

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER
(CSIC-USAL)**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES
DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA**

Esther Ortega Portero

**Bajo la dirección del doctor
Jose María de Pereda**

Salamanca, 2012

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER
(CSIC-USAL)**



**ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES
DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Esther Ortega Portero

Bajo la dirección del doctor
Jose María de Pereda

Salamanca, 2012

Dr. JOSÉ MARÍA DE PEREDA VEGA, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Estudios estructurales y funcionales del dominio plakina de plectina**“, que presenta Dña. Esther Ortega Portero, ha sido realizado bajo su dirección en el Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca), y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 20 de Febrero de 2012.

Fdo, Dr. José María de Pereda Vega

El Ministerio de Educación y Ciencia concedió a Esther Ortega Portero una beca predoctoral FPI (BES-2007-16463) durante el periodo Septiembre 2007-Agosto 2011 asociada a los proyectos inscritos en el Plan Nacional del Conocimiento: **“ARQUITECTURA DE HEMIDESMOSOMAS: ESTRUCTURA E INTERACCIONES MACROMOLECULARES”** (BFU2006-01929/BMC) y **“BASES ESTRUCTURALES DE INTERACCIONES EN HEMIDESMOSOMAS: INTEGRINA $\alpha 6\beta 4$, BPAG1e Y TETRASPANINA CD151”** (BFU2009-08389) que financiaron este trabajo en el laboratorio del Dr. Jose María de Pereda

La Organización Europea de Biología Molecular (EMBO) concedió a Esther Ortega Portero una beca para realizar una estancia corta en el laboratorio de la Dra. Carolyn Moores, Birbeck College (Londres, Reino Unido), durante 3 meses entre Octubre 2010-Enero 2011

Agradecimientos.

El 3 de septiembre del 2007 comencé mi tesis en el CIC con una mezcla de incertidumbre, curiosidad, emoción. Hoy cuatro años y medio después esos sentimientos se convierten en felicidad y un poco de nostalgia al recordar muchos momentos vividos en este tiempo.

Es difícil escribir en tan solo unos renglones todos los agradecimientos que me gustaría expresar. Ha habido mucha gente que me ha acompañado durante estos años, algunos ya estaban antes, otros se han incorporado en el camino, pero todos han sido muy importantes en estos cuatro años.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Jose M^a de Pereda, director de esta tesis, por haberme dado la oportunidad de hacer este trabajo en su grupo. Gracias por toda la ayuda prestada y por todo lo que he aprendido en el laboratorio y sobretodo de cristalografía, durante este tiempo. Gracias por tu apoyo profesional y personal.

A mis compañeras Maria y Noelia, que me han acompañado desde el principio. Gracias a las dos por vuestra ayuda, sin ella, muchas veces las cosas no habrían salido hacia adelante. Especialmente quiero agradecer a Rubén toda su ayuda, gracias por enseñarme todo lo que he aprendido de SAXS. Gracias por tu paciencia y también tus consejos e interés, que han sido fundamentales. Gracias Mónica, a ti también por tus ánimos y porque juntos habeis sido unos perfectos anfitriones en Suiza.

Gracias a todos los que han ido llegando al labo o han pasado por allí, a Ana, Pablo, Cris, Jose Antonio, Sara, por su pequeña gran ayuda.

Como olvidarme de los del 19, si allí empezó todo!. Gracias a Celia y Bea, porque habeis sido mis amigas y porque me habeis dado muy buenos momentos personales. A los que se fueron, a Alberto y a Carlos por su ayuda con Linux. Gracias tambien a Javier por sus consejos y a Sara.

Me gustaría agradecer a Carolyn Moores por recibirme y acogerme como una más en su grupo en el Birbeck College. Gracias a Franck por su tiempo y dedicación, a Adeline, Kanwal, por contar siempre conmigo dentro y fuera del labo, a Elena por los buenos ratos en el labo y a todos los que estaban por allí y me ayudaron con los experimentos.

Quiero dar las gracias a todos los que han compartido mi experiencia fuera del laboratorio. Gracias a mis biólogas, a Sara, a Ruth con ellas comencé mis pasos en la biología y juntas hemos recorrido este camino también, al final lo hemos conseguido!. A Vir y a Jezabel por estar siempre aquí al ladito dándome apoyo y por los buenos momentos que hemos vivido juntas.

Gracias a todos los amigos que me he encontrado en Salamanca. A Rafa y a Metra por hacerme reir tanto, por preocuparos por mí, que haría sin vosotros., a Natalia, Toño, Choni, Carmen, Ernesto, Sandra, Ope, Maria, Urre, Sonsoles, por hacerme sentir del Sanjo.

Gracias a todas las proteinómanas: a Maria, Cristina, Miren, Laura, Susi, por esas semanas de clases y viajes tan intensas y divertidas. Por todo lo que vino después. Gracias Cris, por ser una grandísima amiga.

A mis mejores amigas que siempre me han acompañado, a Maria, a Nuria, por su apoyo, paciencia, consejos, por todo lo vivido, sobre todo estos últimos años. Siempre estaré cerca aunque nos separe la distancia

A Esther, a Yudany, gracias por estar ahí siempre, por ser excepcionales. Gracias por hacer de Oxford una segunda casa para mí. A Mariela porque sin ella, Londres hubiera sido muy diferente.

Gracias a mis primos, tios, a todos los que os habeis preocupado por mí, gracias a todos por vuestros ánimos.

Gracias a mis padres, porque sin ellos no sería nada. GRACIAS, os quiero mucho. Sara, ha sido tan importante que hayas estado conmigo estos años, gracias por hacerme la vida mucho más fácil, no sé que hubiera hecho sin ti. Te quiero mucho, enana. Gracias a ti, David, que eres mi mejor amigo, mi gran fortaleza y apoyo durante los últimos cuatro años, gracias por estar siempre de mi lado y a mi lado, por cuidarme y quererme tanto. Sin ti, todo esto no hubiera sido posible.

Gracias a todos.

Ahora, relájense y disfruten.

Va por ustedes!

Abreviaturas.

Å	Angstrom
aa	aminoácido
ABD	Dominio de unión a actina, del inglés A ctin B inding D omain.
Amp	ampicilina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano.
° C	grado centígrado
C-terminal	carboxilo terminal
CCD	del inglés “Charged Coupled Device”
cDNA	del inglés “Complementary DNA”
cm	centímetro
CCT	Cola C-terminal
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dmax	Distancia máxima.
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNTB	5,5' ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico).
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
dF/dT	Derivada de la fluorescencia / variación de temperatura
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EGTA	Etileno Glicol Tetraacético
EMTS	Etilmercuriotiosalicilato
ESRF	Instalaciones europeas de radiación sincrotrón (<i>European synchrotron radiation facilities</i>)
FI	Filamentos intermedios
<i>g</i>	gravedad
g	gramo
g/l	relación gramo/litro
GSR	Glicina-Serina-Arginina
GSG	Glicina-Serina-Glicina
GSGSG	Glicina-Serina-Glicina-Serina-Glicina
h	hora
HDs	Hemidesmosomas.
HEPES	del inglés N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
His-tag	Purificación en tandem con columnas de afinidad
I (0)	Intensidad de dispersión a ángulo cero.
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
K	Kelvin
kb	kilobase
Kd	constante de disociación
kDa	kilodalton
kV	kilovoltio

L	del ingles “lower”
LB	Luria-Bertani
l	litro
M	molar
mA	miliamperios
ml	mililitro
mg	miligramo
mg/l	relación miligramo/litro
min	minutos
mM	milimolar
m/v	relación masa/volumen
Ni	níquel
N-terminal	amino terminal
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NSD	Discrepancia real normalizada
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>P</i> olymerase <i>C</i> hain <i>R</i> eaction)
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>P</i> rotein <i>D</i> ata <i>B</i> ank)
PEG	Polietilenglicol
P (r)	Función de distribución de distancias inter-atómicas (<i>Pair distribution function</i>)
<i>q</i>	<i>Rango de datos del perfil experimental</i>
PR	Repetición plakina (<i>P</i> lakin <i>R</i> epeat)
PRD	Dominio de repetición plakina (<i>P</i> lakin <i>R</i> epeat <i>D</i> omain)
p/v	relación peso/volumen
Rg	Radio de giro
RNA	Ácido ribonucleico
RMSD	Desviación cuadrática media (<i>R</i> oot <i>M</i> ean <i>S</i> quare <i>D</i> eviation).
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
s	segundo
SAXS	Dispersión de rayos-x a bajo ángulo (<i>S</i> mall <i>A</i> ngle <i>X</i> -Ray <i>S</i> cattering)
SC	Segmento Conector
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate</i>)
SIRAS	Reemplazo isomorfo simple con dispersión anómala (<i>S</i> ingle <i>I</i> somorphous <i>R</i> eplacement with <i>A</i> nomalous <i>S</i> cattering)
SR	Repetición de Espectrina (<i>S</i> pectrin <i>R</i> epeat)
TAE	Tampón Tris/acetato/EDTA
TB	T errific B roth
TEMED	N,N,N', N' - tetrametiletlen-diamina
TEV	del inglés “Tobacco etch virus”
T _M	Temperatura de desnaturalización (<i>Melting temperature</i>)
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano

U	del ingles “upper”
μg	microgramo
μg/ml	relación microgramo/mililitro
μl	microlitro
Mm	Micromolar
UV	Ultravioleta
v/v	relación volumen/volumen
V _M	coeficiente de Matthews
χ ²	Función de discrepancia normalizada
ε	Coefficiente de extinción molar
3D	Tridimensional

INTRODUCCIÓN	1
1.- LA FAMILIA PLAKINA	3
1.1.- Estructura modular de plakinas	4
1.1.1.- Estructura del dominio plakina	7
1.2.- Plakinas en mamíferos	11
2.- PLECTINA	14
2.1.- Estructura del gen <i>PLEC</i>	15
2.2.- Deficiencia en plectina	16
3.- HEMIDESMOSOMAS	16
3.1.- La integrina $\alpha6\beta4$	17
3.1.1.- Estructura de la región citoplasmática de la subunidad $\beta4$	18
3.2.- Interacción entre plectina y la integrina $\alpha6\beta4$	19
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1.- PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIA	29
1.1.- Vectores empleados	30
1.2.- Cepas de <i>E.coli</i>	31
1.3.- Medios de cultivo	31
2.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	31
2.1.- Purificación de DNA plasmídico	31
2.2.- Electroforesis de DNA	31
2.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos	32
2.4.- Secuenciación de DNA	32
2.5.- Clonación de cDNAs en vectores de expresión en <i>E coli</i>	33
2.5.1.- Clonación de fragmentos de plectina con deleciones internas	36
2.6.- Mutagénesis puntual dirigida	37
3.- MÉTODOS GENERALES PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS	38
3.1.- Técnicas electroforéticas	38
3.2.- Cuantificación de proteínas	39
4.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	41

4.1.- Análisis de la expresión de proteínas en <i>E coli</i>	41
4.2.- Purificación de proteínas	41
5.- CRISTALOGRAFÍA.....	43
5.1.- Cristalización de proteínas.....	43
5.1.1.- Experimentos de cristalización: descripción general.....	43
5.1.2.- Cristalización del fragmento SR3-SR4	44
5.1.3.- Cristalización del fragmento SR4-SR5	44
5.1.4.- Cristalización del fragmento SR5-SR6- Δ SH3-A.....	45
5.1.5.- Cristalización del fragmento SR5-SR6- Δ SH3-B	46
5.1.6.- Cristalización del fragmento SR7-SR8	46
5.1.7.- Cristalización del fragmento SR7-SR9	47
5.2.- Adquisición y tratamiento de datos de difracción	48
5.2.1.- Equipos de difracción y fuentes de radiación	48
5.2.2.- Procesado de los datos de difracción	48
5.2.3.- Caracterización inicial de los cristales a partir de los datos de difracción.....	49
5.3.- Resolución de estructuras: faseado	49
5.3.1.- Reemplazo molecular	49
5.3.2.- Reemplazo isomórfico simple con dispersión anómala (SIRAS)	50
5.4.- Refinado de las estructuras cristalográficas	50
5.5.- Análisis de la geometría de las estructuras cristalográficas	51
5.6.- Análisis de estructuras	52
6.-DISPERSIÓN DE RAYOS-X A BAJO ÁNGULO (SAXS).....	52
6.1.- Preparación de las muestras para el análisis mediante SAXS.....	53
6.2.- Recogida de datos de dispersión de rayos-x a bajo ángulo	53
6.3.- Procesado de los datos de dispersión de rayos-x a bajo ángulo (SAXS)	54
6.4.- Modelado de envueltas <i>ab initio</i> de SAXS	54
6.5.- Construcción de modelos atómicos del dominio plakina	55
6.6.- Cálculo del perfil teórico de SAXS y parámetros estructurales. Ajuste de los datos teóricos a los datos experimentales	55
6.7.- Ajuste de las estructuras a alta y baja resolución	56
7.- ENSAYOS BIOQUÍMICOS.....	56
7.1.- Ensayos de la interacción plectina- β 4 basado en fluorescencia.....	56
7.1.1.- Marcaje de fragmentos de plectina con 1,5-I-AEDANS	56
7.1.2.- Ensayo de fluorescencia y determinación de la afinidad de la interacción plectina- β 4..	57

