de HIV-1 de la estructura superenrollada aparece en la Figura 45 (Momany *et al.*, 1996). En esta figura se han sustituido los aminoácidos de la proteína p24 de HIV-1 por los correspondientes de la proteína p24 de FIV. Según el alineamiento de secuencia de esta proteína con la proteína p24 de FIV, el Trp40 ocuparía la posición g en la heptada de la hélice B, mientras que el Trp126 estaría en la posición g de la hélice G.

A la vista de la Figura 45, puede observarse que el triptófano 126 se encuentra en un entorno más hidrofílico que el triptófano 40. En el espectro de dicroísmo que correspondía a la contribución del Trp126 al espectro de dicroísmo de la proteína salvaje, había una banda a que sufría un desplazamiento hacia el azul, que indicaba que este residuo podría encontrarse en un entorno más hidrofílico que el Trp40. Este resultado coincide con lo comentado anteriormente en relación a la posición que ocupa este triptófano en la estructura de p24 de HIV-1.

Una de las diferencias entre el mutante sencillo W40F y el mutante W126F es la diferente contribución de los residuos de tirosina al espectro de emisión de la proteína excitando a 275 nm. Esta contribución resultó ser menor en el caso de W40F, mientras que al mutar el Trp126 por fenilalanina aumentaba la emisión de los residuos de tirosina. Según la Figura 45, en la hélice G hay un residuo de tirosina en la posición d de la heptada. Este residuo se encuentra justo al lado del Trp126 en la secuencia, mientras que en la estructura tridimensional está algo más alejada. Sin embargo, puede que estén lo suficientemente cerca como para que haya un proceso

de transferencia de energía de la tirosina al triptófano. Por ello, al mutar el Trp126 desaparece este proceso de transferencia y la tirosina es capaz de emitir, aumentando así su contribución al espectro de emisión de la proteína.

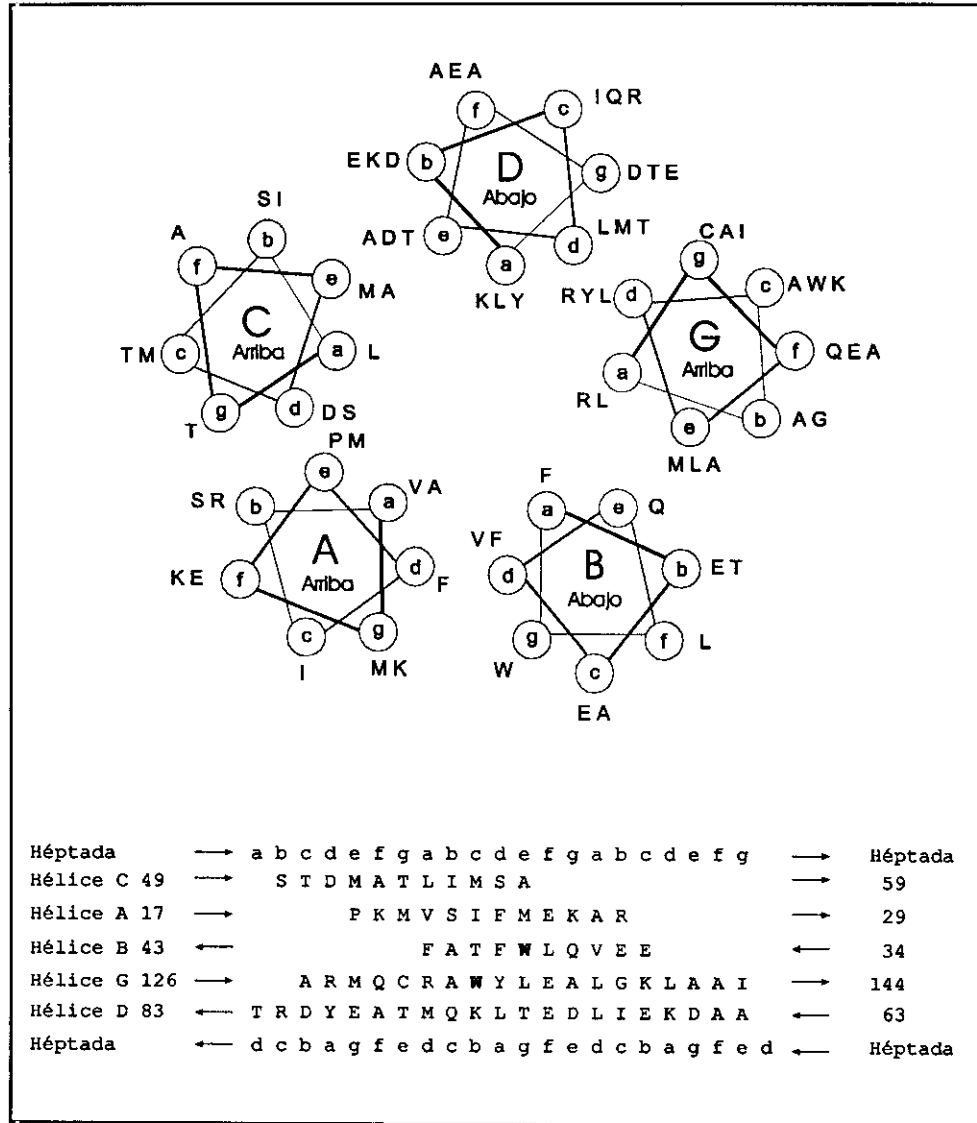


Figura 45. (A) Estructura superenrollada de la proteína de la cápsida de FIV compuesta por las hélices A, B, C, D y G vista desde el interior de la cápsida viral. 'Abajo' significa que el extremo carboxilo-terminal de la hélice es lo que está más alejado de la vista, mientras que 'arriba' implica que los extremos amino-terminales de las hélices se encuentran enfrentados a la vista y están en el interior del núcleo central. Las héptadas a, b, c, d, e, f y g a lo largo de las hélices se muestran con sus aminoácidos en código de una letra. En negrita están señalados los dos residuos de triptófano de la proteína p24 de FIV. (B) Alineamiento de las héptadas a lo largo de las cinco hélices que forman la estructura superenrollada del extremo amino-terminal de la proteína p24 de FIV. Las héptadas [a, b, c, d, e, f, g] se muestran en la línea superior para las hélices que van desde el exterior hacia el interior de la cápsida y en la línea de abajo para las hélices que van desde el interior hacia el interior. Los números de la secuencia corresponden al primero y último residuo de cada hélice. (Momány *et al.*, 1996)

2.C. ESTUDIOS DE DESNATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA FIV-rp24. MECANISMO DE PLEGAMIENTO

El mecanismo mediante el cual las proteínas se pliegan hasta alcanzar su conformación nativa desde una forma totalmente desorganizada es uno de los problemas fundamentales en la biología molecular que aún está sin resolver. El resolver el problema del plegamiento de las proteínas implica conocer como se alcanza la estructura tridimensional partiendo de la estructura totalmente desplegada. La mayoría de las proteínas purificadas pueden replegarse espontáneamente *in vitro* después de haber sido completamente desnaturizadas, de tal forma que la estructura tridimensional de una proteína debe estar determinada por su estructura primaria (Creighton, 1990). Para resolver este problema, se han hecho muchos intentos dirigidos a comprender cuáles son los principios que gobiernan las interacciones entre los aminoácidos que llevan a la formación de la estructura secundaria y terciaria de una proteína. Estos intentos han sido tanto teóricos (Thomas, 1992; Bryngelson *et al.*, 1995; Dill *et al.*, 1995; Hao y Scheraga, 1995), como experimentales (Kim y Baldwin, 1990; Matthews, 1993; Fersht, 1993; Baldwin, 1995; Creighton *et al.*, 1996). Sin embargo, el proceso a nivel molecular no está ni mucho menos resuelto.

Como se ha comentado anteriormente, los aminoácidos aromáticos se han utilizado a menudo como sondas intrínsecas de las proteínas para seguir su desnaturización, renaturalización y su estabilidad. La elección de la proteína p24 de FIV para llevar a cabo el estudio de su mecanismo de plegamiento se debe a que en su secuencia posee dos residuos de triptófano. El resto de proteínas de las cápsidas lentivirales también poseen residuos de triptófano en su secuencia: la proteína p26 de EIAV tiene tres y la proteína p24 de HIV-1 posee hasta cuatro triptófanos. Sin embargo, para reducir el número de proteínas mutantes en construir y estudiar se eligió p24 de FIV. El cambio introducido para crear las proteínas mutantes es el de los residuos de triptófano por fenilalanina. Se ha elegido este residuo debido a que emite muy poca fluorescencia en relación a la tirosina y el triptófano, debido a su menor rendimiento cuántico. Así mismo, en estudios de varias proteínas se ha observado que las sustituciones de Trp por Phe son bien toleradas por las proteínas que siguen manteniendo su conformación (Rule *et al.*, 1987; Loewenthal *et al.*, 1991; Locke *et al.*, 1992).

En este caso se ha intentado estudiar este mecanismo a partir de las curvas de desnaturización de la proteína FIV-rp24 y sus formas mutantes. A partir de dichas curvas puede estimarse la estabilidad de la proteína, es decir, cuál es la disminución de la energía libre de Gibbs de una cadena polipeptídica sin estructura cuando se pliega para formar la molécula de proteína en agua (Gupta *et al.*, 1996). También estas curvas son muy útiles para ver la diferencia en estabilidad de proteínas que difieren muy poco en su estructura química debido a diferencias en la secuencia de aminoácidos o a alteraciones resultantes de modificaciones químicas, como ocurre con la proteínas mutantes. Por último, las curvas de desnaturización pueden informarnos acerca del mecanismo mediante el cual la proteína alcanza su estructura tridimensional. Por ejemplo, si el proceso de desnaturización transcurre a través de

estados intermedios o se produce en un solo paso. El agente desnaturizante elegido ha sido la urea. La urea, junto con el cloruro de guanidinio, es uno de los agentes desnaturizantes más fuertes. La incubación de una proteína con urea o cloruro de guanidinio la conduce a una completa desnaturización (Miller *et al.*, 1967; Tanford, 1968; Flory, 1969) adoptando las propiedades de una estructura desordenada (*random coil*). No ocurre así con la desnaturización de la proteína con cambios extremos de pH o por variación de la temperatura (Dobson *et al.*, 1984; Howarth y Lian, 1984; Griko *et al.*, 1988; Privalov *et al.*, 1989).

Las técnicas empleadas en el estudio de la desnaturización de FIV-rp24 son el dicroísmo circular y la fluorescencia. En el caso del dicroísmo, se ha medido la elipticidad de la proteína a 220 nm a diferentes concentraciones de urea, mientras que por fluorescencia se ha medido el desplazamiento de la longitud de onda del máximo de emisión al ir aumentando la concentración de urea. Para obtener estas curvas, la proteína se incubó en presencia de urea durante 16 horas a 4 °C para asegurarnos que la reacción de desnaturización alcanzaba el equilibrio. El intervalo de concentraciones en el que se ha llevado a cabo los estudios de desnaturización varía entre 0 y 8 M urea. Entre estas dos concentraciones se produce la total desnaturización de la proteína. Cuando la proteína se ha incubado con urea 8 M presenta un espectro de dicroísmo característico de una proteína con una estructura desordenada. Por fluorescencia, el espectro de emisión obtenido de la proteína desnaturizada presenta su máximo de emisión desplazado hacia mayores longitudes de onda, pues sus residuos aromáticos están ahora en un entorno más hidrofílico, en contacto con las moléculas de disolvente. También puede observarse la aparición de un hombro en la zona donde emiten las tirosinas, pues al estar la proteína desnaturizada, su fluorescencia no se ve apagado por los residuos próximos de triptófano.

Una vez que se ha medido el cambio de las propiedades espectroscópicas de las cuatro proteínas en función de la concentración de urea, se pueden manejar los datos para calcular la fracción de proteína desnaturizada, F_{ap} , a cada concentración de urea, empleando la ecuación reseñada en *Métodos Experimentales*.

CURVAS DE DENATURALIZACIÓN OBTENIDAS POR DICROÍSMO CIRCULAR

En la Figura 46-A aparece la representación del valor de elipticidad molar media por residuo a cada concentración de urea para la proteína FIV-rp24 salvaje. Con los valores del parámetro estructural obtenidos se calcula la fracción de proteína desnaturalizada (F_{ap}) que hay a cada concentración de urea, cuya representación nos permite obtener la curva de desnaturalización de la proteínas.