7.2.- Análisis de la estabilidad térmica de proteínas basado en fluorescencia	58
7.3.- Formación de puentes disulfuro y determinación de grupos tiol libres con DNTB	58

RESULTADOS..... 61

1.- DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA EMPLEADOS EN ESTUDIOS ESTRUCTURALES	63
1.1.- Primera colección de fragmentos del dominio plakina de plectina.....	63
1.2.- Cristalización de proteínas de la primera colección de fragmentos del dominio plakina ..	64
1.3.- Segunda colección de fragmentos del dominio plakina de plectina.....	65
1.4.- Cristalización de proteínas de la segunda colección de fragmentos del dominio plakina .	67
1.5.- Fragmento adicional del dominio plakina.....	67
2.- ESTRUCTURA CRISTALOGRAFICA DE FRAGMENTOS MULTI-DOMINIO DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA.....	69
2.1.- Estructura cristalográfica del SR3-SR4	70
2.1.1.- Difracción de los cristales de SR3-SR4 y resolución de la estructura.....	70
2.1.2.- Descripción de la estructura del SR3-SR4	73
2.2.- Estructura cristalográfica del SR4-SR5	76
2.2.1.- Difracción de los cristales de SR4-SR5 y resolución de la estructura.....	76
2.2.2.- Descripción de la estructura del SR4-SR5	82
2.2.3.- Interacción entre el SR4 y el dominio SH3	86
2.2.4.- Conservación de la interfase entre el SR4 y SH3 en la familia plakina	89
2.2.5.- Estructura del pseudo-sitio de unión a ligando del dominio SH3 de plectina	91
2.3.- Estructura cristalográfica de la región SR5-SR6- Δ SH3	94
2.3.1.- Resolución de la estructura del SR5-SR6- Δ SH3-A	94
2.3.2.- Resolución de la estructura del SR5-SR6- Δ SH3-B	99
2.3.3.- Descripción de la estructura SR5-SR6- Δ SH3	100
2.3.4.- Comparación de las dos estructuras de la región SR5-SR6- Δ SH3	103
2.4.- Estructura cristalográfica del SR7-SR8	105
2.4.1.- Difracción de los cristales de SR7-SR8 y resolución de la estructura.....	105
2.4.2.- Descripción de la estructura del SR7-SR8	109
2.5.- Estructura cristalográfica del SR7-SR9	111
2.4.1.- Difracción de los cristales de SR7-SR9 y resolución de la estructura.....	111
2.4.2.- Descripción de la estructura del SR7-SR9	115
2.6.- Estructura individual de cada repetición de espectrina (SR) del dominio plakina	117

2.7.- Comparación de la organización relativa entre SRs del dominio plakina	118
3.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL DOMINIO PLAKINA EN SOLUCIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DE RAYOS-X A BAJO ÁNGULO (SAXS)	121
3.1.- Caracterización estructural de la región SR3-SR5 en solución.....	122
3.1.1.- Estructura de la región SR3-SR5 en solución a baja resolución	124
3.1.2.- Modelo atómico de la región SR3-SR5 y comparación con la estructura derivada de los datos de SAXS.....	125
3.2.- Caracterización estructural de la región SR3-SR6 en solución.....	127
3.2.1.- Estructura de la región SR3-SR6 en solución a baja resolución	129
3.2.2.- Modelo atómico de la región SR3-SR6 y comparación con la estructura derivada de los datos de SAXS.....	130
3.3.- Caracterización estructural de la región SR7-SR9 en solución.....	133
3.3.1.- Estructura de la región SR7-SR9 en solución a baja resolución	135
3.3.2.- Comparación de la estructura cristalográfica y la estructura derivada de los datos de SAXS de la región SR7-SR9.....	136
3.4.- Caracterización estructural de la región SR6-SR9 en solución.....	137
3.4.1.- Estructura de la región SR6-SR9-B en solución a baja resolución.....	140
3.4.2.- Modelo atómico de la región SR6-SR9-B y comparación con la estructura derivada de los datos de SAXS.....	141
3.5.- Caracterización estructural de la región SR3-SR9 en solución.....	143
3.5.1.- Estructura de la región SR3-SR9 en solución a baja resolución	145
3.5.2.- Modelo atómico de la región SR3-SR9 y ajuste a los parámetros estructurales.	145
4.- ANALISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA EN LA INTERACCIÓN CON LA INTEGRINA $\alpha 6\beta 4$	147
4.1.- Fragmentos de plectina empleados en la caracterización de la interacción con la integrina $\beta 4$	148
4.2.- Fragmentos de la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$ empleados en la caracterización de la interacción con plectina	149
4.3.- Análisis de la interacción de plectina con $\beta 4$	150
DISCUSIÓN	153
1.- Estructura de la región central del dominio plakina.....	155
1.1.- El dominio SH3 de plectina	157
1.1.1.- El pseudo-sitio de unión a ligando del SH3 de plectina está alterado.....	157
1.2.- La interfase SR4-SH3 incluye una agrupación de Cys, que sugiere un posible mecanismo Redox.....	158

1.3.- La similitud entre la interacción SR4/SH3 de plectina y el complejo ankirina- β -espectrina sugiere un posible modo preferente de interacción a través de SRs	159
2.- Estructura de la región C-terminal del dominio plakina	160
3.- Flexibilidad en la región SR3-SR9 del dominio plakina de plectina.....	162
3.1.- Diferencias entre los dominios plakina de plectina y desmoplakina.....	163
4.- Implicaciones funcionales de la estructura del dominio plakina	165
4.1.- Contribución del dominio plakina a la unión a la integrina β 4	166
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA.....	173

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

1.- LA FAMILIA PLAKINA.

Las plakinas son una familia de proteínas de alto peso molecular que se expresan en tejidos sometidos a estrés mecánico, como epitelios y músculo, donde juegan un papel importante en el mantenimiento de su integridad. Las plakinas son proteínas multifuncionales que interconectan los tres sistemas de filamentos del citoesqueleto: filamentos intermedios (FI), microtúbulos y microfilamentos. Además, median el anclaje de los filamentos intermedios a la membrana plasmática a través de complejos de adhesión asociados a membrana, como desmosomas y hemidesmosomas (HDs) (Jefferson et al, 2004). Por lo tanto, se las conoce como conectores celulares o *cytolinkers*. Las plakinas pertenecen a la superfamilia de las espectrininas, aunque constituyen un grupo claramente diferenciado (Ruhrberg & Watt, 1997; Uitto et al, 1996).

En mamíferos existen 7 plakinas: plectina, desmoplakina, el antígeno 1 del penfigoide ampollar (BPAG1), el factor 1 de entrecruzamiento actina-microtúbulos (MACF1, también conocido como ACF7, trabeculina o macrofilina), envoplakina, periplakina y epiplakina (Leung et al, 2002) (Figura I1). Muchas de estas plakinas tienen varias isoformas que se generan por mecanismos de procesamiento alternativo. La expresión de plakinas es crítica para el crecimiento, desarrollo y supervivencia celular (Brown et al, 1995). En humanos, anomalías adquiridas o congénitas de plakinas causan cardiomiopatías, distrofias musculares y enfermedades de la piel (Pulkkinen et al, 1996; Ruhrberg et al, 1996b).

Las plakinas también están presentes en invertebrados; en *Drosophila melanogaster* se ha identificado un único gen plakina denominado *shortstop* (también conocido como *kakapo*), que codifica dos proteínas: Shot I y Shot II (Lee et al, 2000; Vactor et al, 1993). En *Caenorhabditis elegans*, existe un único gen plakina denominado *vab-10*, que codifica dos variantes: VAB-10A y VAB10B (Bosher et al, 2003) (Figura I1).

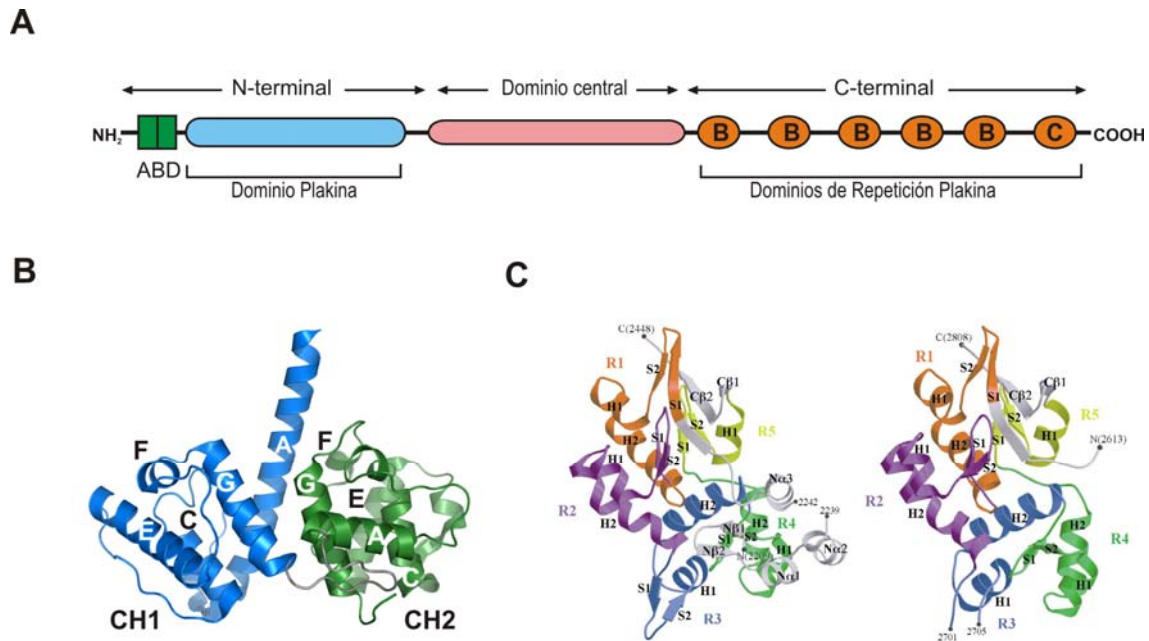


Figura 12.- Estructura modular de plakinas.- (A) Representación esquemática de la estructura modular de plectina, como una plakina prototípica. Las plakinas tienen una estructura tripartita, el dominio central separa las regiones N y C-terminal compuestas por varios dominios. (B) Representación en lazos de la estructura cristalográfica del ABD de la plectina (código PDB: 1 MB8). (García-Alvarez et al, 2003). Esta estructura está formada por dos sub-dominios de homología calponina: CH1 (azul) y CH2 (verde) unidos por un lazo corto (C) Representación en lazos de la estructura cristalográfica de dos dominios de repetición plakina (PRD) de tipo B (izquierda) y de tipo C (derecha) en desmoplakina (códigos PDB: 1LM5 y 1LM7). (Modificado de Choi et al 2002).