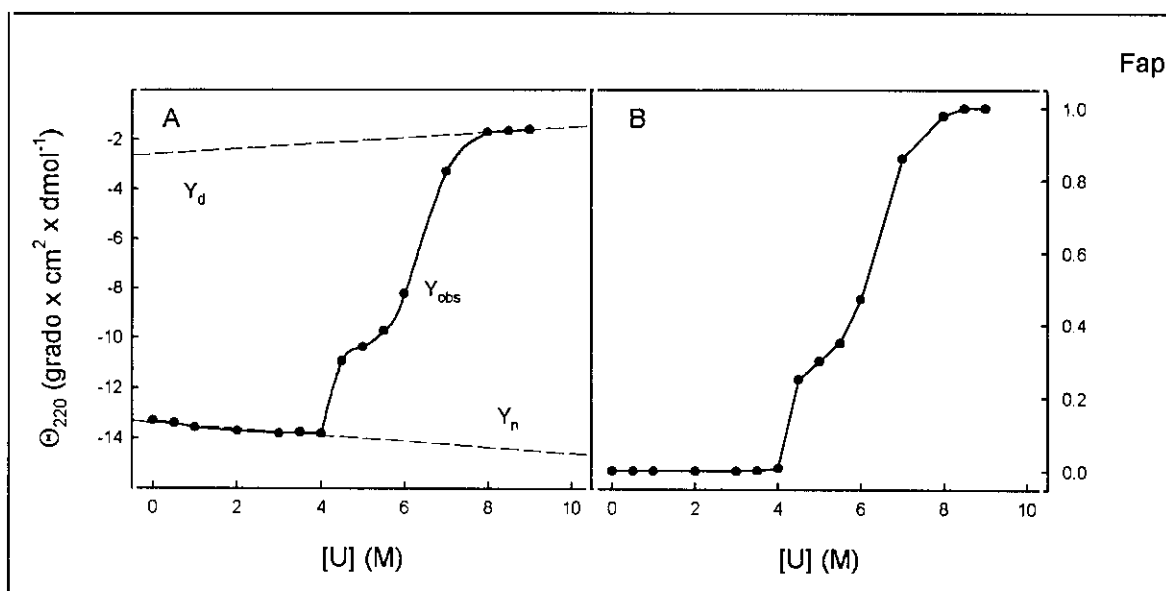


Figura 46. (A) Variación de la elipticidad molar por residuo a 220 nm con la concentración de urea para la proteína FIV-rp24. (B) Representación de la fracción de proteína desnaturalizada (F_{ap}) frente a la concentración de urea para la proteína FIV-rp24. La desnaturalización de la proteína se llevó a cabo incubando disoluciones de proteína con diferentes concentraciones de urea en fosfato sódico 10 mM, TCEP 1 mM, pH 7.0. Las líneas continuas muestran la dependencia de los coeficientes de la proteína nativa y desnaturalizada con la concentración de urea.

Con el resto de las proteínas, los dos mutantes sencillos y el doble mutante puede seguirse el mismo procedimiento. En la Figura 47 aparecen representadas las curvas de desnaturalización de las cuatro proteínas. En primer lugar lo que puede observarse es que en todas las proteínas el proceso de desnaturalización es cooperativo. La aparición de un hombro en las curvas de desnaturalización de la proteína salvaje y los mutantes W40F y W126F, nos permite pensar que el proceso de desnaturalización de estas proteínas no se produce en un sólo paso, sino que parece implicar, aparentemente, al menos un estado intermedio. La amplitud de la primera transición es diferente en las tres proteínas, siendo más acentuada en el caso de la proteína salvaje, mientras que para W126F apenas si se distingue. Así mismo, para una misma proteína, las dos transiciones que se producen no son de igual

amplitud, sino que la primera transición resulta siempre ser de menor amplitud que la segunda. Otra característica importante que reflejan las curvas de desnaturalización de estas proteínas es que la primera transición se produce a una concentración similar, alrededor de 4.0 M de urea, en todas las proteínas. Sin embargo, las mayores variaciones se producen en la segunda transición. Este cambio ocurre en la proteína salvaje y el mutante W40F a una concentración de 6.25 M de urea, mientras que en el mutante W126F y el doble mutante la concentración de urea se reduce a 5.25 M. Es decir, las proteínas presentan una diferente estabilidad frente a la acción del agente desnaturalizante, resultando ser menos estables W126F y W40/126F. Esta variación en la concentración de urea a la cual se desnaturaliza la proteína parece indicar que los residuos de triptófano, Trp40 y Trp126, se encuentran en diferentes zonas de la proteína que no se pliegan de la misma forma.

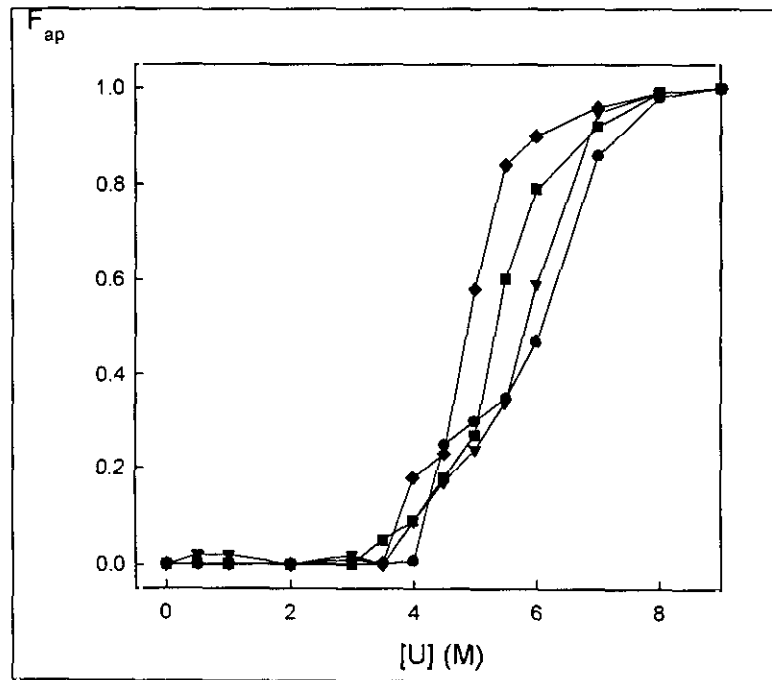


Figura 47. Curvas de desnaturalización de la proteína FIV-rp24 (●) y los mutantes W40F (▼), W126F (■) y W40/126F (◆) obtenidas por dicroísmo circular. El cálculo de la fracción aparente se realizó midiendo la variación de la elipticidad molar media por residuo con la concentración de urea. La desnaturalización de la proteína se llevó a cabo incubando disoluciones de proteína con diferentes concentraciones de urea en fosfato sódico 10 mM, TCEP 1 mM, pH 7.0.

CURVAS DE DESNATURALIZACIÓN OBTENIDAS POR FLUORESCENCIA

Aparentemente, en las curvas de desnaturalización obtenidas por fluorescencia midiendo con una longitud de onda de excitación de 275 (Fig. 48), no se observa la existencia de hombros, exceptuando el caso de la proteína W126F, donde hay un hombro que aparece a altas concentraciones de urea. Lo que sí se puede observar,

como ocurría con las curvas de desnaturalización obtenidas por dicroísmo, es que hay una diferente estabilidad de las proteínas frente a la urea, pues el mutante sencillo W126F y el doble mutante se desnaturalizan a una concentración de urea menor. Esta concentración pasa de alrededor de 6.5 M para la proteína salvaje y W40F, a 5.8 M para W126F y 4.5 M para el doble mutante. Si se comparan estas concentraciones con las concentraciones de urea a las cuales se producía la segunda transición recogida en las curvas por dicroísmo, se observa que resultan ser algo diferentes a las obtenidas en las curvas por fluorescencia. Esta diferencia entre los resultados obtenidos mediante dos técnicas diferentes indican, una vez más, que el proceso de desnaturalización de la proteína p24 y sus formas mutantes transcurre a través de estados intermedios.

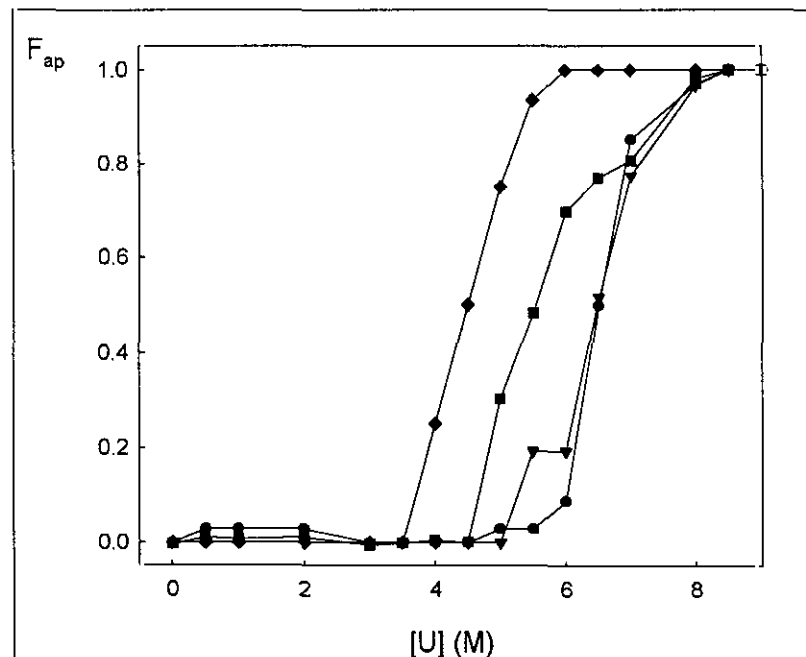


Figura 48. Curvas de desnaturalización de la proteína FIV-rp24 (●) y los mutantes W40F (▼), W16F (■) y W40/126F (◆) obtenidas por fluorescencia. El cálculo de la fracción aparente se realizó midiendo la variación de la longitud de onda del máximo del espectro de emisión medido con una longitud de onda de excitación de 275 nm con la concentración de urea. La desnaturalización de la proteína se llevó a cabo incubando disoluciones de proteína con diferentes concentraciones de urea en fosfato sódico 10 mM, TCEP 1 mM, pH 7.0.

Midiendo la fluorescencia a 295 nm seguir los procesos de desnaturalización de la proteína salvaje y los mutantes sencillos, ya que el doble mutante, al carecer de residuos de triptófano, no emite fluorescencia. En las curvas de desnaturalización de la proteína salvaje y el mutante W126F (Fig. 49) hay unos pequeños hombros que podrían ser indicativos de diferentes transiciones. No ocurre así con el otro mutante sencillo, W40F, que claramente presenta una curva correspondiente a un proceso de desnaturalización en el que hay presentes dos especies.

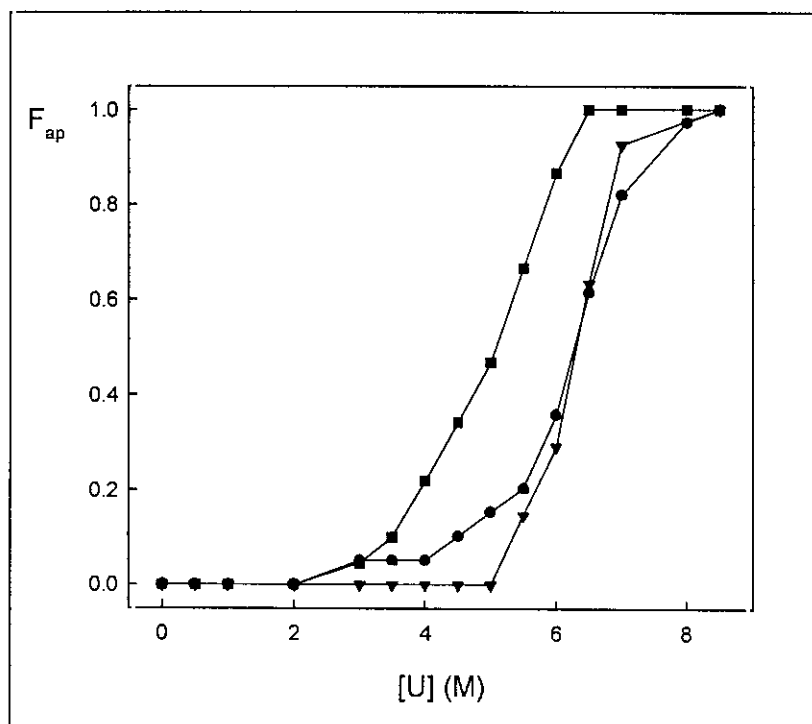


Figura 49. Curvas de desnaturalización de la proteína FIV-rp24 (●) y los mutantes W40F (▼), W126F (■). El cálculo de la fracción aparente se realizó midiendo la variación de la longitud de onda del máximo del espectro de emisión medido con una longitud de onda de excitación de 295 nm con la concentración de urea. La desnaturalización de la proteína se lleva a cabo incubando disoluciones de proteína con diferentes concentraciones de urea en fosfato sódico 10 mM, TCEP 1 mM, pH 7.0.

ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE DESNATURALIZACIÓN

Hay varios modelos para analizar las curvas de desnaturalización por agentes desnaturalizantes como el cloruro de guanidinio o la urea y obtener información termodinámica a partir de ellas, como puede ser la variación de la energía libre del proceso. La obtención de esta información termodinámica siempre es posible si el proceso de desnaturalización de las proteínas es un proceso reversible. Así ocurre con la proteína FIV-rp24 salvaje y las proteínas mutantes, pues cuando la concentración de urea de una disolución de proteína en presencia de urea 8 M se diluye a la mitad, la proteína recupera las propiedades espectroscópicas de dicroísmo y de fluorescencia que tenía a esa concentración de urea.

Los modelos que se han empleado para analizar las curvas de desnaturalización de FIV-rp24 salvaje y las proteínas mutantes son el modelo de la extrapolación lineal (Pace, 1986) y el modelo de unión del agente desnaturalizante (Tanford, 1970), que se describieren a continuación.

A. MODELO DE EXTRAPOLACIÓN LINEAL

Considerando un modelo de dos estados, en el que únicamente están presentes dos especies en el equilibrio, nativa y desnaturalizada, se puede calcular la variación de energía libre para cada concentración de urea mediante la ecuación:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_{ap}$$

donde:

- R es la constante de los gases, cuyo valor es 1.987 cal·mol⁻¹
- T es la temperatura en K, 298 K en todos los casos
- K_{ap} es la constante del proceso de desnaturalización a cada concentración de urea.

El método de extrapolación lineal (Pace, 1986) se asume que hay una dependencia lineal de ΔG con la concentración de urea en la zona de la transición. Ajustando los datos a la ecuación [5], que aparece en Métodos Experimentales, y extrapolando a concentración de urea cero se puede estimar el valor de ΔG_{H_2O} , la variación de energía libre en ausencia del agente desnaturalizante.

En la Tabla XIV aparecen los valores de ΔG_{H_2O} obtenidos mediante el ajuste lineal de los datos de ΔG representados frente a la concentración de urea, junto con los valores de la dependencia con la concentración, m, y la concentración de urea a la que la hay un 50% de proteína desnaturalizada. Estos valores se comparan para las dos técnicas empleadas para seguir la desnaturalización de FIV-rp24 y las proteínas mutantes.

	ΔG_{H_2O} (kcal·mol ⁻¹)			m (kcal·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)			$C_{1/2}$ (M)		
	CD	F ₂₇₅	F ₂₉₅	CD	F ₂₇₅	F ₂₉₅	CD	F ₂₇₅	F ₂₉₅
FIV-rp24	6.3	11.2	7.6	1.1	1.6	1.1	5.7	7.0	6.9
W40F	4.0	7.9	9.1	0.6	1.2	1.4	6.3	6.6	6.5
W126F	5.3	10.6	3.6	1.0	1.8	0.6	5.4	5.9	6.0
W40/126F	4.5	6.6		0.9	1.5		4.9	4.4	

Tabla XIV. Parámetros obtenidos mediante la aplicación del método de extrapolación lineal (Pace, 1986). Los puntos empleados en el ajuste corresponden a los de la zona de transición de la proteína nativa a la desnaturalizada.

CD: se mide la variación de la señal de elipticidad a 220 nm en función de la concentración de urea.

F₂₇₅: se mide la variación de la longitud de onda del máximo del espectro, medido con una longitud de onda de excitación de 275 nm, con la concentración de urea.

F₂₉₅: se mide la variación de la longitud de onda del máximo del espectro, medido con una longitud de onda de excitación de 295 nm, con la concentración de urea.

En el caso de la proteína FIV-rp24 se obtienen valores parecidos de ΔG_{H_2O} y de la dependencia de este parámetro con la concentración de urea, m , exceptuando cuando se mide el desplazamiento de la longitud de onda del máximo del espectro de emisión excitando a 275 nm. En este caso, el valor de ΔG_{H_2O} resulta ser prácticamente el doble. No ocurre así con la concentración de urea a la que la mitad de la proteína se encuentra desnaturalizada, $C_{1/2}$. Este valor es diferente según se siga la desnaturalización mediante dicroísmo circular o fluorescencia, lo que nos indicaría la existencia de especies intermedias en el proceso de desnaturalización. Para el resto de las proteínas ocurre algo parecido, los valores de los parámetros obtenidos mediante este ajuste difieren según sea la técnica empleada. Esta diferencia puede achacarse en parte, primero, al número de puntos utilizados en el ajuste lineal, pues han de emplearse únicamente las concentraciones de urea a la que se produce la transición. Así mismo, en las curvas de desnaturalización puede observarse claramente, que algunas proteínas presentan diferentes transiciones, lo que indicaría que hay estados intermedios. Este modelo supone en todo momento que el estado de equilibrio implica únicamente dos especies, la nativa y la desnaturalizada.

Si comparamos los valores de $C_{1/2}$ de la proteína salvaje y de las proteínas mutantes, observamos la diferente estabilidad de estas proteínas frente a la desnaturalización por urea, tal y como podíamos apreciar en las curvas de desnaturalización. Es decir, el mutante W126F y el doble mutante son menos estables que la proteína salvaje y W40F, pues su $C_{1/2}$ es menor siempre, sea cual sea la técnica de medida. El doble mutante es el que tiene una $C_{1/2}$ más pequeña, es decir, es el que primero se desnaturaliza en presencia de urea.

B. MODELO DE UNIÓN DEL AGENTE DESNATURALIZANTE

En este modelo se asume que durante el proceso de desnaturalización las moléculas del agente desnaturalizante se unen a grupos peptídicos o a una cadena lateral de un aminoácido. Se pueden calcular la transferencia de energía libre desde una disolución acuosa a una disolución de urea o cloruro de guanidinio para un grupo peptídico o para las cadenas laterales de distintos aminoácidos y a partir de ellas las constantes de unión, k (Pace, 1986). Cuando una proteína se desnaturaliza en presencia de urea, la mayoría de los grupos peptídicos están más expuestos al disolvente que las cadenas laterales. Por ello el valor de la constante de unión de la urea a un dipéptido puede representar el valor medio más razonable para utilizarla en

la ecuación [6,7] (Métodos Experimentales) y analizar las curvas de desnaturalización. El valor empleado en todos los análisis de las curvas de desnaturalización de las proteínas ha sido $k=0.1$, que es el valor medio anteriormente mencionado (Pace, 1986).

Para cada curva de desnaturalización de las diferentes proteínas, y para cada técnica, se ha intentado ajustar los datos experimentales a un modelo de dos estados (ecuación [6]) o a un modelo de tres estados (ecuación [7]) y estos ajustes se representan en las Figuras 50, 52 y 53.

En la Figura 50 se representan las curvas de desnaturalización obtenidas mediante la técnica de dicroísmo para la proteína salvaje, los mutantes sencillo y el doble mutante. Junto a los datos experimentales se representan los ajustes de dichos puntos por el modelo de unión de las moléculas del agente desnaturalizante. Este ajuste puede ser según un modelo que implique dos o tres especies en el proceso de desnaturalización.

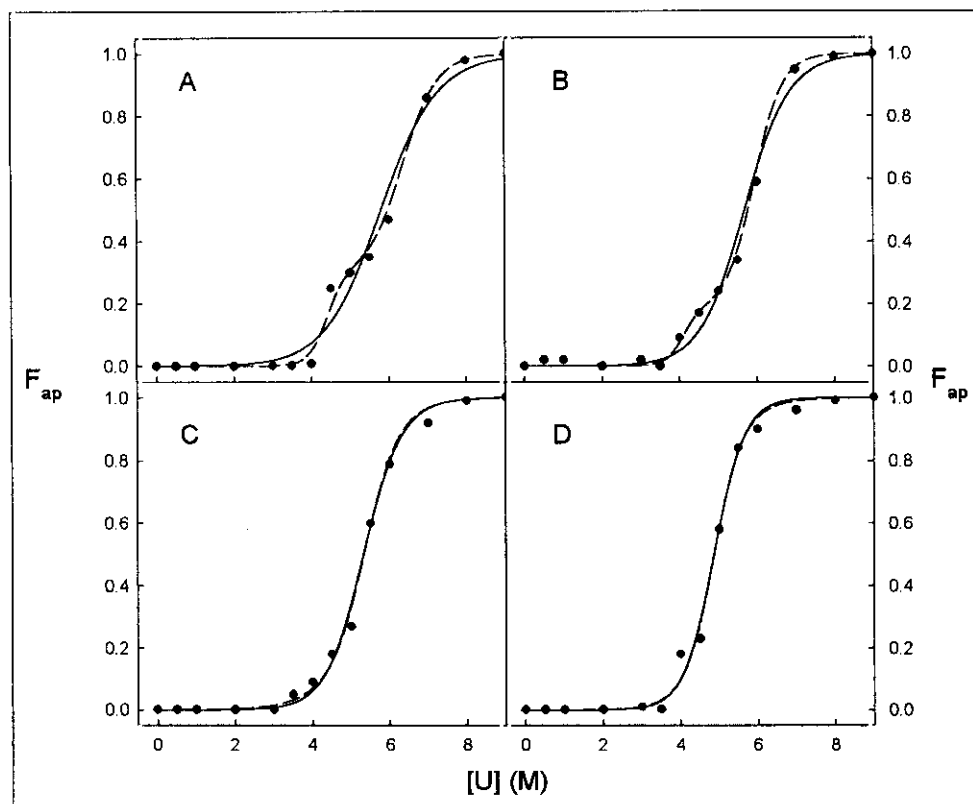


Figura 50. Ajuste de las curvas de desnaturalización de las proteínas FIV-rp24 (A), W40F (B), W126F (C) y W40/126F (D) a un modelo de dos (—) o tres estados (---). Para el doble mutante únicamente se representa el ajuste realizado con el modelo de dos estados porque el correspondiente al modelo de tres estados es prácticamente coincidente. Los parámetros de todos los ajustes se recogen en la Tabla XV.

En dos de las cuatro proteínas claramente el modelo de tres estados ajusta mejor los datos experimentales. Esto ocurre con la proteína salvaje y el mutante sencillo W40F. No ocurre así con el mutante W126F y el doble mutante, donde el ajuste según el modelo de dos estados es prácticamente coincidente con el de tres estados. De estos ajustes se obtienen una serie de parámetros cuyos valores aparecen en la Tabla XV.

	$\Delta G^1_{H_2O}$	$\Delta G^2_{H_2O}$	$\Delta G^T_{H_2O}$		Δn_1		Δn_2	Z
	(kcal·mol ⁻¹)	(kcal·mol ⁻¹)	(kcal·mol ⁻¹)	(kcal·mol ⁻¹)				
	3E	3E	2E	3E	2E*	3E	3E	3E
FIV- rp24	12.2	9.7	5.4	21.9	21.2	61.4	35.4	0.3
W40F	12.2	11.0	6.6	23.2	26.5	65.5	42.4	0.2
W126F	5.0	6.06	7.3	11.0	30.8	20.8	26.1	0.5
W40/126F	7.9	4.1	8.2	11.9	37.5	35.5	17.1	0.9

Tabla XV. Parámetros de ajuste de las curvas de desnaturalización obtenidas por dicroísmo a un modelo de dos (2E) o tres estados (3E). $\Delta G^1_{H_2O}$, variación de energía libre correspondiente a la transición del estado nativo al estado intermedio; $\Delta G^2_{H_2O}$, variación de energía libre correspondiente a la transición del estado intermedio al estado desnaturalizado; Δn_1 , diferencia en el número de sitios de unión para la urea de las conformaciones nativa e intermedia; Δn_2 , diferencia en el número de sitios de unión para la urea de las conformaciones intermedia y desnaturalizada; Z, cambio fraccional de la señal de dicroísmo en la transición del estado nativo al intermedio. (a) diferencia en el número de sitios de unión para la urea para la proteína nativa y desnaturalizada.