Las plakinas de mamífero: plectina, BPAG1a/b/n y MACF1a/b contienen cerca de su extremo N-terminal un dominio de unión a actina (ABD) similar a los presentes en otras proteínas de la superfamilia de espectrinas como distrofina, distonina, utrofina, filaminas y α -actinina (Carugo et al, 1997; Castresana & Saraste, 1995; de Arruda et al, 1990; Hemmings et al, 1992; Stradal et al, 1998). La estructura cristalográfica del ABD de plectina de humano y de ratón (García-Alvarez et al, 2003; Sevcik et al, 2004) muestra que esta región está formada por dos sub-dominios de homología calponina (CH1-CH2) unidos a través de un lazo corto y flexible. La estructura de cada CH está formada por un núcleo de cuatro α -hélices que encierran en su interior un núcleo hidrofóbico (Banuelos et al, 1998; Bramham et al, 2002). Los dos sub-dominios CH se disponen en una conformación cerrada, en la cuál se establecen extensos contactos entre los sub-dominios (Figura 12B).

Capítulo 1

Todas las plakinas, a excepción de epiplakina, contienen una región conservada de ~1000 aminoácidos, denominada *dominio plakina*, que está formado por regiones ricas en α -hélices (ver abajo) (Figura I3). Este dominio media interacciones proteína-proteína y determina la localización subcelular de las plakinas.

Plectina, desmoplakina, BPAG1e/n, periplakina y envoplakina contienen un dominio central (~1300 aminoácidos en plectina) rico en α -hélices. La secuencia de este dominio presenta héptadas repetitivas características de hélices que forman interacciones de super-hélice (*coiled-coil*). Por lo tanto se cree que el dominio central media la formación de homo-dímeros paralelos.

La región C-terminal de plectina, desmoplakina, BPAG1e/n y envoplakina contiene varias copias del denominado "*dominio de repetición plakina*" (PRD). Los PRD tienen una estructura globular formada por 4.5 copias de una unidad de 38 aminoácidos, denominada *repetición de plakina* (PR). Se conoce la estructura cristalográfica de los PRDs B y C de desmoplakina (Choi et al, 2002). Cada PR está formada por una horquilla- β seguida de dos α -hélices antiparalelas (Figura I2C). La estructura de los PRs es similar al motivo de repetición de ankirina, si bien las estructuras globales formadas por los PRs y las repeticiones de ankirina son diferentes.

Plectina contiene seis PRDs, los cinco primeros son similares al PRD de tipo B de desmoplakina, mientras que el sexto es similar al de tipo C. Se ha propuesto un modelo para esta región en plectina, en el que los seis PRDs se acomodarían en una organización circular, en la cuál los PRDs se orientan de manera antiparalela, con el sexto PRD en el centro del círculo (Janda et al, 2001). Esta organización estaría estabilizada por interacciones hidrofóbicas entre residuos que se encuentran en la superficie de cada PRD. Esta estructura se correspondería con el dominio globular en la región C-terminal, con un diámetro de 9 nm (Foisner & Wiche, 1987).

Otras plakinas como BPAG1a/b y MACF1a/b contienen en su región C-terminal múltiples copias de un motivo estructural conocido como repetición de espectrina (*Spectrin Repeat*, SR); por lo que a este subgrupo se les ha denominado

espectraplakinas (Roper et al, 2002). BPAG1a/b y MACF1a/b también contienen en su extremo C-terminal dominios de unión a Ca^{2+} de tipo mano-EF y un dominio GAR, que es homólogo a una región de la proteína GAS-2 que media la unión a microtúbulos (Sun et al, 2001). Por último, el extremo C-terminal de las plakinas frecuentemente contiene un dominio con repeticiones GSR (Gly-Ser-Arg). Epiplakina presenta una estructura atípica, que consiste en 13 PRDs y carece de otros dominios como el dominio plakina o el dominio central (Fujiwara et al, 2001)

1.1.1.- Estructura del dominio plakina.

Inicialmente en la secuencia del dominio plakina se identificaron seis regiones ricas en α -hélices, denominadas NN, Z, Y, X, W y V, que se organizan formando haces antiparalelos (Green et al, 1992). Posteriormente en el dominio plakina se identificó la presencia de dominios de repeticiones de espectrina (*Spectrin Repeat; SR*) (Baines, 2003).

Plectina, BPAG1a/b/n son las plakinas que muestran los dominios plakina más complejos, en los que se han identificado ocho SRs canónicos (SR1 a SR5 y SR7 a SR9) y un dominio SH3 (Figura I3). Entre el SR5 y el SR7 se identificó una región de ~85 aminoácidos, que previsiblemente está formada por 3 α -hélices que adoptan un plegamiento similar a los SRs canónicos, pero con hélices más cortas. Esta región se denominó SR6 y se identificó prácticamente en todas las plakinas a excepción de periplakina (Sonnenberg et al, 2007).

Los SRs se disponen de manera contigua en la secuencia a excepción del SR2 y el SR3 que están conectados por una región de longitud variable que se cree que no tiene estructura secundaria definida. En plectina, entre el SR2 y el SR3 hay una secuencia de ~20 aminoácidos, mientras que en BPAG1 tiene una longitud de ~ 120 aminoácidos.

Capítulo 1

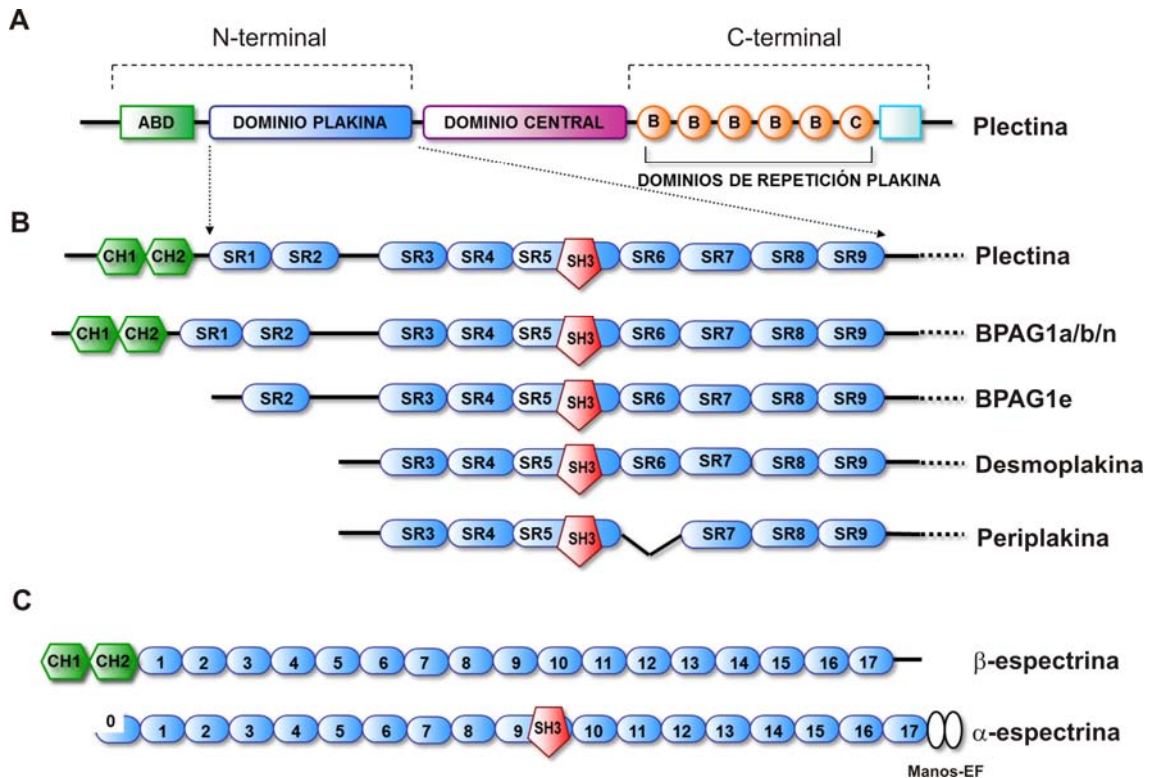


Figura 13.- Organización modular del dominio plakina.- (A).- Representación esquemática de la organización modular de la proteína plectina completa. (B).- Organización modular detallada de la región N-terminal (ABD y dominio plakina) de plectina y de otras plakinas representativas incluyendo BPAG1a/b/n, BPAG1e, Desmoplakina y Periplakina. Las repeticiones de espectrina (SRs) están enumerados según los SRs de plectina. (C).- Organización modular de las isoformas de eritrocito de α y β -espectrina. Se ilustra las similitudes con la arquitectura del dominio plakina, en la organización de tándems de SRs, la localización del ABD que precede al SR1 de β -espectrina y la inserción de un dominio SH3 en el SR9 de α -espectrina.

En algunas plakinas como desmoplakina o periplakina no se han identificado los sub-dominios SR1-SR2. En BPAG1e únicamente se ha identificado el SR2 aunque parece carece el SR1 (Sonnenberg et al, 2007). El SR1 aparece siempre en combinación con el ABD, por ejemplo en plectina y BPAG1a/b/n, lo que sugiere que el tándem ABD-SR1 se ha podido incorporar en las plakinas de manera conjunta a partir de una espectrina ancestral (Pascual et al, 1997a). En plectina, el SR1 está unido al ABD adyacente por un conector aparentemente flexible de ~10 aminoácidos de longitud.

El conocimiento estructural del dominio plakina en plakinas se limitaba hasta hace poco a las estructuras cristalográficas de la región SR3-SR4 de BPAG1 (Jefferson et al, 2007) y de la región de SR1-SR2 plectina (Sonnenberg et al, 2007). La estructura estos SRs de BPAG1 y plectina es similar a la descrita inicialmente en espectrina

(Pascual et al, 1997b; Yan et al, 1993). Cada SR consiste en ~100 aminoácidos y está formado por 3 α -hélices (A, B y C) que se unen entre sí mediante lazos cortos con una topología: arriba-abajo-arriba formando un haz con giro levógiro, estabilizado por interacciones hidrofóbicas en el interior del haz (Figura I4). Las tres α -hélices contienen héptadas repetitivas (*abcdefg*) características de hélices anfipáticas, en las cuáles, las posiciones *a* y *d* están ocupadas por residuos hidrofóbicos que se sitúan en el mismo lado de la hélice y se orientan hacia el interior del haz. Los SRs tienen una estructura alargada con unas dimensiones de ~ 50-60 Å de longitud y ~ 20-25 Å de ancho. Los extremos N y C-terminal de cada SR se disponen en los extremos opuestos del eje longitudinal del haz.

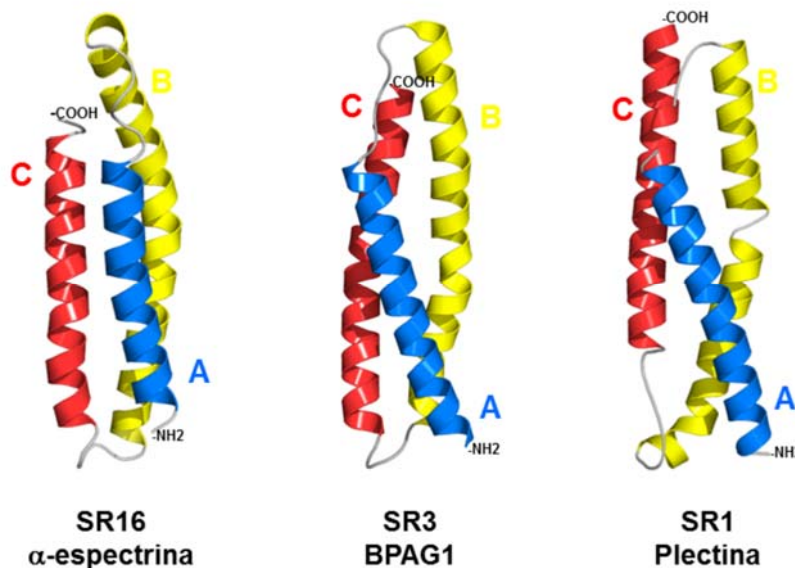


Figura I4.- Estructura de SRs Representación en lazos de la estructura del SR16 de α -espectrina de pollo obtenida mediante RMN (código PDB: 1AJ3) (izquierda), y de las estructuras cristalográficas del SR3 de la plakina BPAG1 (código PDB: 2IAK) (centro) y del SR1 de plectina (código PDB: 2ODU) (derecha). Los tres SRs se muestran en la misma orientación, las α -hélices A, B y C están coloreadas en azul, amarillo y rojo, respectivamente.

En el par SR3-SR4 de BPAG1 y SR1-SR2 de plectina, los dos SRs se disponen de manera contigua, en una disposición conocida como “*en tándem*”, y se unen entre sí a través de una α -hélice continua formada por la fusión de la hélice C del primer SR con la hélice A del segundo SR. Esta hélice continua (C-A) se expande por ambos sub-dominios a lo largo del eje longitudinal de la molécula, en consecuencia la estructura de cada par de SRs tiene una forma alargada (Figura I5). Esta disposición contigua de los SRs adyacentes y su unión a través de una α -hélice continua no es

Capítulo 1

exclusiva de plakinas y se ha observado en otros pares de SRs, como en α y β -espectrinas y α -actinina (Djinovic-Carugo et al, 1999; Grum et al, 1999; Stabach et al, 2009).

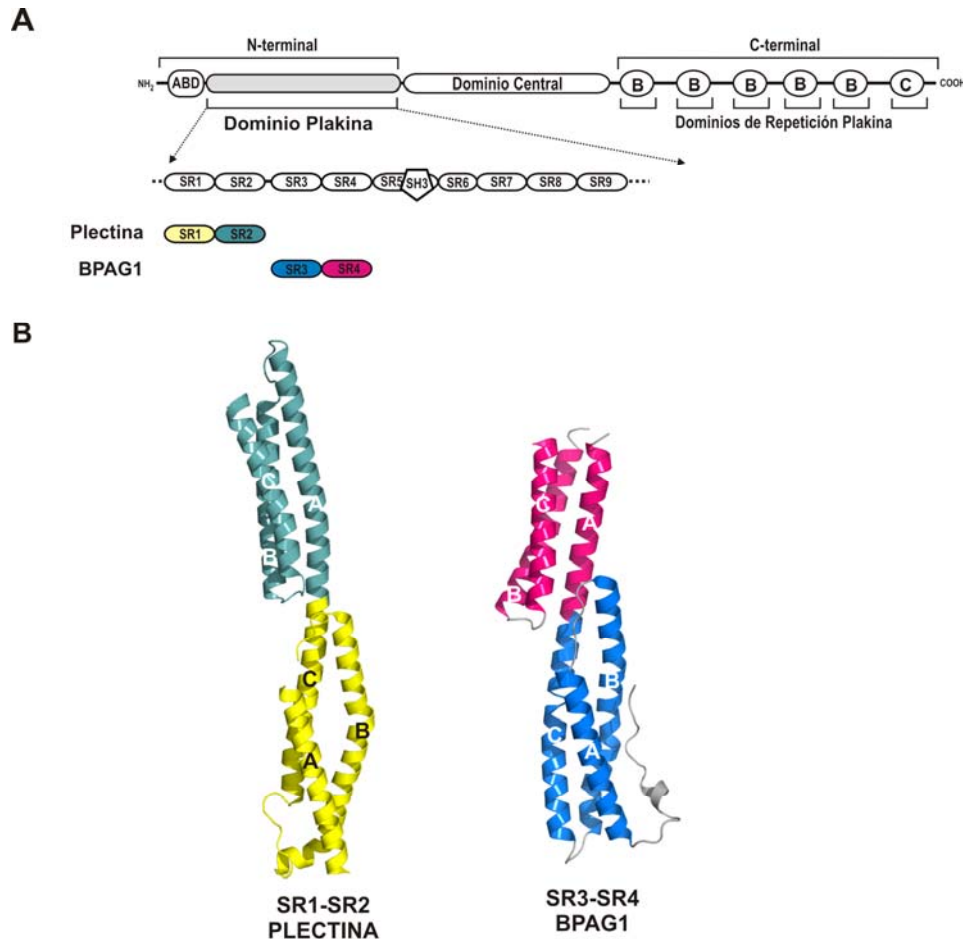


Figura 15.- Estructura de pares de SRs en plakinas. (A).- Representación esquemática de la estructura modular de plectina y una vista aumentada de la estructura del dominio plakina. (B).- Representación en lazos de la estructura cristalográfica del par SR1-SR2 (amarillo y azul) del dominio plakina de plectina, (código PDB: 2ODU) (izquierda) y de la estructura cristalográfica del par SR3-SR4 (azul y rosa) del dominio plakina la BPAG1 (código PDB: 2IAK) (derecha). Los dos SRs adyacentes se unen a través de una α -hélice continua C-A que se expande por ambos sub-dominios. Los dos pares de SRs de la figura se muestran la misma orientación.

Además de los nueve SRs, el dominio plakina contiene un dominio SH3 que se localiza entre las hélices B y C del SR5 (Sonnenberg et al, 2007). La presencia del dominio SH3 en el SR5 de plakinas es equivalente a la inserción de un dominio SH3 entre las hélices B y C del SR central (SR9) de α -espectrina (Pascual et al, 1997a) (Figura I3). Los dominios SH3 están formados por 5 hebras- β que se agrupan en una estructura de barril- β (Figura I6). Los dominios SH3 son importantes porque suelen participar en interacciones proteína-proteína, uniéndose frecuentemente a

ligandos que contienen secuencias ricas en Pro del tipo PxxP (siendo x cualquier aminoácido conocido) y que adoptan una conformación de hélice de poli-Pro de tipo II (Kaneko et al, 2008). Estos ligandos son reconocidos por tres bolsillos hidrofóbicos que se forman en la superficie de los dominios SH3, entre los lazos RT (que une las hebras $\beta 1$ - $\beta 2$) y el lazo n-Src (que une las hebras $\beta 2$ - $\beta 3$).

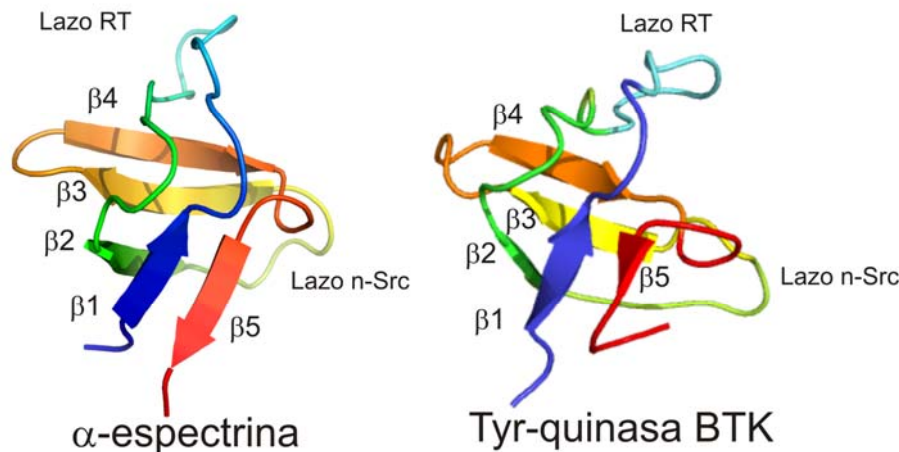


FIGURA 16.- Estructura de un dominio SH3 canónico.- Representación en lazos de la estructura cristalográfica del SH3 de α -espectrina de pollo (código PDB: 1SHG) (izquierda) y de la estructura por RMN del SH3 de la Tyr-quinasa BTK (código PDB: 1QLY) (derecha). Las 5 hebras- β ($\beta 1$ - $\beta 5$) están coloreadas en azul, verde, amarillo, naranja y rojo respectivamente, siguiendo el mismo esquema de color en las dos estructuras. El lazo RT que une las hebras $\beta 1$ - $\beta 2$ está indicado sobre la figura.

En espectrinas, los conjuntos de SRs contribuyen a la estabilidad y elasticidad del citoesqueleto, gracias a la flexibilidad que existe entre estos sub-dominios. En base a la comparación de estructuras de pares de SRs se han descrito dos modelos de flexibilidad en agrupaciones de SRs (Grum et al, 1999). Según el modelo de extensión existiría una reorganización de los haces de hélices de los SRs por un desplazamiento axial cuando se someten a fuerzas mecánicas. En el modelo de doblamiento la aplicación de fuerzas resultaría en una deformación de la organización lineal de los grupos de SRs a través de movimientos de bisagra localizados en las zonas de unión entre SRs.

1.2.- Plakinas en mamíferos

Desmoplakina es un componente de los desmosomas, que son complejos asociados a membrana que median la adhesión célula-célula. Desmoplakina se localiza en la

Capítulo 1

parte interna de estos complejos, donde media el anclaje de los FI a la superficie celular (Franke et al, 1987; Green et al, 1990). Esta unión contribuye al ensamblaje y la estabilización de los desmosomas y por tanto, al mantenimiento de la integridad y arquitectura tisular (Gallicano et al, 1998). La región N-terminal de desmoplakina interacciona con las proteínas desmosomales: placoglobina y placofilina, (Bornslaeger et al, 2001; Hatzfeld et al, 2000; Kowalczyk et al, 1997; Smith & Fuchs, 1998); además, se une a la región citoplasmática de las cadherinas desmosomales, desmogleína y desmocolina (Kowalczyk et al, 1997; Smith & Fuchs, 1998; Witcher et al, 1996). Esta región N-terminal de desmoplakina es suficiente para incorporar esta proteína a los desmosomas (Smith & Fuchs, 1998). El gen de desmoplakina codifica dos variantes: DPI (322 kDa) y DPII (259 kDa) (Green et al, 1990; Virata et al, 1992) que son el resultado del procesamiento alternativo que afecta al dominio central, que está mayoritariamente ausente en la isoforma DPII. Las dos isoformas se expresan en todos los tipos de epitelios, aunque la isoforma DPI también lo hace en las células musculares del corazón (Angst et al, 1990).

Desmoplakina tiene una estructura tripartita, con un dominio central alargado está flanqueado por las regiones N- y C-terminal (O'Keefe et al, 1989). En la región N-terminal, desmoplakina contiene un dominio plakina, mientras que la región C-terminal contiene tres dominios de repetición plakina (PRD) del tipo: A, B y C (Green et al, 1990) (Figura I1). El lazo entre el PRD de tipo B y el de C es responsable de la unión de desmoplakina a FI (Kouklis et al, 1994; Stappenbeck et al, 1993).

El gen *BPAG1* codifica diversas isoformas, siendo las principales BPAG1a, BPAG1b y BPAG1e, que presentan diferentes combinaciones de dominios funcionales y patrones de expresión específicos (Leung et al, 2001). La isoforma BPAG1a se expresa en altos niveles en el sistema nervioso (Leung et al, 2001). BPAG1b se expresa en el corazón, músculo esquelético y cartílago. Estructuralmente, BPAG1a y BPAG1b son muy similares. Su región N-terminal está formada por un dominio de unión a actina (ABD) y un dominio plakina. La región C-terminal contiene múltiples copias de dominios de repetición de espectrina, un dominio EF de unión a Ca^{+2} , un dominio GAR y un dominio GSG (Figura I1). Las dos isoformas se diferencian en que BPAG1b contiene además un dominio PRD de tipo A, que se une a los FI y que

no está presente en BPAG1a. La variante epitelial BPAG1e (denominada también BP230) es un componente de los hemidesmosomas de los queratinocitos de la epidermis. Se identificó como un antígeno de autoanticuerpos IgG en pacientes que sufren una enfermedad autoinmune de la piel denominada “*penfigoide ampollar*” (Stanley, 1993). BPAG1e contiene un dominio plakina en la región N-terminal, pero carece de un ABD. La región C-terminal contiene dos PRD de tipo B y C. Se ha descrito una isoforma neuronal aparentemente minoritaria, BPAG1n (distonina), que es similar a BPAG1e, con la única excepción de la presencia de un dominio de unión a actina (ABD) en el extremo N-terminal.