Como puede observarse en la columna correspondiente a la variación de energía libre total del proceso de desnaturalización, ésta es siempre mayor en el caso de considerar un modelo de tres estados que en el del modelo de dos estados. Así mismo, para tres de las cuatro proteínas, la primera transición, de la forma nativa a la intermedia, parece estar ligeramente menos favorecida que la segunda transición de la forma intermedia a la desnaturalizada. Únicamente en el caso de W126F, la primera transición está algo más favorecida, pues la variación de energía libre es menor. Si comparamos la estabilidad de la proteína salvaje con la de los mutantes, resulta que tanto la proteína salvaje como el mutante W40F tienen una estabilidad parecida, mientras que el mutante W126F y el doble mutante son menos estables.

Una vez calculadas las constantes de los equilibrios de desnaturalización, en el caso de las proteínas cuyas curvas se ajustan mejor con un modelo de tres

estados, se pueden calcular las fracciones de las formas nativa (f_n), intermedia (f_i) y desnaturalizada (f_d) a diferentes concentraciones de urea. Las ecuaciones empleadas para ello son:

$$\exp[-\Delta G^1/RT] = K_1 = f_i / f_n$$

$$\exp[-\Delta G^2/RT] = K_2 = f_d / f_i$$

$$f_n + f_i + f_d = 1$$

La representación de las fracciones frente a la concentración de urea aparece en la Figura 51 para las proteínas FIV-rp24, W40F, W126F y W40/126F.

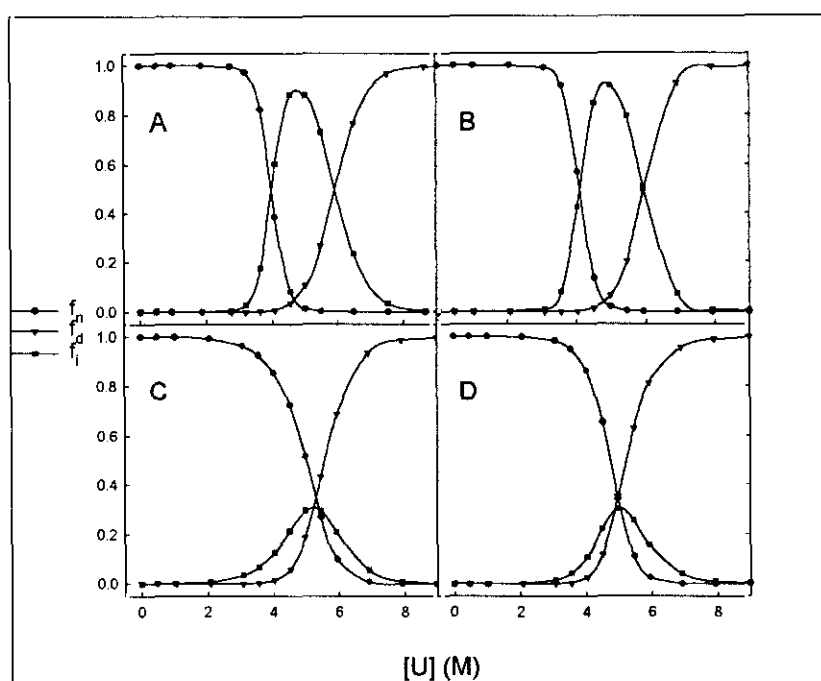


Figura 51. Representación de la fracción de las formas nativa, intermedia y desnaturalizada a cada concentración de urea para las proteínas FIV-rp24, W40F, W126F y W40/126F obtenidas con los parámetros termodinámicos resultantes del ajuste de los datos experimentales de las curvas de desnaturalización a un modelo de tres estados. Forma nativa (\bullet), forma intermedia (\blacksquare) y forma desnaturalizada (\blacktriangledown). Las curvas de desnaturalización se obtuvieron midiendo la variación de la elipticidad molar media por residuo a 220 nm con la concentración de urea.

Como puede observarse en la gráfica correspondiente a la proteína FIV-rp24 salvaje, la forma intermedia es la forma predominante a una concentración de urea 5.2 M, alcanzando un valor F_{ap} igual a 0.9. Si analizamos la curva de desnaturalización de FIV-rp24 (Fig. 50), podemos ver cómo a esta concentración es donde aparece el hombro correspondiente a la primera transición. Así mismo, también

coincide el valor de F_{ap} a esta concentración de urea con el valor del parámetro Z que se obtiene en el ajuste con el modelo de tres estados (Tabla XV). La forma desnaturalizada comienza a aparecer a partir de una concentración ligeramente menor, siendo la forma predominante cuando la concentración es 6.5 M. De la misma forma se pueden analizar los resultados obtenidos con las formas mutantes. En el caso del mutante W40F, claramente hay una presencia de un estado intermedio en el proceso de desnaturalización. Esta forma predomina a una concentración 4.8 M de urea, que es la misma concentración a la que se produce la primera transición. Para el mutante W126F y el doble mutante, los resultados son algo diferentes. A ninguna concentración de urea la forma intermedia es predominante, aunque alcanza su máximo a una concentración 5.3 M, concentración que coincide con la $C_{1/2}$ obtenida en el ajuste mediante el método de extrapolación lineal.

De la misma forma que se hace con las curvas de desnaturalización obtenidas por difracción circular, se pueden ajustar las curvas obtenidas siguiendo el proceso de desnaturalización por fluorescencia excitando a 275 y 295 nm. Los ajustes obtenidos empleando el modelo de dos o el de tres estados aparecen en las Figuras 52 (longitud de onda de excitación de 275 nm) y 53 (longitud de onda de excitación de 295 nm) y los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos a partir de estos ajustes se recogen en la Tabla XV.

En el caso de las curvas de desnaturalización de la Figura 52, sólo en el caso de la proteína FIV-rp24 salvaje y el mutante W126F el ajuste de los datos experimentales se mejora con el modelo de tres estados. Según los datos recogidos en la Tabla XV, las dos transiciones presentan una variación de energía libre muy similar, así como también es muy parecida si comparamos las variaciones de la proteína salvaje con la proteína mutante. Para la proteína W40F y el doble mutante, sólo se representa el ajuste conseguido con el modelo de dos estados, pues el otro es coincidente. El valor de la variación de energía libre total del proceso es muy parecido para todas las proteínas si tenemos únicamente en cuenta el ajuste con el modelo de dos estados.

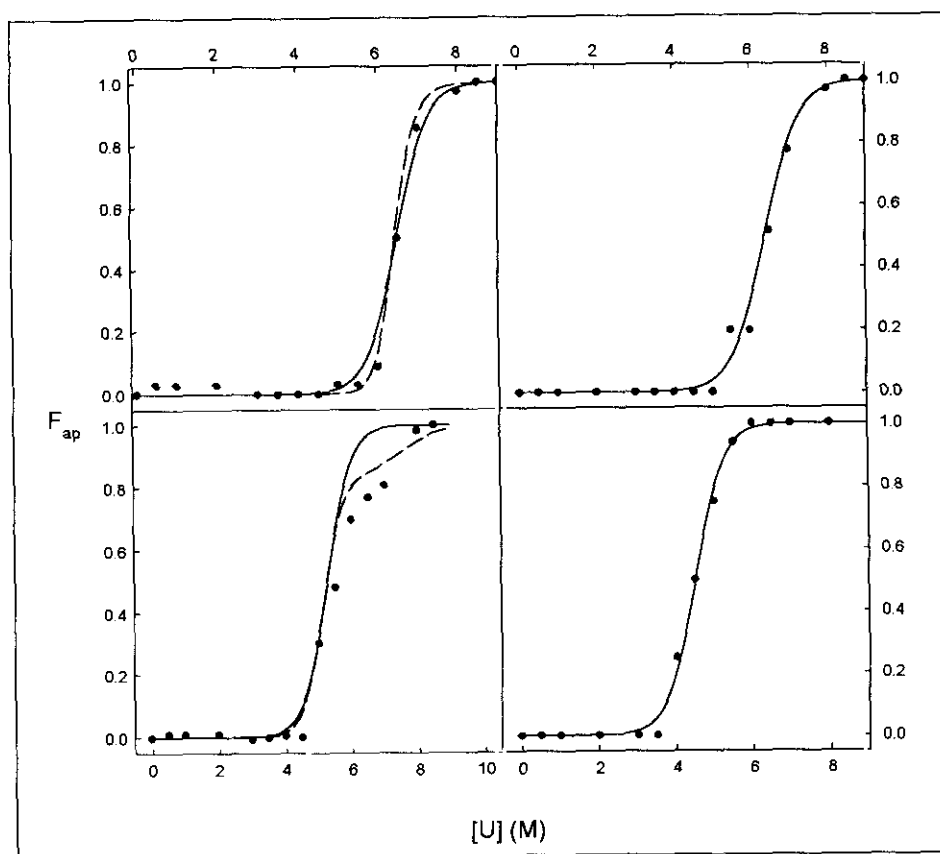


Figura 52. Ajuste de las curvas de desnaturación obtenidas por fluorescencia de las proteínas FIV-rp24 (A), W40F (B), W126F (C) y W40/126F (D) a un modelo de dos (—) o tres estados (---). En el caso del mutante sencillo y el doble mutante únicamente se representa el ajuste realizado con el modelo de dos estados porque el correspondiente al modelo de tres estados es prácticamente coincidente. Los parámetros de todos los ajustes se recogen en la Tabla XV.

La representación de las fracciones de las distintas formas presentes en el proceso de desnaturación coincide con lo que se puede observar a simple vista en la curva de desnaturación de la proteína FIV-rp24 salvaje y el mutante W126F. Para la proteína FIV-rp24, la forma intermedia es muy minoritaria, alcanzando su máximo a una concentración 6.4 M de urea, que coincide con la concentración de urea a la que la mitad de la proteína se encuentra desnaturada ($C_{1/2}$). Sin embargo, en el mutante W126F hay una segunda transición, a concentraciones altas de urea, que no se apreciaba en el caso de las curvas de desnaturación obtenidas por dicróismo, y es donde la forma intermedia es mayoritaria (6.5 M). Esta forma intermedia incluso está presente cuando la concentración de urea es 8 M.

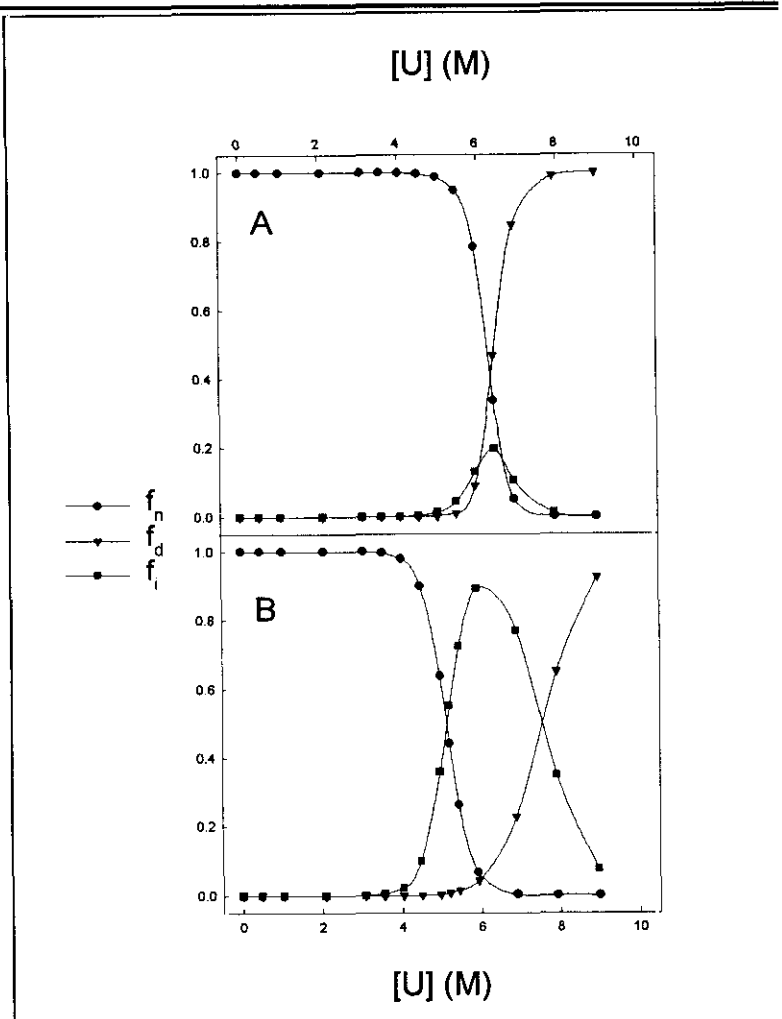


Figura 53. Representación de la fracción de las formas nativa, intermedia y desnaturada a cada concentración de urea para las proteínas FIV-rp24 salvaje y W126F obtenidas con los parámetros termodinámicos resultantes del ajuste de los datos experimentales de las curvas de desnaturación a un modelo de tres estados. (●) forma nativa, (▼) forma intermedia y (■) forma desnaturada. Las curvas de desnaturación se obtuvieron midiendo la variación de la longitud de onda del máximo del espectro de emisión de fluorescencia excitando a 275 nm con la concentración de urea.