MACF1 contiene sitios de unión a microfilamentos de actina en la región N-terminal y a microtúbulos la región C-terminal, actuando como integrador de la dinámica de microtúbulos dependiente de actina (Kodama et al, 2003). El gen *MACF1* es el homólogo en vertebrados del gen *shortstop/kakapo* de invertebrados. Este gen codifica dos isoformas mayoritarias MACF1a y MACF1b que son similares en estructura a BPAG1a y BPAG1b respectivamente (Lin et al, 2005) (Figura I1). MACF1 tiene una expresión ubicua localizándose los mayores niveles de expresión en tejido nervioso, músculo esquelético, miocardio y epidermis (Karakesisoglou et al, 2000; Leung et al, 1999).

Periplakina (195kDa) y envoplakina (210kDa) se identificaron como componentes de la envuelta córnea de los epitelios estratificados (Steinert et al, 1999) Se localizan también en desmosomas, asociados con los FI de los queratinocitos diferenciados de las capas suprabasales de la epidermis (Simon & Green, 1984) (Ruhrberg et al, 1996a). El dominio central de envoplakina está flanqueado en la región N-terminal por un dominio plakina y en la región C-terminal por un dominio PRD de tipo C, éste último ausente en periplakina.

Epiplakina se identificó como un autoantígeno en pacientes que sufrían de una enfermedad cutánea ampollar subepidérmica parecida al “*penfigoide ampollar*” (Fujiwara et al, 1996). A diferencia del resto de plakinas, la estructura de epiplakina

Capítulo 1

consiste exclusivamente en 16 dominios de repetición plakina (PRD) de tipo B (Spazierer et al, 2003) (Figura I1).

2.- PLECTINA.-

Plectina (Herrmann & Wiche, 1987) es una plakina prototípica, que se expresa en una amplia variedad de tejidos entre los que se incluyen: músculos, epitelios y tejidos neuronales (Wiche, 1998b) excepto en neuronas (Errante et al, 1994). Originalmente, esta proteína se identificó como un componente mayoritario de extractos enriquecidos en filamentos intermedios (FI) de células C6 de gliomas de rata (Pytela & Wiche, 1980).

Plectina es una proteína muy versátil que entrecruza los componentes del citoesqueleto entre sí (Seifert et al, 1992; Svitkina et al, 1996) y se asocia con los tres sistemas que lo componen. Por un lado, se asocia a filamentos de actina (Sanchez-Aparicio et al, 1997; Seifert et al, 1992) jugando un papel importante en la regulación de la dinámica de éstos, a través de la vía del fosfatíl-inositol bifosfato (PIP2) (Andra et al, 1998). También interacciona con microtúbulos (Herrmann & Wiche, 1987; Svitkina et al, 1996) y con filamentos intermedios, conectando éstos a estructuras asociadas a membrana (Wiche, 1998b). Plectina juega un papel importante en la organización de los FI, entrecruzando entre sí FI de vimentina (Foisner et al, 1988; Wiche & Baker, 1982) y en la regulación de la dinámica de estos hacia la periferia (Steinbock et al, 2000). La región C-terminal alberga un sitio de unión a FI entre el PRD5 y el PRD6 (Nikolic et al, 1996) mientras que la cola C-terminal a continuación del sexto PRD contiene sitios de unión a microtúbulos (Sun et al, 2001).

En epitelios estratificados como la piel, plectina se localiza en la parte basal de los queratinocitos en contacto con la lámina basal (Wiche et al, 1984) formando parte de los hemidesmosomas (Gache et al, 1996; Hieda et al, 1992). La función de plectina en estos complejos es unir los FI de queratina a la lámina basal, a través de la interacción de plectina con la región citoplasmática de la subunidad $\beta 4$ de la

integrina $\alpha 6\beta 4$ y con el antígeno 2 del penfigoide ampollar (BPAG2 o BP180) (de Pereda et al, 2009b; Litjens et al, 2006).

Se ha descrito la presencia de plectina en los desmosomas (Eger et al, 1997), que son complejos de adhesión entre célula-célula. Plectina también conecta la envuelta nuclear a los filamentos intermedios a través de la unión a nesprina-3 α , en la membrana nuclear externa (Ketema et al, 2007; Wilhelmsen et al, 2005). Es un componente de las adhesiones focales de fibroblastos (Sanchez-Aparicio et al, 1997; Seifert et al, 1992) que se localizan en los extremos de fibras de estrés contráctiles que contienen actina/miosina (Abercrombie & Dunn, 1975; Burridge & Chrzanowska-Wodnicka, 1996) y está implicada en la formación de sistema de FI *de novo* y en el recambio de adhesiones focales (Burgstaller et al, 2010).

En el músculo estriado, plectina se asocia con las líneas Z de los sarcómeros (Wiche et al, 1983) y se localiza en los costámeros, donde se asocia con FI de desmina y con componentes del complejo glicoproteico de la distrofina (Hijikata et al, 2008; Reipert et al, 1999; Rezniczek et al, 2007; Schroder et al, 1999).

2.1.- Estructura del gen *PLEC*.

En humanos, el locus de plectina se localiza cerca de la región del telómero del cromosoma 8, en la posición 8q24. El gen *PLEC* consiste en 32 exones que se extienden sobre 32kb a lo largo de la banda q24 (Liu et al, 1996). Este gen contiene múltiples exones 1 alternativos (1, 1a, 1b y 1c) que codifican para una región de diferente longitud que precede al ABD (brazo N-terminal). Los exones 2-8 del gen de plectina codifican para el ABD, mientras que los exones 9-30 lo hacen para el dominio plakina. El dominio central y los dominios PRD están codificados cada uno por un único exón (31 y 32, respectivamente) de gran tamaño (3 y 6 kb respectivamente).

En humanos se han identificado cuatro exones 1 alternativos que mediante procesamiento alternativo dan lugar a las variantes 1, 1a, 1b y 1c; de las cuales 1a y 1c están presentes en queratinocitos (Andra et al, 2003). En rata y ratón se han

Capítulo 1

descrito cuatro y 11 exones 1, respectivamente (Elliott et al, 1997; Fuchs et al, 1999; Wiche, 1998a). La versatilidad de plectina reside en esta variedad de transcriptos que da lugar a isoformas que varían en la secuencia del extremo N-terminal (brazo N-terminal), la cual determina la diferente localización sub-celular de plectina (Fuchs et al, 1999; Rezniczek et al, 2003). Cada isoforma muestra diferentes preferencias en la unión a determinadas estructuras celulares, como hemidesmosomas, adhesiones focales, costámeros, mitocondrias, microtúbulos o líneas Z de los sarcómeros.

Por otro lado, se ha descrito una variante de plectina que carece del dominio central a causa de un procesamiento alternativo que elimina el exón 31 (Fuchs et al, 2005).

2.2.- Deficiencia en plectina.

Defectos en la expresión de plectina causados por mutaciones recesivas autosómicas en el gen *PLEC* dan lugar a una severa enfermedad hereditaria de la piel conocida como “*epidermolisis ampollar simple*” (EBS) que puede aparecer asociada a distrofia muscular (EBS-MD) o a atresia pilórica (EBS-PA) (Gache et al, 1996; McLean et al, 1996; Pulkkinen et al, 1996). Además se ha descrito una mutación puntual en el dominio central (R2110W) que causa una variante autosómica dominante denominada EBS Ogná (Koss-Harnes et al, 2002). A nivel histológico las mutaciones en plectina que ligadas a EBS causan defectos en los hemidesmosomas, con ruptura del anclaje de los FI que causa la separación del tejido dentro de los queratinocitos basales (Pulkkinen et al, 1996). La inactivación del gen *PLEC* en ratón causa defectos severos en la piel que son letales tras el parto. La estructura de los hemidesmosomas no parece afectada en estos animales, pero se aprecia una reducción en su número, además de anomalías en músculo esquelético y cardíaco (Andra et al, 1997).

3.- HEMIDESMOSOMAS.

Los hemidesmosomas (HDs) son complejos que median la adhesión de las células epiteliales a la membrana basal mediante la unión del sistema de FI de queratina a proteínas de la matriz extracelular contribuyendo a la resistencia mecánica de estos tejidos (Borradori & Sonnenberg, 1999; Koster et al, 2004).

En función de los componentes que forman estos complejos, se distinguen dos tipos de HDs: tipo I y tipo II (Litjens et al, 2006). Los HDs de tipo I se localizan en epitelios complejos estratificados y pseudo-estratificados, como la piel y están formados por cinco proteínas, tres de ellas transmembrana: integrina $\alpha 6\beta 4$ (Jones et al, 1991; Sonnenberg et al, 1991; Stepp et al, 1990), antígeno 2 del penfigoide ampollar o BP180 (Giudice et al, 1992) y tetraspanina CD151 (Sterk et al, 2000); y dos proteínas citoplasmáticas de la familia plakina: plectina (McLean et al, 1996; Wiche et al, 1991) y BPAG1e (BP230) (Stanley et al, 1988). Los epitelios simples como el intestino, contienen HDs de tipo II, que son más rudimentarios y que están formados únicamente por integrina $\alpha 6\beta 4$ y plectina. (Figura I7)

A pesar de que estos complejos median adhesiones estables, son estructuras dinámicas que se desensamblan cuando las células necesitan separarse de la membrana basal, durante los procesos de división, diferenciación o migración celular (Geuijen & Sonnenberg, 2002; Tsuruta et al, 2003). Una alteración en la correcta expresión de los componentes de los HDs produce fragilidad en la piel y da lugar a varios tipos de desórdenes epiteliales (Christiano & Uitto, 1996).

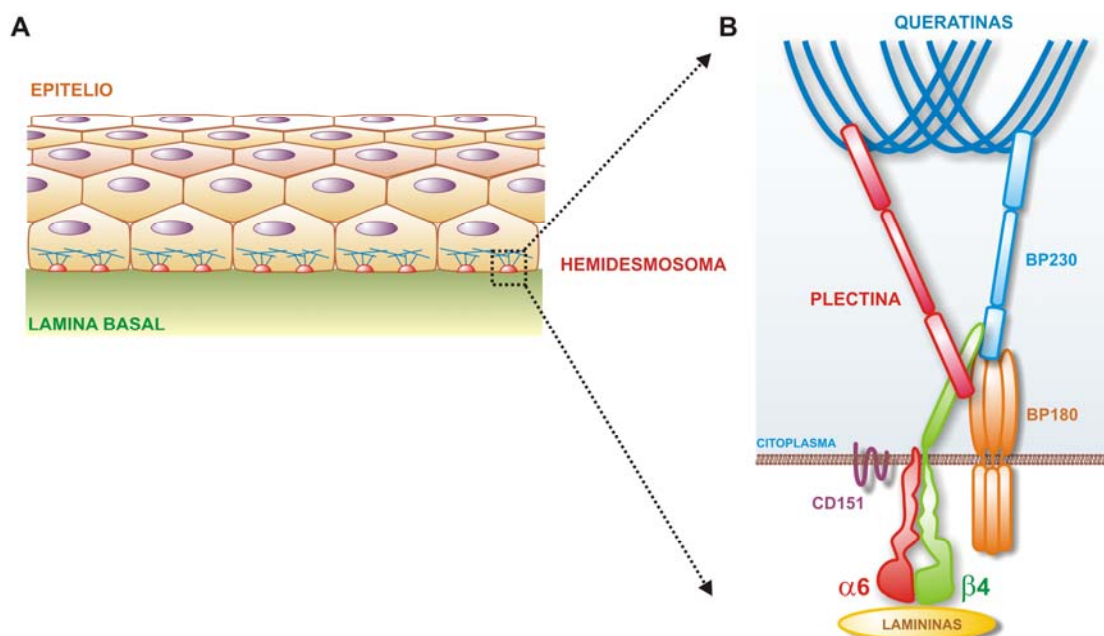


Figura I7.- Organización estructural de los hemidesmosomas (A) Representación esquemática de los HDs que unen las células epiteliales a la membrana basal. (B).- Representación esquemática de los componentes de los HDs de tipo I y las interacciones que unen los receptores de adhesión al citoesqueleto de queratinas.

3.1.- La integrina $\alpha 6\beta 4$.

Las integrinas son una familia de receptores transmembrana que transmiten señales bidireccionales entre el citoplasma y la matriz extracelular (Hynes, 2002; van der Flier & Sonnenberg, 2001). Las integrinas son heterodímeros no covalentes formados por la combinación de subunidades α y β . Estas subunidades son glicoproteínas transmembrana de tipo I que tiene una región extracelular de gran tamaño y colas citoplasmáticas generalmente cortas.

La integrina $\alpha 6\beta 4$ es un receptor de lamininas, con preferencia por la laminina-332 (laminina 5) (Niessen et al, 1994; Sonnenberg et al, 1991; Stepp et al, 1990) la cual, es un componente importante de la membrana basal de la epidermis. En epitelios $\alpha 6\beta 4$ se localiza en la cara basal de la membrana plasmática, donde forma parte de los HDs (Wilhelmsen et al, 2006). A diferencia de otras integrinas que se asocian a filamentos de actina, $\alpha 6\beta 4$ lo hace a FI de queratina a través de otros componentes de los HDs como plectina y BP230. Además del papel que juega en la formación y función de los HDs, la integrina $\alpha 6\beta 4$ también participa en el control del crecimiento celular (Mainiero et al, 1995), migración celular y tumorigénesis (Gambaletta et al, 2000) y supervivencia de las células epiteliales y células tumorales (Bachelder et al, 1999).

En humanos, mutaciones en los genes que codifican para la subunidad $\alpha 6$ o la subunidad $\beta 4$ causan *epidermolisis ampollar junctional* asociada con atresia pilórica (PA-JEB) (Niessen et al, 1996; Pulkkinen et al, 1997; Pulkkinen et al, 1998; Takizawa et al, 1997; Vidal et al, 1995). Esta enfermedad se caracteriza por fragilidad de la piel y ampollas, asociado con una separación de la dermis y la epidermis y la formación de HDs más rudimentarios (McMillan et al, 1998). En ratones, mutaciones en la región citoplasmática de la subunidad $\beta 4$, da lugar a defectos en la formación de los HDs y adhesión celular (Murgia et al, 1998).

3.1.1.- Estructura de la región citoplasmática de la subunidad $\beta 4$.

La región citoplasmática de la subunidad $\beta 4$ es inusualmente larga (~1000 aminoácidos) en comparación con los ~50 aminoácidos que contienen otras

subunidades β de integrinas (Hogervorst et al, 1990; Suzuki & Naitoh, 1990; Tamura et al, 1990). Esta región citoplasmática muestra una estructura modular que contiene un dominio Calx- β con homología a los dominios de unión a calcio de los intercambiadores Na^+ - Ca^{+2} en la región N-terminal (May & Ponting, 1999; Schwarz & Benzer, 1997), cuatro dominios de Fibronectina de tipo III (FnIII-1,4) organizados en dos pares y separados por una región denominada "*segmento conector*" (SC) y una cola C-terminal (CCT) de ~85 aminoácidos que se encuentra a continuación del FnIII-4 (Figura 18A).

Se conoce la estructura cristalográfica del dominio Calx- β (Alonso-García et al, 2009) y de los dominios FnIII-1,2 de $\beta 4$ (de Pereda et al, 1999). Estos dominios tiene una extensión de ~100 aminoácidos. El Calx- β y los dominios FnIII pertenecen a la superfamilia de dominios de inmunoglobulinas, sus estructuras están compuestas por dos láminas- β que forman un sándwich- β , si bien la conectividad de las hebras- β es diferente entre el Calx- β y los FnIII.

La región citoplasmática de la subunidad $\beta 4$ es responsable de la mayoría de las interacciones intracelulares de la integrina $\alpha 6\beta 4$, incluyendo las interacciones con otros componentes de los HDs. La región de la subunidad de $\beta 4$ que incluye el primer par de dominios de FnIII y los primeros 36 aminoácidos del segmento conector están implicados en la localización de $\beta 4$ en los HDs (Niessen et al, 1997; Schaapveld et al, 1998; Spinardi et al, 1993). Esta región es necesaria y suficiente para la incorporación de plectina en los HDs (Niessen et al, 1997; Nievers et al, 1998; Sanchez-Aparicio et al, 1997).

3.2.- Interacción entre plectina y la integrina $\alpha 6\beta 4$.

La interacción entre plectina y $\alpha 6\beta 4$ es esencial para el ensamblaje y la estabilidad de los HDs (Murgia et al, 1998; Nievers et al, 1998) y es un paso fundamental en la formación de estos complejos, ya que facilita la incorporación de otras proteínas, como BP180 y BP230 (Schaapveld et al, 1998). Los contactos entre plectina y la región citoplasmática de $\beta 4$ tienen lugar en múltiples sitios.

El sitio primario de unión se localiza en el ABD de plectina y una región de $\beta 4$ que incluye los FnIII-1,2 y la región N-terminal del SC (Geerts et al, 1999; Rezniczek et

Capítulo 1

al, 1998). La interacción en solución en este sitio primario muestra una afinidad moderada, siendo la $K_d \sim 30 \mu\text{M}$ (de Pereda et al, 2009a; Garcia-Alvarez et al, 2003). La unión del ABD de plectina a $\beta 4$ previene la asociación del ABD con filamentos de actina (Geerts et al, 1999).

La resolución de la estructura cristalográfica del complejo por el ABD de plectina unido al FnIII-1,2 y la región N-terminal del SC de $\beta 4$, reveló con detalle como se produce esta interacción e identificó los elementos críticos de ésta (Figura 18B) (de Pereda et al, 2009a). La mayor zona de contacto se establece entre el sub-dominio CH1 del ABD y el FnIII-2 de $\beta 4$. Parte del SC forma parte de la interfase de unión, situándose entre el CH1 y el FnIII-2. El dominio FnIII-1 proporciona contactos adicionales. Un pequeño fragmento de plectina que precede al CH1 también contacta con el FnIII-2 de $\beta 4$; en cambio el sub-dominio CH2 no interacciona directamente con la integrina $\beta 4$.

La superficie de interacción de $\beta 4$ se centra en los residuos básicos R1225, K1279 y R1281 del FnIII-2, que están enfrentados hacia una superficie ácida en el CH1 de plectina. Dos mutaciones puntuales en dos de estos residuos, R1225H y R1281W, causan formas no letales de epidermolisis bullosa (Nakano et al, 2001; Pulkkinen et al, 1998). Estas mutaciones destruyen puentes salinos intermoleculares esenciales y causan la inhibición de la interacción (Koster et al, 2001) (de Pereda et al, 2009a).

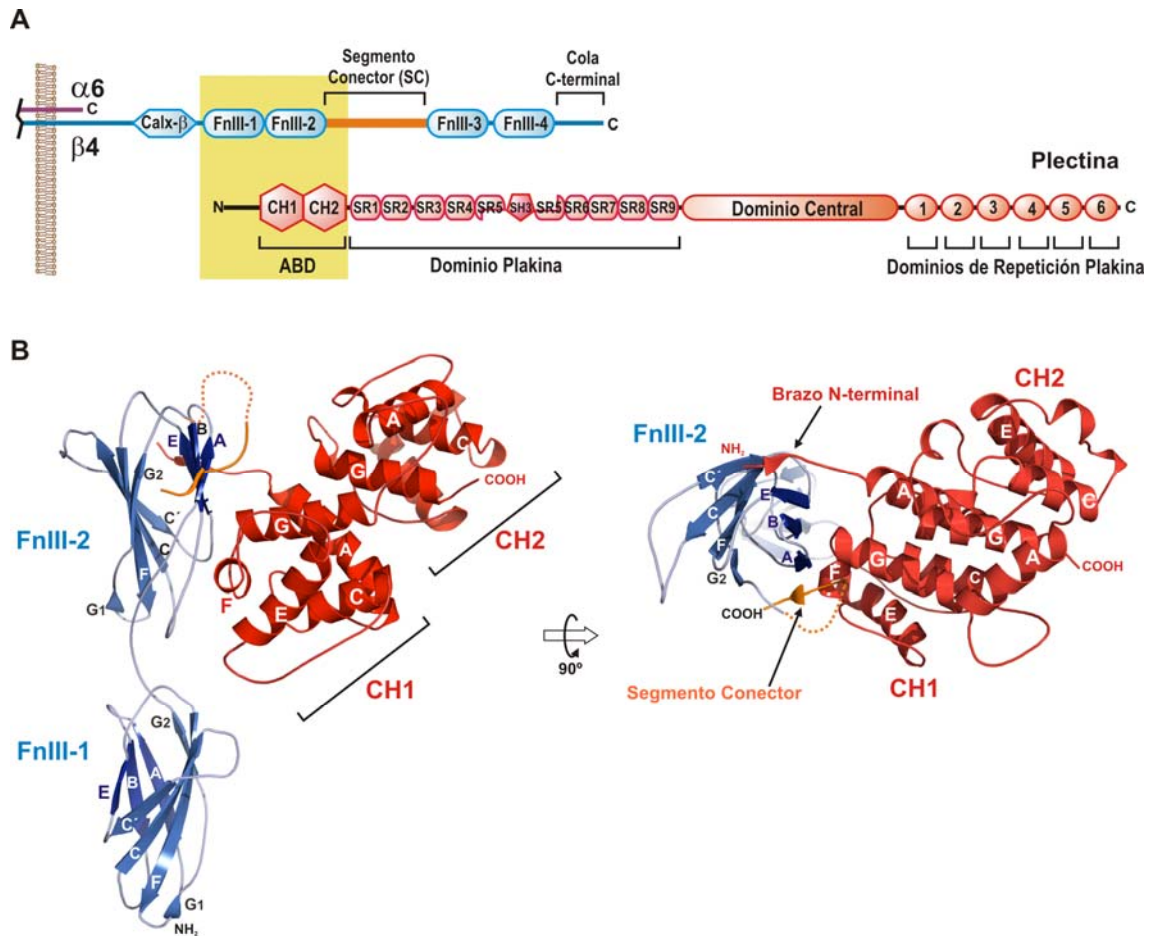


Figura 18.- Estructura del complejo plectina- $\beta 4$.- (A)- Representación esquemática de la organización modular de plectina y la región citoplasmática de la integrina $\alpha 6 \beta 4$. Las regiones de ambas proteínas correspondientes al sitio primario de interacción, están representadas en amarillo, cuya estructura se muestra en el panel B. (B).- Representación en lazos en dos vistas ortogonales de la integrina $\beta 4$ (en azul y naranja) unido a plectina (en rojo) (código PDB: 3F7P). Modificado a partir de (de Pereda et al, 2009a)

Se han descrito sitios secundarios de unión a $\beta 4$ en el dominio plakina de plectina (Koster et al, 2004). El segmento 284-1154 que corresponde aproximadamente a la región SR1-SR7 del dominio plakina interacciona con $\beta 4$ en experimentos de dos híbridos en levaduras y en ensayos de co-inmunoprecipitación en lisados de células COS-7. El fragmento 1-606, que incluye el SR1-SR2 y parte del SR3, interacciona con un fragmento de $\beta 4$ que incorpora la mutación R1228W, la cual inhibe la unión al ABD de plectina. Estas regiones del dominio plakina interaccionan con el extremo C-terminal del SC de $\beta 4$ y con otra región que incluye el dominio FnlII-4 y la cola C-terminal (CCT) (Figura 19).