Por último, hay que analizar los resultados obtenidos con las curvas de desnaturación de la Figura 54. Como ocurría con el ajuste de las curvas de desnaturación de la Figura 52, sólo en el caso de la proteína FIV-rp24 salvaje y el mutante W126F, el modelo de tres estados ajusta mejor los datos experimentales. Los resultados obtenidos de los ajustes de las tres curvas se recogen en la Tabla XV. Para FIV-rp24 y W126F se hace la representación de las fracciones de las formas nativa, intermedia y desnaturada frente a la concentración de urea que aparecen en la Figura 55.

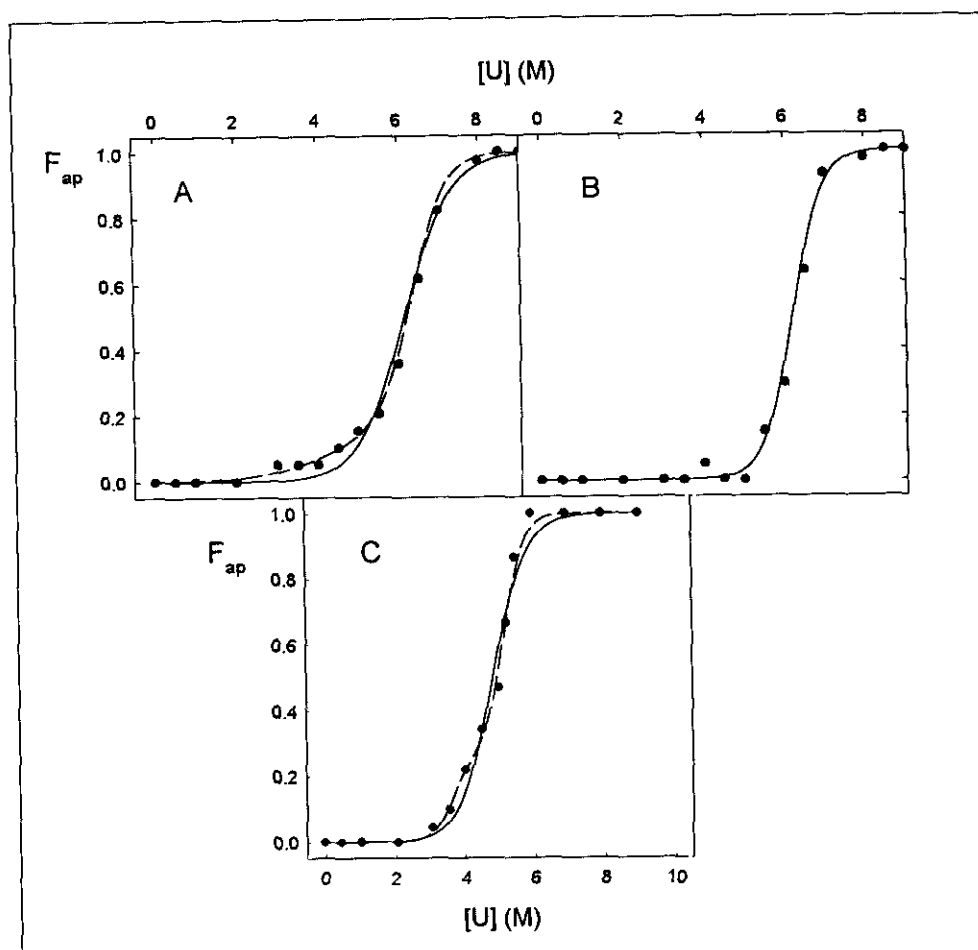


Figura 54. Ajuste de las curvas de desnaturalización obtenidas por fluorescencia de las proteínas FIV-rp24 (A), W40F (B), W126F (C) a un modelo de dos (—) o tres estados (---). En el caso del mutante sencillo y el doble mutante únicamente se representa el ajuste realizado con el modelo de dos estados porque el correspondiente al modelo de tres estados es prácticamente coincidente. Los parámetros de todos los ajustes se recogen en la Tabla XVI.

De nuevo hay una práctica coincidencia entre la concentración a la que la forma intermedia es predominante (5.5 M para la proteína FIV-rp24 y 4.4 M para W126F) con la concentración a la que aparece un hombro en las curvas de desnaturalización (5.2 M para FIV-rp24 y 4.2 M para W126F). En el caso del mutante W40F, la concentración $C_{1/2}$ coincide también con la $C_{1/2}$ obtenida en el ajuste mediante el modelo de extrapolación lineal ($C_{1/2} = 6.4$ M).

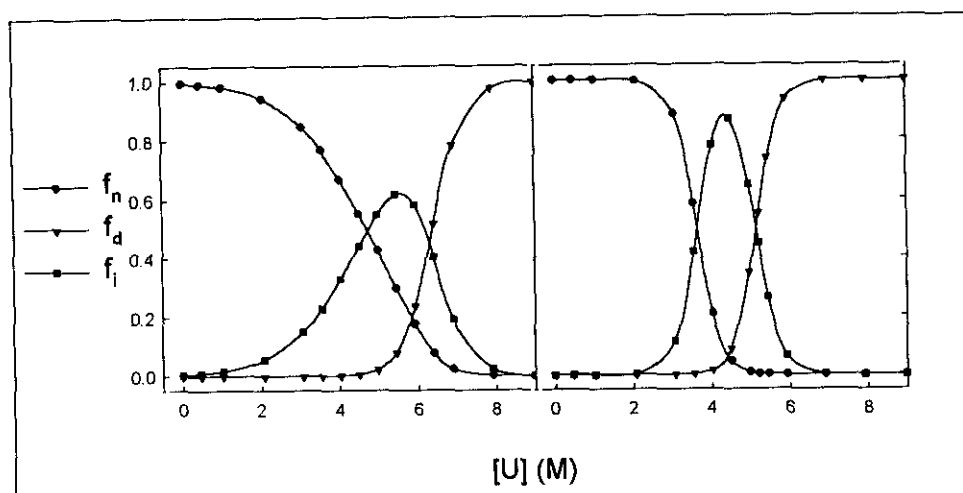


Figura 55. Representación de la fracción de las formas nativa, intermedia y desnaturalizada a cada concentración de urea para las proteínas FIV-rp24 y W126F obtenidas con los parámetros termodinámicos resultantes del ajuste de los datos experimentales de las curvas de desnaturalización a un modelo de tres estados. (●) forma nativa, (▼) forma intermedia y (■) forma desnaturalizada. Las curvas de desnaturalización se obtuvieron midiendo la variación de la longitud de onda del máximo del espectro de emisión de fluorescencia excitando a 295 nm con la concentración de urea.

	$\Delta G^1_{H_2O}$ (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta G^2_{H_2O}$ (kcal· mol ⁻¹)	$\Delta G^T_{H_2O}$ (kcal·mol ⁻¹)		Δn_1		Δn_2	Z
	3E	3E	2E	3E	2E	3E	3E	3E
λ_{275}								
FIV-rp24	11.7	10.5	11.7	22.3	42.1	41.2	39.9	0.1
W40F			10.2		36.8			
W126F	11.7	9.5	9.9	21.2	42.9	51.2	29.8	0.8
W40/126F			8.2		40.5			
λ_{295}								
FIV-rp24	3.2	10.2	7.3	13.4	27.3	15.1	37.2	0.2
W40F			11.6		43.2			
W126F	8.43	12.1	6.8	28.4	31.4	50.0	52.8	0.3

Tabla XVI. Parámetros de ajuste de las curvas de desnaturalización obtenidas por fluorescencia a un modelo de dos (2E) o tres estados (3E). $\Delta G^1_{H_2O}$, variación de energía libre correspondiente a la transición del estado nativo al estado intermedio; $\Delta G^2_{H_2O}$, variación de energía libre correspondiente a la transición del estado intermedio al estado desnaturalizado; Δn_1 , diferencia en el número de sitios de unión para la urea de las conformaciones nativa e intermedia; Δn_2 , diferencia en el número de sitios de unión para la urea de las conformaciones intermedia y desnaturalizada; Z, cambio fraccional de la señal de dicroísmo en la transición del estado nativo al intermedio. (a) diferencia en el número de sitios de unión para la urea para la proteína nativa y desnaturalizada.

Con todos los datos obtenidos mediante el análisis de las curvas de desnaturalización seguidas mediante dos técnicas espectroscópicas diferentes podemos aventurar un modelo para explicar el mecanismo de plegamiento de la proteína FIV-rp24. Cuando el proceso de desnaturalización se sigue por dicroísmo circular, se aprecian dos transiciones en el caso de la proteína salvaje y el mutante W40F, que se producen a unas concentraciones de urea similares. Una primera transición a una concentración 5.2 M para FIV-rp24 y algo menor en el mutante W40F, 4.7 M, y una segunda transición a 6.2 M (FIV-rp24) y 6.0 M (W40F). Con el mutante W126F y el doble mutante, por dicroísmo circular, sólo se puede apreciar la primera transición a concentraciones 5.3 M (W126F) y 4.9 M (W40/126F). Hay también una pequeña transición en el mutante W126F a una concentración 4.0 M, que es de una amplitud muy baja, por lo que podríamos considerarla una pre-transición. Si el proceso de desnaturalización se estudia mediante la técnica de fluorescencia, volvemos a distinguir dos transiciones en la proteína salvaje, a concentraciones algo superiores a las obtenidas por dicroísmo circular en el caso de las curvas obtenidas midiendo con una longitud de excitación de 275 nm, pero muy similares cuando la longitud de excitación es de 295 nm. Si embargo, por esta técnica sólo una transición se puede apreciar en el mutante W40F, la correspondiente a concentraciones más altas de urea. En el mutante W126F los resultados son diferentes según la longitud de onda de excitación; mientras que se distinguen dos transiciones cuando la longitud de onda de excitación empleada es de 275 nm, sólo una se observa excitado a 295 nm a una concentración 5.1 M, aunque también se vuelve a distinguir la pre-transición observada mediante dicroísmo a una concentración algo superior, 4.2 M. Por último, para el doble mutante solamente se aprecia la primera transición, a una concentración 4.6 M.

Los resultados sugieren que, con respecto a la estructura secundaria, hay una *diferencia entre la proteína salvaje y el mutante W40F en relación al mutante W126F y el doble mutante*. Parece ser que el Trp40 en la proteína FIV-rp24 se encuentra en un entorno en el que la pérdida de estructura secundaria se produce a concentraciones de urea menores, mientras que el Trp126, que es el que está presente tanto en la proteína salvaje como en el mutante W40F, está en un entorno diferente, menos expuesto a la acción del agente desnaturalizante. En cuanto al estudio del entorno tridimensional de estos dos residuos de triptófano en la proteína, los resultados obtenidos midiendo la fluorescencia emitida por las proteínas excitando a 295 nm, longitud a la cual sólo se mide la fluorescencia emitida por los residuos de triptófano, vuelven a obtenerse parecidas conclusiones. Es decir, el Trp126 se encuentra en un entorno, ya que la desnaturalización del mutante W126F refleja

únicamente la transición a bajas concentraciones de urea, mientras que para el mutante W40F se observa la segunda transición. Si nos fijamos en la Figura 45, ambos residuos de triptófano ocupan posiciones correspondientes a dos hélices de la estructura superenrollada del extremo amino-terminal. El Trp126 parece estar algo más expuesto al disolvente que el Trp40, como también se puede apreciar en los espectros de dicroísmo circular en el UV próximo, sin embargo, la desnaturalización con urea afecta más al entorno del Trp40, lo que hace que el mutante donde sólo este residuo de triptófano está presente se desnaturalice a más bajas concentraciones de urea.

CONCLUSIONES

PAPEL DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO EN EL MANTENIMIENTO DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA p26 DE EIAV

- ❶ La proteína p26 se obtiene en condiciones nativas. El elemento de estructura secundaria mayoritario es la hélice α , en claro contraste con el modelo propuesto de barril β para la proteína p24 de HIV-1.
- ❷ La proteína rp26 se comporta como un monómero de 26 kDa, tanto en PAGE-SDS, en ausencia o presencia de agentes reductores, como en cromatografía de penetrabilidad hasta una concentración de 20 mg/ml.
- ❸ La proteína rp26 es reconocida por anticuerpos presentes en suero de caballo infectado por EIAV, tanto en condiciones nativas (ELISA) como desnaturalizantes (inmunodetección).
- ❹ Las proteínas pUC/rp26 y pKK/rp26 tienen distinto contenido en grupos SH libres, 2.2 frente a 1.1, y diferente estructura secundaria:

	pUC/rp26	pKK/rp26
Estructura α	40	50
Estructura β	26	1
Giro β	12	15
Estr. no ordenada	22	34

- ❺ La diferente estructura de pUC/rp26 y pKK/rp26 se refleja en los parámetros f_a , fracción de fluoróforos accesibles, siendo mayor cuanto menor es el número de SH libres, y en el valor de la elipticidad. A pesar de que la proteína pKK/rp26 tiene una estructura más accesible, la temperatura de desnaturalización térmica es ligeramente mayor (55.0 frente a 53.8 °C).
- ❻ Existe una relación entre el contenido de SH y el espectro de dicroísmo circular. El cambio conformacional al formarse el puente disulfuro podría implicar un aumento en el porcentaje de lámina β de la proteína pKK/rp26.
- ❼ El cambio de los residuos de Cys48 por Ser provoca cambios poco importantes en la estructura tridimensional de la proteína rp26, según sus espectros de CD en el UV lejano y de fluorescencia y su estabilidad térmica.

- ③ El mutante tiene 1.6 grupos SH, lo que indica que el 80% de las moléculas están totalmente reducidas. Al igual que ocurre en rp26, en el caso del mutante es importante el estado de oxidación. En este caso al reducir la proteína, el cambio es menos significativo puesto que se pasa de 1.6 a 1.7 grupos SH libres. Sin embargo, la oxidación modifica el espectro de CD en el UV lejano y provoca un aumento del parámetro f_a . Este cambio no tiene ningún reflejo en los espectros de fluorescencia ni en la temperatura de desnaturalización térmica.
- ④ La proteína rp26-His posee las mismas características estructurales que rp26. Se obtiene mayor cantidad y, en principio, se puede utilizar en estudios estructurales (RMN).

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA p24 DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA (FIV). MECANISMO DE PLEGAMIENTO

- ① Se ha clonado la proteína p24 de FIV y se han obtenido dos mutantes sencillos de Trp y un mutante doble. La hélice α es mayoritaria en todas (da cuenta de un 50%) y no hay estructura β . Las mutaciones no afectan la estructura secundaria.
- ② A partir de los espectros de CD en el UV próximo de las formas mutantes se ha podido determinar la contribución individual de los dos triptófanos. El espectro original se puede recomponer a partir de las mencionadas contribuciones y del espectro del doble mutante que proporciona la contribución de las siete tirosinas que hay en la proteína. Excepto en la zona de 250-265 nm, los espectros son prácticamente coincidentes, lo que indica que el ordenamiento tridimensional en los alrededores de los Trp no se modifica como consecuencia de las mutaciones.
- ③ El espectro de fluorescencia, obtenido a 275 nm, tanto de la proteína salvaje como de los mutantes sencillos presenta una contribución menor de los residuos de tirosina que la que se determina con el doble mutante. Esta disminución refleja la existencia de transferencia de energía sin radiación de Tyr a Trp. La contribución del Trp126 al espectro es el doble que la del Trp40. El espectro de fluorescencia obtenido como suma de las contribuciones individuales de los Trp coincide bastante bien con el de la proteína salvaje, lo que indica una estructuración tridimensional similar en las cuatro proteínas.
- ④ Los estudios de desnaturalización-renaturalización seguidos por

dicroísmo circular sugieren que el Trp40 se encuentra en un entorno en el que la pérdida de estructura secundaria como consecuencia de la desnaturalización con urea se produce a concentraciones de urea menores, mientras que el Trp126 se encuentra menos expuesto a la acción del agente desnaturalizante.

- ⑥ Los estudios de desnaturalización-renaturalización seguidos por fluorescencia vuelven a dar resultados similares a los de CD. El Trp126 se encuentra en un entorno tridimensional diferente que el Trp40, pues el W126F tiene una curva de desnaturalización en la que únicamente se observa una transición a bajas concentraciones de urea. La desnaturalización con urea parece afectar más al entorno del Trp40, lo que hace que el mutante donde sólo está presente este residuo de triptófano se desnaturalice a más bajas concentraciones de urea.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackley, C.D., Yamamoto, J.K., Levy, N., Pedersen, N.C., Cooper, M.D. (1990) *J. Virol.*, **64**, 5652-5655.
- Ada, G.L. (1988) *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1**, 295-303.
- Ahmed, Y.F., Hanly, S.M., Malim, M.H., Cullen, B.R., Green, W.C. (1991) *Genes. Dev.*, **4**, 1014-1022.
- Allan, J.S., Coligan, J.E., Barin, F., McLane, M.F., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Lee, T.H., Essex, M. (1985) *Science*, **228**, 1091-1094.
- Argos, P. (1989) *EMBO J.*, **8**, 779-785.
- Arrigo, S.J., Chen, I.S.Y. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 808-819.
- Baldwin, R.L. (1995) *J. Biomol. RMN*, **5**, 103-109.
- Bendineli, M., Pistello, M., Matteuci, D., Lobardi, S., Baldinotti, F., Bandecchi, P., Ghilarducci, R., Ceccherini-nelli, L., Garzelli, C., Poli, A., Esposito, F., Malvaldi, G., Tozzini, F. (1993) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **335**, 189-202.
- Betz, S.F., Pielak, G.J. (1992) *Biochemistry* **31**, 12337-12344.
- Bolognesi, D.P. (1993) *Semin. Immunol.*, **5**, 203-214.
- Bolotina, I.A., Chekhov, V.O., Lugauskas, V.Y., Ptitsyn, O.B. (1980) *Mol. Biol.*, (USSR) **14**, 902-908.
- Bower, V.E., Robinson, R.A. (1963) *J. Phys. Chem.* **67**, 1524-
- Braaten, D., Franke, E.K., Luban, J. (1996) *J. Virol.*, **70**, 3551-3560.
- Bryant, M., Ratner, L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 523-527.
- Bryngelson, J.D., Onuchic, J.N., Socci, N.D., Wolynes, P.G. (1995) *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, **21**, 167-195.
- Burnette, W.N. (1981) *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
- Burns, J.A., Butler, J.C., Moran, J., Whitesides, G.M. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 2648-2650.
- Cai, K., Schirch, V. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 2987-2994.
- Capon, D.J., Ward, R.H.R (1991) *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 649-678.
- Carpenter, S. Alexander, S. (1992) *Seminars in Virology*, **3**, 157-166.
- Castillo, I., Bartolome, J., Quiroga, J.A., Carreño, V. (1992) *J. Virol. Methods*, **38**, 71-80.
- Chazal, N., Carrière, H.B., Gy, B., Boulanger, P. (1994) *J. Virol.*, **68**, 111-122.
- Chazal, N., Gay, B., Carrière, C., Tournier, J., Boulanger, P. (1995) *J. Virol.*, **69**, 365-375.
- Chong, Y.-H., Payne, S.L., Issel, C.J., Montelaro, R.C., Rushlow, K. (1991) *J. Virol.*, **65**, 1007-1012.

- Chou, P.Y., Fasman, G.D. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 251-276.
- Chrystie, I.L., Almeida, J.D. (1988) *AIDS*, **2**, 459-464.
- Clarke, J., Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 4322-4329.
- Clements, J.E., Wong-Staal, F. (1992) Molecular Biology of lentiviruses. *Seminars in Virology*, **3**, 137-146.
- Clements, J.E., Zink, M.C. (1996) *Clinical Microbiol. Rev.*, **9**, 100-107.
- Coates, A.R.M., Cookson, J., Barton, G.J., Zvelebil, M.J., Sternberg, M.J.E. (1987) *Nature*, **326**, 549-550.
- Cochrane, A.W., Chen, C.H., Rosen, C.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1198-1202.
- Cohen, C., Parry, D.A.D. (1990) *Proteins*, **7**, 1-15.
- Coggins, L., Norcross, N.L., (1970) *Cornell Vet.* **60**, 330-335
- Cooper, A., Eyles, S.J., Radford, S.E., Dobson, C.M. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 939-943.
- Craven, R.C., Leure-duPree, A.E., Weldon, Jr., R.A., Wills, J.W. (1995) *J. Virol.*, **69**, 4213-4227.
- Crawford, S., Goff, S.P. (1984) *J. Virol.*, **49**, 909-917.
- Creighton, T.E., Goldenberg, D.P. (1984) *J. Mol. Biol.*, **179**, 497-526.
- Creighton, T.E. (1990) *Biochem J.*, **270**, 1-16.
- Creighton, T.E. (1992) *Protein Folding*, W.H. Freeman and Co., New York.
- Creighton, T.E., Darby, N.J., Kemmink, J. (1996) *FASEB J.*, **10**, 110-118.
- Cullen, B.R. y Greene, W.C. (1990) *Virology*, **17**, 1-5.
- Cullen, B.R. (1992) *Microbiol. Rev.*, **56**, 375-394.
- Dannull, J., Surovoy, A., Jung, G., Molling, K. (1994) *EMBO J.*, **13**, 1525-1533.
- Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., Barre-Sinoussi F. (1990) *J. Mol. Biol.* **216**, 689-699.
- Debouck, C., Gorniak, J.G., Strickler, J.E., Meek, T.D., Metcalf, B.W., Rosenberg, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8903-8906.
- Derman, A.I., Beckwith, J. (1991) *J. Bacteriol.*, **173**, 7719-7722.
- Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D., Chan, H.S. (1995) *Protein Sci.*, **4**, 561-602.
- Dobson, C.M., Evans, P.A., Williamson, K.L. (1984) *FEBS Lett.*, **168**, 331-334.
- Doig, A.J., Williams, D.H. (1991) *J. Mol. Biol.* **217**, 389-398.

- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W.A., Göttlinger, H.G. (1994a) *J. Virol.*, **68**, 1689-1696.
- Dorfman, T., Bukovsky, A., Öhagen, A, Höglund, S., Göttlinger, H.G. (1994b) *J. Virol.*, **68**, 8180-8187.
- Edelhoch, H. (1967) *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Eftink M.R., Ghiron C.A. (1976) *Biochemistry*, **15**, 672-680
- Egberink, H.F., Ederveen, J., Montelaro, R.C., Pederson, N.C., Horzinek. M.C., Koolen, M.J.M. (1990) *J. Gen. Virol.*, **71**, 739-743.
- Ehrlich, L.S., Agresta, B.E., Carter, C.A. (1992) *J. Virol.*, **66**, 4874-4883.
- Ehrlich, L.S., Agresta, B.E., Gelfand, C.A., Jentoft, J., Carter, C.A. (1994) *Virology*, **204**, 515-525.
- Ehrlich, L.S., Fong, S., Scarlata, S., Zybarth, G., Carter, C. (1996) *Biochemistry*, **35**, 3933-3943.
- Ellman, G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Fäcke, M., Janetzko, A., Sohoeman, R.L., Kräusslich, H.-G. (1993) *J. Virol.*, **67**, 4972-4980.
- Fahey, R.C., Hunt, J.S., Windham, G.C. (1977) *J. Mol. Evol.* **10**, 155-160.
- Farabaugh, P.J. (1978) *Nature*, **274**, 765-769.
- Fass, D., Harrison, S.C., Kim, P.S. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 465-469.
- Fauci, A.S. (1993) *Science*, **262**, 1011-1018.
- Fersht, A.R. (1993) *FEBS Lett.*, **325**, 5-16.
- Flory, P.J. (1969) *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. Wiley, New York.
- Franke, E.K., En, H., Yuan, H., Bossolt, K.L., Goff, S.P., Luban, J. (1994a) *J. Virol.*, **68**, 5330-5334.
- Franke, E.K., Yuan, H., Luban, J. (1994b), *Nature*, **372**, 359-362.
- Freed, E.O., Martin, M.A. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 41, 23883-23886
- Freed, E.O. (1997) *Encyclopedia of Cancer* Vol. III, Ed. Academic Press, pp. 1585-1590.
- Fukui, T., Imura, S., Goto, T., Nakai, M. (1993) *Microsc. Res. Tech.*, **25**, 335-340.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., Markham, P.D. (1984) *Science*, **224**, 500-503.
- Gallo, R.C., Montaigner, L. El SIDA hoy. *Libros de Investigación y Ciencia* (1988). pp 6-15.