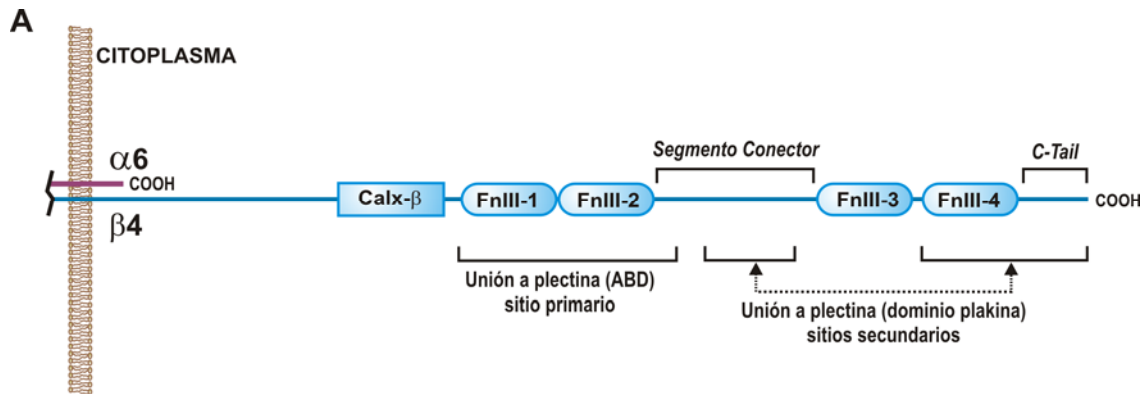


Figura 19.- Representación esquemática de los sitios de unión a plectina en la región citoplasmática de la integrina β4

Estos sitios secundarios de unión no son esenciales ni suficientes para incorporar plectina a los HDs, aunque parecen desempeñar una función estabilizadora de la interacción. Se ha propuesto un modelo secuencial de la interacción entre plectina y β4. En una primera etapa plectina se incorpora a los HDs mediante la interacción con β4 a través del sitio primario de unión. Esta interacción induciría un cambio conformacional en la región citoplasmática de β4, a partir del cuál, los sitios secundarios situados en el SC y en la cola C-terminal (CCT) de β4 quedarían expuestos para interactuar con el dominio plakina de plectina y con otras proteínas de los HDs como BPAG1e.

OBJETIVOS

Capítulo 2

El objetivo general de esta tesis es profundizar en el conocimiento estructural del dominio plakina de plectina, como modelo para el resto de las plakinas, y analizar el papel de esta región en la interacción de plectina con otras proteínas. Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Elucidación de la estructura 3D de fragmentos del dominio plakina de plectina mediante cristalografía de rayos-x.
2. Caracterización de la estructura en solución del dominio plakina de plectina mediante dispersión de rayos-x a bajo ángulo.
3. Análisis de la contribución del dominio plakina de plectina a la interacción con la región citoplasmática de la subunidad $\beta 4$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIA.

Los fragmentos de plectina y de la integrina $\beta 4$ humanas empleadas en este trabajo se produjeron de forma heteróloga en *E.coli*. El siguiente esquema resume la estrategia empleada para la construcción de los vectores de expresión (Figura M1).

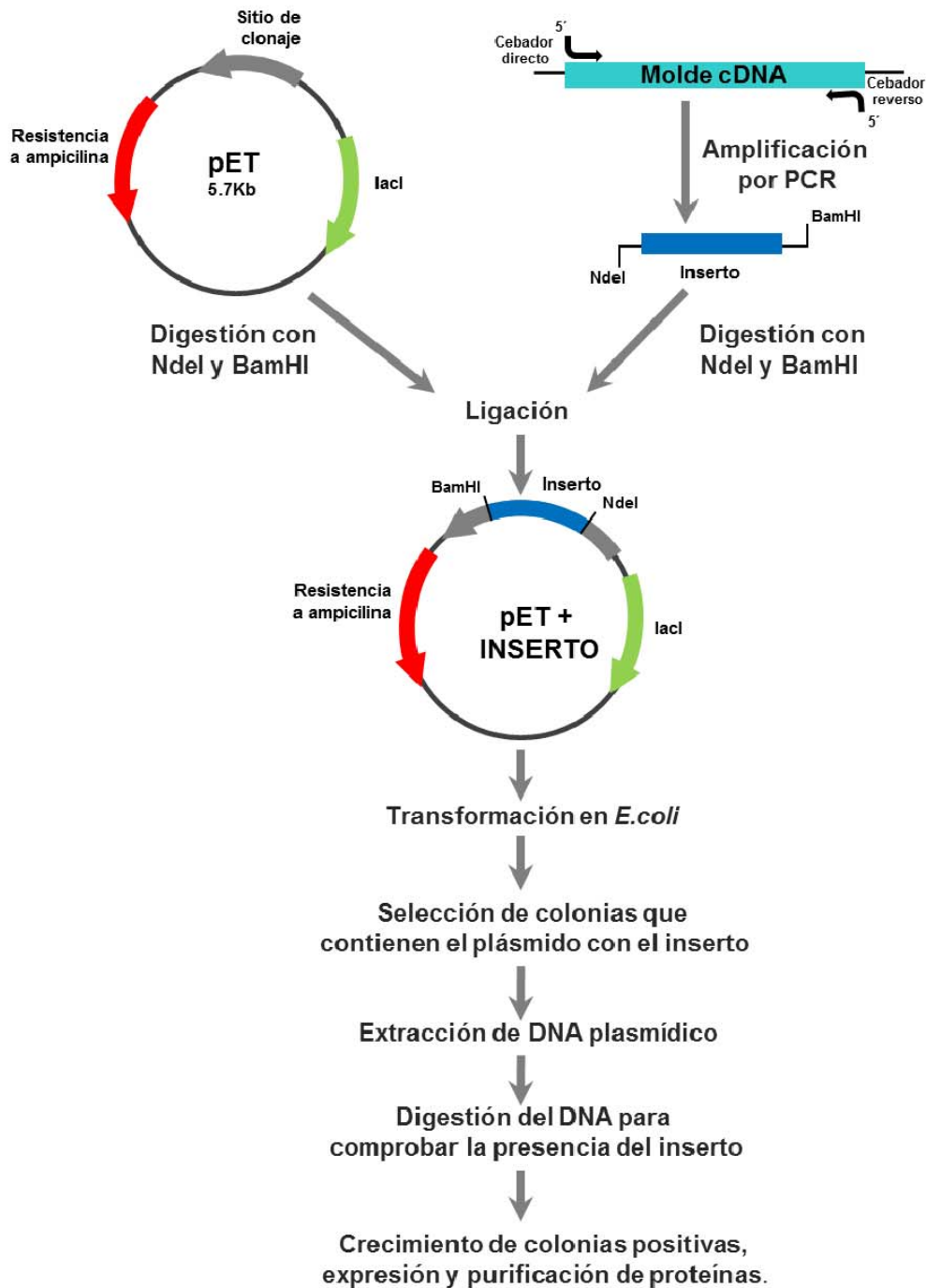


Figura M1.- Estrategia seguida para la producción de proteínas recombinantes del dominio plakina de plectina y de la región citoplasmática de $\beta 4$.

Capítulo 3

1.1.- Vectores empleados.

Para la expresión de proteínas en *E.coli* se utilizó el vector pET15b (Novagen) y un derivado de éste denominado pETV15b (Alonso-García et al, 2009).

Estos vectores contienen:

1.- Un gen de resistencia a ampicilina (Amp^r), que permite seleccionar las colonias que incorporan el vector en un medio selectivo.

2.- El promotor T7 específico de la T7 RNA polimerasa, la cual es inducible con IPTG en la cepa BL21 (DE3).

3.- Una secuencia que en el caso del vector pET15b codifica para una cola de seis His seguida de una secuencia reconocida por trombina. El vector pETEV15b se diferencia en que codifica una cola de ocho His seguida por una secuencia reconocida por la proteasa TEV del virus del grabado del tabaco (Figura M2).

4.- Una secuencia con sitios de corte único por las enzimas de restricción NdeI, XhoI y BamHI, utilizados para insertar los cDNA de interés.

De manera rutinaria se utilizó el vector pETEV15b. En ambos casos cuando el producto expresado se digiere con la correspondiente proteasa, el polipéptido GSHM permanece en el extremo N-terminal de la proteína.

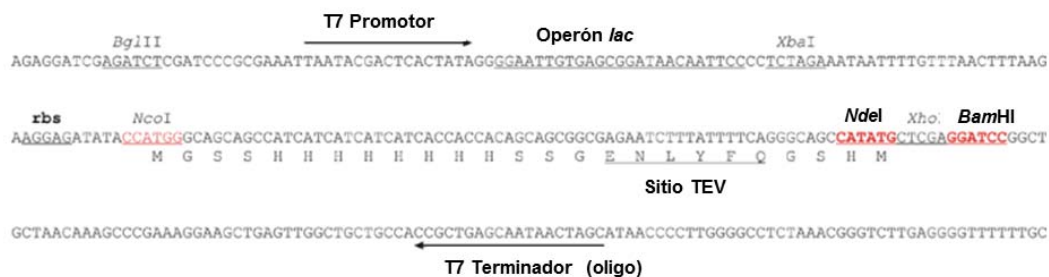


Figura M2.- Secuencia de nucleótidos del vector pETEV15b.- Se representan los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NdeI y BamHI, el sitio de reconocimiento para la proteasa TEV y las secuencias del vector que hibridan con los oligonucleótidos T7 Promotor y T7 Terminador.

1.2.- Cepas de *E.coli*.

En este trabajo se emplearon las cepas de *E. coli* DH5a y BL21(DE3)T1 según se indica en la Tabla M1

Tabla M1.- Cepas de *E.coli* usadas para la construcción y expresión de proteínas

Cepa bacteriana	Uso
DH5 α	Mantenimiento y producción de DNA
BL21 (DE3)T1	Expresión de proteínas

1.3.- Medios de cultivo.

Medios líquidos: Los cultivos de *E.coli* se crecieron en el medio Terrific Broth (TB) (Sambrook et al, 1989), que está compuesto por: 12 g/l bacto-triptona, 24 g/l extracto de levadura, 0.4% (v/v) glicerol, 72 mM K₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄. Alternativamente se utilizó el medio 2xYT, que está compuesto por: 16 g/l bacto-triptona, 10 g/l extracto de bacto-levadura y 5 g/l de NaCl, pH 7.0.

Medios sólidos: Se utilizaron placas de medio sólido Luria-Bertani (LB), compuesto por: 10 g/l bacto-triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, 15 g/l agar.

Todos los medios se suplementaron con 100 mg/l de ampicilina.

2.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

2.1.- Purificación de DNA plasmídico.

El aislamiento de los DNA plasmídicos a partir de *E.coli* se realizó empleando el sistema comercial “*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*” (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente en las etapas finales del trabajo se utilizó el sistema “*GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit*” (Fermentas).

2.2.- Electroforesis de DNA.

Los plásmidos y los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa entre 0.8 - 1.4 % (p/v). Los geles se prepararon en cubetas de 6x10 cm (BioRad) empleando tampón TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA pH 8), agarosa D-1 (Pronadisa) y 0.1 μ g/ml bromuro de etidio. Las muestras se mezclaron con tampón de carga (8X) compuesto por 50 % (v/v) glicerol, 25 mM

Capítulo 3

EDTA (pH 8.0) y 0.1 % azul de bromofenol. Como marcadores de peso molecular se utilizó el *DNA 1kb ladder* (Promega). Las electroforesis se realizaron en tampón TAE 1X a voltaje constante.

Cuando fue necesario purificar fragmentos de DNA, las bandas correspondientes se cortaron del gel y el DNA se extrajo empleando el sistema comercial "*High Pure PCR Product Purification*" (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo). Se utilizó un coeficiente de extinción molar de $50 \text{ (ng/}\mu\text{l)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.4.- Secuenciación de DNA.

La secuenciación de DNA se realizó en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Se emplearon los oligonucleótidos T7 promotor y T7 terminador (Tabla M2). En los casos de cDNAs de gran tamaño se utilizaron además oligonucleótidos específicos de $\beta 4$ o plectina (Tablas M3 y M4).

Tabla M2.- Oligonucleótidos genéricos utilizados para la secuenciación de cDNAs en vectores pET

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
T7PROMOTOR	5´ TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3´
T7TERMINADOR	5´ GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3´

Tabla M3.- Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de cDNAs de $\beta 4$

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
B4-SEQ3500	5' CC GAA TCC GAA GCC CAC CTG C 3' S Q S Q A H L 3500
B4-SEQ4000	5' ATC GTG GAC GCC CAG AGC GGG 3' I V D A Q S G 4000
B4-SEQ4500	5' T GAG CTG CAT CGG CTC AAC ATC 3' G E L H R L N I 4500

La numeración y nombre de los oligonucleótidos se corresponde con la secuencia de nucleótidos del cDNA de $\beta 4$ a partir del ATG inicial.