- Gamble, T.R., Vajdos, F.F., Yoo, S., Worthylake, D.K., Houseweart, M., Sundquist, W.I., Hill, C.P. (1996) *Cell*, **87**, 1285-1294.
- Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., von Schwedler, U.K., Worthylake, D.K., Wang, H., McCutcheon, J.P., Sundquist, W.I., Hill, C.P. (1997) *Science*, **278**, 849-852.
- Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Ozel, M., Pauli, G., Koch, M.A. (1987) *Virology*, **156**, 171-176.
- Gelderblom, H.R., Özel, M., Pauli, G. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-functions relations. (1989) *Arch. Virol.*, **106**, 1-13.
- Gelderblom, H.R., Marx, P.A., Özel, M., Gheysen, D., Munn, R.J., Joy, K.I., Pauli, G. (1990) *Retroviral proteases: control of maturation and morphogenesis*. L.H. Pearl (ed.). Stockton Press, N.Y., pp. 159-180.
- Gelderblom, H.R. Özel, M., Winkel, T., Morath, B., Grund, C., Pauli, G. (1991) *Accessory Cells in HIV and Other retroviral Infections*. Ed. Basel, Karger. pp 50-68.
- Gelderblom, H.R. (1991) *AIDS*, **5**, 617-638
- Gelderblom, H.R., Bauer, P.G., Özel, M., Höglund, S., Niedrig, M., Renz, H., Morath, B., Lundquist, P., Nilsson, A., Mattow, J. *et al.* (1992). Morphogenesis and morphology of human immunodeficiency virus. Membrane Interactions of HIV. R.C. Aloia and C.C. Curtain, eds. (New York: Wiley-Liss, Inc.), pp. 33-54.
- Geourjon, C., Dèlèage, G. (1993) *Comput. Appl. Biosci.*, **9**, 87-91 .
- Gheysen, D., Jacobs, E., De Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., Wilde, M.D. (1989) *Cell*, **59**, 103-112.
- Gilbert, H.F. (1990) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **63**, 69-172.
- Gill, S.C., von Hippel, P.H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gitti, R.K., Lee, B.M., Walker, J., Summers, M.F., Yoo, S., Sunquist, W.I. (1996) *Science*, **273**, 231-235.
- Gonda, M.A. (1988) *J. Electron Microsc. Tech.*, **8**, 17-40
- Gorelick, R.J., Nigida, S.M., Bess, J.W., Arthur, L.O., Henderson, L.E., Rem, A. (1996) *J. Virol.*, **64**, 3207-3211.
- Göttlinger, H.G., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5781-5785.
- Green, L.M., Berg, J.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4047-4051.
- Griko, Yu, V., Privalov, P.L., Venyaminov, S. Yu., Kutysenko, V.P. (1988) *J. Mol. Biol.* **202**, 127-138.
- Gupta, R., Yadav, S., Ahmad, F. (1996) *Biochemistry* **35**, 11925-11930.
- Haase, A.T. (1986) *Nature*, **322**, 130-136.

- Hao, M.-H., Scheraga, H.A. (1995) *J. Chem. Phys.*, **102**, 1334-1348.
- Harisch, G., Eikemeyer, J., Schole, J. (1979) *Experientia*, **35**, 719-720.
- Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies, a Laboratory Manual*, p. 348, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Hausdorf, G., GewieB, A., Wray, V., Porstmann, T. (1994) *J. Virol. Methods.*, **50**, 1-10.
- Henderson, L.E., Sowder, R.C., Smythers, G.W., Oroszlan, S. (1987) *J. Virol.*, **61**, 1116-1124.
- Hennecke, J., Sillen, A., Huber-Wunderlich, M., Engelborghs, Y., Glockshuber, R. (1997) *Biochemistry* **36**, 6391-6400.
- Hill, C.P., Worthylake, D., Bancroft, D.P., Christensen, A.M., Sundquist, W.I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3099-3104.
- Hinck, A.P., Truckses, D.M., Markley, J.L. (1996) *Biochemistry* **35**, 10328-10338.
- Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G., Blanquet, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 8247-8251.
- Hirst, J.D., Brooks, C.L., III (1994), *J. Mol. Biol.* **243**, 173-178.
- Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A. (1987) *J. Chromatography* **411**, 177-184.
- Hockley, D.J., Wood, R.D., Jacobs, J.P., Garrett, A.J. (1988) *J. Gen. Virol.*, **69**, 2455-2469.
- Höglund, S., Öfverstedt, L., Nilsson, A., Lundquist, P., Gelderblom, H.R., Özel, M., Skoglund, U. (1992) *AIDS Res. Hum. Retrov.*, **8**, 1-7.
- Hosie, M.J., Osborne, R., Yamamoto, J.K., Neil, J.C., Jarrett, O. (1995) *J. Virol.*, **69**, 1253-1255.
- Howarth, O.W., Lian, L.Y. (1984) *Biochemistry* **23**, 3515-3521.
- Hu, S.-L., Travis, B., Garrigues, J., Zarling, J.M., Sridhar, P., Dykers, T., Eichberg, J.E., Alpers, C. (1990) *Virology*, **179**, 321-329.
- Hunter, E., Swanston, R. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immun.*, **157**, 187-253.
- Hunter, E. (1994) *Sem. Virol.*, **5**, 71-83.
- Hussain, K.A., Issel, C.J., Rwambo, P.M., Arnizaut, A.B., Ball, J.M., Schnorr, K.L., Montelaro, R.C. (1988) *J. Gen. Virol.*, **69**, 1719-1724.
- Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F. (1992) *Science* **257**, 1496-1502.
- Issel, C.J., Horohov, D.W., Lea, D.F., Adams, W.V., Hagius, W.V., McManus, J.M., Allison, A.C., Montelaro, R.C. (1992) *J. Virol.*, **66**, 3398-3408.
- Jacks, T., Madhani, H.D., Masiarz, F.R., Varmus, H.E. (1988) *Cell*, **55**, 447-458.

-
- Johnson, R.P., Trocha, A., Yang, L., Mazzara, G.P., Panicali, D.L., Buchanan, T.M., Walker, B.D. (1991) *J. Immunol.*, **147**, 1512-1521.
 - Jowett, J.B.M., Hockney, D.J., Nermut, M., Jones, J.M. (1992) *J. Gen. Virol.*, **73**, 3079-3086.
 - Karacostas, V., Nagashima, K., Gonda, M.A., Moss, B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8964-8967.
 - Kawakami, T., Sherman, L., Dahlberg, J., Gazit, A., Yaniv, A., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. (1987) *Virology*, **158**, 300-312.
 - Kim, P.S., Baldwin, R.L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 631-660.
 - Klikova, M., Rhee, S., Hunter, E., Ruml, T. (1995) *J. Virol.*, **69**, 1093-1098.
 - Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, A.F., Scolnick, E.M., Sigal, I.S. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4686-4690.
 - Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E.A., Gottlinger, H.G. (1995) *J. Virol.* **69**, 2759-2764.
 - Kosower, N.S., Kosower, E.M. (1978) *Int. Rev. Cytol.*, **54**, 109-160.
 - Kowalski, M., Bergeron, T., Dorfman, W., Haseltine, W., Sodroski, J. (1991) *J. Virol.*, **65**, 281-291.
 - Krausslich, H.G., Facke, M., Heuser, A.M., Konvalinka, J., Zentgraf, H. (1995) *J. Virol.* **69**, 3407-3419.
 - Kuroki, R., Inaka, K., Taniyama, Y., Kidokoro, S., Matsushima, M., Kikuchi, M., Yutani, K. (1992) *Biochemistry* **31**, 8323-8328.
 - Lackowicz, J.R. (1983) en *Principles of Fluorescence spectroscopy*, pp. 341-379, Plenum Press, New York.
 - Laemli, V.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
 - Langedijk, J.P., Schalken, J.J., Tersmette, M., Huisman, J.G., Melen, R.H. (1990) *J. Gen. Virol.*, **71**, 2609-2614 .
 - Lehrer, S.S. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3254-3263.
 - Letvin, N.L. (1990) *Immunol. Today*, **11**, 322-326.
 - Levy, J.A. (1993) *AIDS*, **7**, 1401-1410.
 - Locke, B.C., MacInnis, J.M., Qian, S.J., Gordon, J.I., Li, E., Fleming, G.R., Yang, N.C. (1992) *Biochemistry*, **31**, 2376-2383.
 - Loewenthal, R., Sancho, J., Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 6775-6779.
 - Lutz, H., Hoffmann-Lehmann, R., Bauerpham, K., Holznagel, E., Tozzini, F., Bendinelli, M., Reubel, G., Aubert, A., Davis, D., Cox, D., *et al.* (1995) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**, 103-113 .
 - Lyles, M.M., Gilbert, H.F. (1991) *Biochemistry*, **30**, 613-619.

- Mammano, F., O'Hagen, A., Hoglund, S., Gottlinger, H.G. (1994) *J. Virol.*, **68**, 4927-4936.
- Marquardt, D.W. (1963) An Algorithm for Least Squares Estimation of Parameters. *Journal of the Society of Industrial and Applied Mathematics*, **11**, 431-441.
- Martensson, L.-G., Jonasson, P., Freskgard, P.-O., Svensson, M., Carlsson, U., Jonsson, B.-H. (1995) *Biochemistry* **34**, 1011-1021.
- Martin, J.-P., Bingen, A., Braunwald, J., Nonnemacher, H., Valle, M., Gut, J.-P., Koehren, F., de Monte, M., Kirn, A. (1995) *AIDS*, **9**, 447-453.
- Massiah, M.A., Worthylake, D., Christensen, A.M., Sundquist, W.I., Hill, C.P., Summers, M.F. (1996) *Protein Science*, **5**, 2391-2398.
- Matthews, C.R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 653-683.
- Matsuo, K., Nishino, Y., Kimura, T., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Mikami, T., Ikuta, K. (1992) *J. Gen. Virol.*, **73**, 2445-2450.
- Matsumura, M., Signor, G., Matthews, B.W. (1989) *Nature* **342**, 291-293.
- McCune JM., Rabin, L.B., Feinberg, M.B., Liebermann, M., Kosek, J.C., Reyes, G.R., Weissmann, I.L. (1988) *Cell*, **53**, 55-67.
- McGuire, T.C., O'Rourke, K.I., Baszler, T.V., Leib, S.R., Brassfield, A.L., Davis, W.C. (1994) *J. Gen. Virol.*, **75**, 895-900.
- Mergener, K., Facke, M., Welker, R., Brinkmann, V., Gelderblom, H.R., Krauslich, H.G. (1992) *Virology*, **186**, 25-39.
- Miller, W.G., Brant, D.A., Flory, P.J. (1967) *J. Mol. Biol.*, **23**, 67-80.
- Miyazawa, T., Tomonaga, K., Kawaguchi, Y., Mikami, T. (1994) *Arch. Virol.*, **134**, 221-234.
- Momany, C., Kovari, L.C., Prongay, A.J., Keller, W., Gitti, R.K., Lee, B.M., Gorbalenya, A.E., Tong, L., McClure, J., Ehrlich, L.S., Summers, M.F., Carter, C., Rossmann, M.G. (1996) *Nature Struct. Biol.*, **3**, 763-770.
- Montaigner, L., Dauguet, C., Axler, S., Chambaret, S., Gruet, J., Nugeyret, M.T., Rey, F., Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C. (1984) *Ann. Inst. Pasteur Virol.*, **135E**, 119-134.
- Montelaro, R.C. (1994) Equine Infectious Anemia Virus. *Encyclopedia of Virology*. Ed. Webster, R.G. and Granoff, A. Academic Press. Harcourt Brace & Co., Publishers. pp. 430-437.
- Nakai, M., Goto, T. (1996) *J. Electron. Microsc.*, **45**, 247-257.
- Narayan, O., Clements, J. (1990) Lentiviruses. *Virology*, 2ª Edición, Ed. Raven Press, Ltd., pp 1571-1589.
- Nath, U., Udgaonkar, J.B. (1997) *Biochemistry*, **36**, 8602-8610.
- Nilsson, B., Berman.Marks, C., Kuntz, I.D., Anderson, S. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 2970-2977.

- Novotney, C., English, R.V., Housman, J., Davidson, M.G., Nasisse, M.P., Jeng, C.R., Davis, W.C., Tompkins, M.B. (1990) *AIDS*, 4, 1213-1218.
- Olmsted, R.A., Barnes, A.K., Yamamoto, J.K., Hirsch, V.M., Purcell, R.H., Johnson, P.R. (1989a) *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 86, 2448-2452.
- Olmsted, R.A., Hirsch, V.M., Purcell, R.H., Johnson, P.R. (1989b) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 8088-8092.
- Olmsted, R.A., Langley, R., Roelke, M.E., Goeken, R.M., Adger-Johnson, D., Goff, J.P., Albert, J.P., Packer, C., Laurenson, M.K., Caro, T.M., Scheepers, L., Wildt, D.E., Bush, M., Martenson, J.S., O'Brien, S.J. (1992) *J. Virol.*, 66, 6008-6018.
- Olsen, H.A.W., Cochrane, P.J., Dillo, P.J., Nalin, C.M., Rosen, C.A. (1990) *Genes Dev.*, 4, 1357-1364.
- Orlinksky, K.J., Gu, J., Hoyt, M., Sandmeyer, S., Menees, T.M. (1996) *J. Virol.*, 70, 3440-3448.
- Özel, M., Pauli, G., Gelderblom, H.R. (1990) *Ultramicroscopy*, 32, 35-41.
- Pace, C.N. (1986) *Methods Enzymol.* 131, 266-280.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995) *Protein Science* 4, 2411-2423.
- Pal, R., Reitz, M.S., Jr., Tschachler, E., Gallo, R.C., Sarngadharan, M.G., Veronese, F.D.M. (1990) *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 6, 721-730.
- Patarca, R., Haseltine, W.A. (1985) *Nature*, 318, 390.
- Pedersen, N.C., Ho, E.W., Brown, M.L., Yamamoto, J.K. (1987) *Science*, 235, 790-793.
- Pedersen, N.C. (1993) *The Retroviruses*, vol. 2, J.A. Levy (ed.), Plenum Press, New York.
- Perczel, A., Hollósi, M., Tusnády, G., Fasman, G.D. (1991) *Prot. Eng.*, 4, 669-679.
- Pettit, S.C., Moody, M.D., Wehbie, R.S., Kaplan, A.H., Nantermet, P.V., Klein, C.A., Swanstrom, R. (1994) *J. Virol.* 68, 8017-8027.
- Phelps, D.K. y Post, C.B. (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 544-551.
- Pollit, S., Zalkin, H. (1983) *J. Bacteriol.*, 153, 27-32.
- Press, W.H., Flannery, B.P., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T. (1986) *Numerical Recipes*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov, S. Yu., Griko, Yu. V., Makhatadze, G.I., Khechinashvili, N.N. (1989) *J. Mol. Biol.* 205, 737-750.
- Prongay, A.J., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Ehrlich, L.S., Carter, C.A., McClure, J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9980-9984.
- Reicin, A.S., Paik, S., Berkowitz, R.D., Luban, J., Lowy, I., Goff, S.P. (1995), *J. Virol.*, 69, 642-650.

-
- Reicin, A.S., Ohagen, A., Yin, L., Höglund, S., Goff, S.P. (1996) *J. Virol.*, **70**, 8645-8652.
 - Rhee, S.S., Hunter, E. (1991) *EMBO J.*, **10**, 535-546.
 - Robey, E., Axel, R. (1990) *Cell*, **60**, 697-700.
 - Rosé, S., Hensley, P., O'Shannessy, D.J., Culp, J., Debouck, C., Chaiken, I. (1992) *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **13**, 112-119.
 - Rossmann, M.G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4625-4627.
 - Royer, M., Cerutti, M., Gay, B., Hong, S.-S., Devauchelle, G., Boulanger, P. (1991) *Virology*, **184**, 417-422.
 - Royer, M., Hong, S.S., Gay, B., Cerutti, M., Boulanger, P. (1992) *J. Virol.*, **66**, 3230-3235.
 - Royer, C.A., Mann, C.J., Matthews, C.R. (1993) *Protein. Sci.* **2**, 1844-1852 .
 - Rule, G.S., Pratt, E.A., Simplicenau, V., Ho, C. (1987) *Biochemistry*, **26**, 549-556.
 - Rushlow, K., Peng, X.-X., Montelaro, R.C., Shih, D.S. (1992) *Virology*, **188**, 396-401.
 - Sakalian, M., Parker, S.D., Weldon Jr., R.A., Hunter, E. (1996) *J. Virol.*, **70**, 3706-3715.
 - Salinovich, O., Payne, S.L., Montelaro, R.C., Hussain, K.A., Issel, C.J., Schnorr, K.L. (1986) *J. Virol.* **57**, 71-80.
 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". Segunda Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. York*.
 - Schmitt, M.P., Gendrault, J.L., Schweitzer, C. et al. (1990) *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **6**, 987-991.
 - Schmitt, M.P., Gendrault, J.L., Steffan, A.M., et al. (1991) *Cells of the Hepatic Sinusoid*, vol. 3. Edited by Knook, D.L., Wisse, E., McCuskey, R.S.. Rijswijk: Kupffer Cell Foundation, pp. 410-413.
 - Schnölzer, M., Rackwitz, H.-R., Gustchina, A., Laco, G.S., Wlodawer, A., Elder, J.H., Kent, S.B.H. (1996) *Virology*, **224**, 268-275.
 - Schultz, G.E., Schirmer, R.H. (1979) *Principles of Protein Structure*. Springer-Verlag, New York. pp. 54.
 - Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyo, E.M., Paulakis, G.N. (1990) *J. Virol.*, **64**, 2519-2529.
 - Siebelink, K.H.J., Tijhaar, E., Huisman, R.C., Huisman, W., de Ronde, A., Darby, I.H., Francis, M.J., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D. (1995) *J. Virol.*, **69**, 3704-3711 .
 - Simmonds, P., Zhang, L.Q., Watson, H.G., Rebus, S., Ferguson, E.D., Balfe, P., Leadbetter, G.H., Yap, P.L., Peutherer, J.F., Ludlam, C. (1990) *Lancet*, **336**, 1469-1472.
 - Smith, J.C., Clarke, A.R., Chia, W., Irons, L.I., Atkinson, T., Holbrook, J.J. (1991) *Biochemistry* **30**, 1028-1036.

-
- Spearman, P., Wang, J.-J., Vander Heyden, N., Ratner, L. (1994) *J. Virol.*, **68**, 3233-3242.
 - Steffan, A.M., Gendarult, J.L., McCuskey, R.S., McCuskey, P.A., Kirn, A. (1986) *Hepatology*, **6**, 830-836.
 - Stein, B.S., Engelman, E.G. (1989) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2640-2649.
 - Steinkasserer, A., Harrison, R., Billich, A., Hammerschmid, F., Werner, G., Wolff, B., Peichl, P., Palfi, G., Schnitzel, W., Mlynar, E. et al. (1995) *J. Virol.*, **69**, 814-824.
 - Steinmann, R., Dombrowski, J., O'Conner, T., Montelaro, R.C., Tonelli, O., Lawrence, K., Seymor, C., Goodness, J., Pederson, N., Anderson, P.R. (1990) *J. Gen. Virol.*, **71**, 701-706.
 - Stephens, R.M., Casey, J.W., Rice, N.R. (1986) *Science*, **231**, 589-594.
 - Strambio-de-Castillia, S.K., Hunter, E. (1992) *J. Virol.*, **66**, 7021-7032.
 - Strickland, E.H. (1974) *Crit. Rev. Biochem.* **2**, 113-175.
 - Syu, W.J., Lee, W.R., Du, B., Yu, Q.C., Essex, M., Lee, T.H. (1991) *J. Virol.*, **65**, 6349-6352.
 - Takasaki, T., Kurane, I., Aihara, H., Ohkawa, N., Yamaguchi, J. (1997) *Arch. Virol.*, **142**, 375-382.
 - Talbott, R.L., Sparger, E.E., Lovelace, K.M., Fitch, W.M., Pedersen, N.C., Luciw, P.A., Elder, J.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5743-5747.
 - Tanford, C. (1968) *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121-282.
 - Tanford, C. (1970) *Adv. Protein Chem.*, **24**, 1-95 .
 - Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C.T., Sodroski, J., Göttlinger, H.G. (1994) *Nature*, **372**, 363-365.
 - Thomas, D.J. (1992) *FEBS Lett.*, **307**, 10-13.
 - Thornton, J.M. (1981) *J. Mol. Biol.*, **151**, 261-287.
 - Tidor, B., Karplus, M. (1993) *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, **15**, 71-79.
 - Torten, M., Franchini, M., Barlough, J.E., George, J.W., Mozes, E., Lutz, H., Pedersen, N.C. (1991) *J. Virol.*, **65**, 2225-2230.
 - Tözser, J., Friedman, D., Weber, I.T., Bláha, I., Oroszlan, S. (1993) *Biochemistry*, **32**, 3347-3353.
 - Trono, D., Feinberg, M.B., Baltimore, D. (1989) *Cell*, **59**, 113-120.
 - Vallee, H., Carree, H. (1904) *C R Hebd Seavc Acad Sci*, **139**, 331-333.
 - Verschoor, E.J., Willemse, M.J., Stam, J.G., van Vliet, A.L., Pouwels, H., Chalmers, S.K., Horzinek, M.C., Sondermeijer, P.J., Hesselink, W., de Ronde, A. (1996) *Vaccine*, **14**, 285-289.

-
- Von Poblitzki, A.V., Wagner, R., Niedrig, M., Wagner, G., Wolf, H., Hodrow, S. (1993) *Virology*, **193**, 981-986.
 - Walker, K.W., Gilbert, H.F. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 28487-28493.
 - Wang, C.T., Barklis, E. (1993) *J. Virol.*, **67**, 4264-4273.
 - Wang, S.Z.-S., Rushlow, C.E., Issel, J., Cook, R.F., Cook, S.J., Raabe, M.L., Chong, Y.-H., Costa, L., Montelaro, R.C. (1994) *Virology*, **199**, 247-251.
 - Wetzel, R. (1987) *Trend Biochem. Sci.* **12**, 478-482.
 - White, J.M., Littman, D.R. (1989) *Cell*, **56**, 725-728.
 - Wills, J.W., Craven, R.C. (1991) *AIDS*, **5**, 639-654.
 - Willet, B.J., Hosie, M.J., Callanan, J.J., Neil, J.C., Jarrett, O. (1993) *Immunology*, **78**, 1-6.
 - Wu, P., Brand, L. (1994) *Anal. Biochem.* **218**, 1-13 .
 - Yamamoto, J.K., Spager, E., Ho, E.W., Andersen, P.R., O'Connor, T.P., Mandell, C.P., Lowenstine, L., Munn, R., Pedersen, N.C. (1988) *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1246-1258.
 - Yamamoto, J.K., Hansen, H., Ho, E.W., Morishita, T.Y., Okuda, T., Sawa, T.R., Nakamura, R.M., Pedersen, N.C. (1989) *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **194**, 213-220.
 - Yamamoto, J.K., Okuda, T., Ackley, C.D., Louie, H., Pembroke, E., Zochlinski, H., Munn, R.J., Gardner, M.B. (1991) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**, 911-922 .
 - Yamamoto, J.K., Hohdatsu, T., Olmsted, R.A., Pu, R., Louie, H., Zochlinski, H.A., Acevedo, V., Johnson, H.M., Soulds, G.A., Gardner, M.B. (1993) *J. Virol.* **67**, 601-605.
 - Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Makawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., Ishii, S. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 25329-25331.
 - Yoo, S., Myszka, D.G., Yeh, C., McMurray, M., Hill, C.P., Sundquist, W.I. (1997) *J. Mol. Biol.*, **269**, 780-795
 - Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.H., Essex, M. (1992a) *J. Virol.*, **66**, 4966-4971
 - Yu, X., Yu, Q.-C., Lee, T.H., Essex, M. (1992b) *J. Virol.*, **66**, 5667-5670.
 - Yuan, X., Yu, X.F., Lee, T.H., Essex, M. (1993) *J. Virol.*, **67**, 6387-6394.
 - Zhang, W.-H., Hockley, D.J., Nermut, M.V., Morikawa, Y., Jones, I.M. (1996) *J. Gen. Virol.*, **77**, 743-751.
 - Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W., Resh, M.D. (1994) *J. Virol.*, **68**, 2556-2569.
 - Ziegler, D.M., Poulsen, L.L. (1977) *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 79-81.