Tabla M4.- Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de cDNAs de plectina

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
PLE1C SEQ-U412	5' ATC CTG GAG CGG GAG AAG CAG CTC CGC 3' I L E R E K Q L R 412
PLE1C SEQ-U600	5' GAA TTC CGG GCC AAG ATC GAG 3' E F R A K I E 600
PLE1C SEQ-U800	5' GCC CAG GAC GAG AAG GAA CAG 3' A Q D E K E Q 800
PLE1C SEQ-U1000	5' AG CTG CTG CAG AGC CTG GAA C 3' Q L L Q S L E 1000
PLE1C SEQ-U1225	5' GCT GTG CTG GCC CAG ACC GAC TTG CGG 3' A V L A Q T D L R 1225

2.5.- Clonación de cDNAs en vectores de expresión en *E.coli*.

Los cDNAs correspondientes a las diferentes regiones del dominio plakina de la isoforma 1C de plectina humana (Uniprot Q15149-2) se amplificaron por PCR usando como molde la construcción JK4044 que contiene el cDNA que codifica los aminoácidos 1-2532, clonado en el vector pcDNA3-HA (Koster et al, 2004). Esta construcción contiene variaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos respecto a la secuencia anotada en la base de datos UniProt, que son aceptadas como variaciones genéticas o polimorfismos. Estas variaciones son: D149N, A531V, D779V, S935S, D392D, R1177R, L1199V, V1211L, L1224V.

Capítulo 3

Los cDNAs de las regiones codificantes de la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$ (Uniprot P16144-2) se amplificaron por PCR usando como molde el clon IMAGE 3640058 que contiene el cDNA que codifica la región de nucleótidos 2273-5259, clonado en el vector pOTB7.

Las amplificaciones de cDNA se llevaron a cabo con la DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene) utilizando oligonucleótidos específicos de $\beta 4$ (Tablas M5 y M6) o de plectina (Tablas M7 y M8). Los oligonucleótidos directos contienen secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI o KpnI y NdeI, mientras que los oligonucleótidos reversos contienen un codón de terminación y sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Los fragmentos de cDNA se digirieron con NdeI y BamHI y se clonaron en el vector pETEV15b o alternativamente en el vector pETEb. La ausencia de errores en los cDNAs se verificó mediante secuenciación.

Tabla M5.- Oligonucleótido directo utilizado para la amplificación de fragmentos de cDNA de $\beta 4$.

Oligonucleótido directo	Secuencia del oligonucleótido
BETA4-U1126	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> GAC CTG GGC GCC CC 3' EcoRI NdeI D L G A P 1126

Tabla M6.- Oligonucleótidos inversos utilizados para la amplificación de fragmentos de cDNA de $\beta 4$.

Oligonucleótido inverso	Secuencia del oligonucleótido
BETA4-L1355	5' GCC <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> GCG TAG AAC GTC ATC G 3' EcoRI BamHI Stop R L V D D 1355
BETA4-L1668	5' GCC <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> ATC CTG GGA CTC TAT G 3' EcoRI BamHI Stop D Q S E I 1668
BETA4-L1710	5' GCC <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> GGT CGG CCC ATC CAC TAG G 3' EcoRI BamHI STOP T P G D V L F 1710
BETA4-L1731	5' GCC <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> CAC AAA CTC CTG GGT CAC ATG 3' EcoRI BamHI STOP V F E Q T V H 1731
BETA4-L1752	5' GCC <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> AGT TTG GAA GAA CTG TTG GT 3' EcoRI BamHI STOP T Q F F Q Q D 1752

Tabla M7.- Oligonucleótidos directos utilizados para la amplificación de fragmentos de cDNA de plectina.

Oligonucleótido directo	Secuencia del oligonucleótido
-------------------------	-------------------------------

3.-Materiales y métodos

PLE1C-U1	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> TCG GGT GAG GAC GCT GAG 3' EcoRI NdeI S G E D A E 1
PLE1C-U300	5' TGA <u>GGT ACC</u> <u>CAT ATG</u> AGG GCC AAC GAG CTG 3' KpnI NdeI R A N E L 300
PLE1C-U543	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> GAG CTG GAG GAC TCC ACT C 3' EcoRI NdeI E L E D S T 543
PLE1C-U640	5' TGA <u>GGT ACC</u> <u>CAT ATG</u> AGG TCC CTG GAG AGC 3' KpnI NdeI R S L E S 640
PLE1C-U749	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> GCT GCC TAC TTT CAG TTC TTC 3' EcoRI NdeI A A Y F Q F F 749
PLE1C-U750	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> GCC TAC GCT CAG TTC TTC TCA GAT GTG 3' EcoRI NdeI A Y A Q F F S D V 750
PLE1C-U914	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> CAC GTG GAC ATG AAG AGC CTT CTG 3' EcoRI NdeI H V D M K S L L 914
PLE1C-U919	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> AGC CTT CTG GCC TGG CAG 3' EcoRI NdeI S L L A W Q 919
PLE1C-U1004	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> CAG GAA GAG TCT CGC TGC 3' EcoRI NdeI Q E E S R C 1004
PLE1C-U1107	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> CTG TCT GCC ATC TAC CTG GAG EcoRI NdeI L S A I Y L E 1107
PLE1C-U1118	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> ATC AGC CTG GTG ATC CGC 3' EcoRI NdeI I S L V I R 1118
PLE1C-U1234	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> CGC CAG CTG CGT TAC TAC CGC EcoRI NdeI R Q L R Y Y R 1234

Tabla M8.- Oligonucleótidos inversos utilizados para la amplificación de fragmentos de cDNA de plectina.

Oligonucleótido inverso	Secuencia del oligonucleótido
-------------------------	-------------------------------

PLE1C-L419	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> CTC CAG CCT CTC AAA CTC 3' EcoRI BamHI Stop E L R E F E 419
PLE1C-L530	5' GCC <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> CAC CTG GGT TGC AGG 3' EcoRI BamHI Stop V Q T A P 530
PLE1C-L647	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> GCT GTG CAA GCT CTC CAG 3' EcoRI BamHI Stop S H L S E L 647
PLE1C-L748	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> GTT CTC CTT CAG GTG TGC 3' EcoRI BamHI Stop N E K L H A 748
PLE1C-L918	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> CTT CAT GTC CAC GTG CAA C 3' EcoRI BamHI Stop K M D V H L 918
PLE1C-L1003	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> TGC ACC CTG TTC CAG GC 3' EcoRI BamHI Stop A G Q E L S 1003
PLE1C-L1006	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> CTC TTC CTG TGC ACC CTG TTC 3' EcoRI BamHI Stop E E Q A G Q E 1006
PLE1C-L1117	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> GGT CTT GAG CTT CTC CAG 3' EcoRI BamHI Stop T K L K E L 1117
PLE1C-L1123	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> GCG GAT CAC CAG GCT GAT 3' EcoRI BamHI Stop R I V L S I 1123
PLE1C-L1233	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> GCC CAG TTG CTC GAG CTC 3' EcoRI BamHI Stop G L Q E L E 1233
PLE1C-L1372	5' TGA <u>GAA TTC</u> <u>GGA TCC</u> <u>CTA</u> CTC CAT GCG CCG CAG AG 3' EcoRI BamHI Stop E M R R L T 1372

2.5.1.- Clonación de fragmentos de plectina con deleciones internas.

Los fragmentos de plectina que presentan deleciones internas: SR5-SR6 Δ SH3-A (aminoácidos 750-818-GSGSG-889-1006) y SR5-SR6 Δ SH3-B (aminoácidos 750-818-GSG-889-1006) se construyeron mediante PCR.

En una primera etapa se amplificaron las regiones correspondientes a los aminoácidos 750-818 y 889-1006. El fragmento 750-818 se amplificó usando el oligonucleótido directo U750 (Tabla M7) y el oligonucleótido reverso L818-GSGSG (para la construcción SR5-SR6 Δ SH3-A) o el oligonucleótido L818-GSG (para la construcción SR5-SR6 Δ SH3-B) (Tabla M9). De forma análoga el fragmento 889-1006 se amplificó usando el oligonucleótido reverso L1006 (Tabla M8) y el

3.-Materiales y métodos

oligonucleótido directo U889-GSGSG (para la construcción SR5-SR6 Δ SH3-A) o el oligonucleótido U889-GSG (para la construcción SR5-SR6 Δ SH3-B) (Tabla M9). Estos oligonucleótidos no contienen sitios de reconocimiento para enzimas de restricción ni codón de terminación, sin embargo incluyen en su extremo 5' una secuencia que codifica para cinco (GSGSG) o tres aminoácidos (GSG).

En un segundo paso, los dos fragmentos que codifican los aminoácidos 750-818 y 889-1006 se emplearon conjuntamente como molde en una nueva amplificación por PCR utilizando los cebadores U750 y L1006; de esta forma se obtuvieron los fragmentos correspondientes a las región 750-1006 Δ 819-888. Estos fragmentos se introdujeron en el vector pETEV15b empleando los sitios de restricción NdeI y BamHI, tal como se ha descrito para el resto de construcciones. La secuencia correcta y la delección de la región 819-888 se verificó por secuenciación completa del cDNA.

Tabla M9.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos de cDNA de plectina con delecciones internas.

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
PLE1C-L818-GSG	5' CTG GTT CCC TGA TCC GAC GGC CTT GGC CCG CTT GCC 3' Q N G S G V A K A R K A 818
PLE1C-U889-GSG	5' GCC GTC GGA TCA GGG AAC CAG GAG GCC CAG GAG GCC 3' A V G S G N Q E A Q E A 889
PLE1C-L818-GSGSG	5' ACC GCT CCC TGA TCC GAC GGC CTT GGC CCG CTT GCC 3' G S G S G V A K A R K A 818
PLE1C-U889-GSGSG	5' GGA TCA GGG AGC GGT AAC CAG GAG GCC CAG GAG GCC 3' G S G S G N Q E A Q E A 889

2.6.- Mutagénesis puntual dirigida.

La introducción de sustituciones puntuales en el cDNA de plectina se realizó mediante mutagénesis dirigida empleando el método *Quick Change* (Stratagene).

Se partió de construcciones de plectina en el vector pETEV15b que se emplearon como molde en reacciones de PCR, en las que se utilizaron dos oligonucleótidos complementarios, directo e inverso, que contienen la mutación deseada. En la Tabla M10 se muestran las sustituciones puntuales que se han realizado y los

Capítulo 3

oligonucleótidos que se han empleado en cada caso. En estas reacciones se utilizó la DNA polimerasa *Pfu Turbo* (Stratagene). Los ciclos empleados en las PCR fueron típicamente: un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 30 s, 17 ciclos que consisten en: 30 s a 95° C, 1 min a 55° C y extensión a 68° C durante 2 min por cada 1000 pares de bases amplificadas. El DNA parental se eliminó mediante digestión con DpnI y el producto de la reacción se transformó en la cepa DH5 α de *E.coli*. La correcta introducción de las mutaciones se verificó mediante secuenciación completa del cDNA de interés.

Tabla M10.- Sustituciones puntuales en los clones de plectina y oligonucleótidos empleados.

Mutación	Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
G162C	PLE1C-G162C-F	5' CCC AAG CTG ACC CTT <u>TGC</u> CTC ATC TGG AC 3' 162
	PLE1C-G162C-R	5' GT CCA GAT GAG <u>GCA</u> AAG GGT CAG CTT GGG 3' 162
C420A	PLE1C-C420A-F	5' TTT GAG AGG CTG GAG <u>GCT</u> CTT CAG CGC ATC G 3' 420
	PLE1C-C420A-R	5' GAT GCG CTG AAG <u>AGC</u> CTC CAG CCT CTC AAA C 3' 420
C620A	PLE1C-C620A-F	5' T GCC TAC CGT GAC <u>GCC</u> CTG GGT CGG CTG G 3' 620
	PLE1C-C620A-R	5' C CAG CCG ACC CAG <u>GGC</u> GTC ACG GTA GGC AC 3' 620
C738A, C739A, C740A	PLE1C- C738/740A-F	5' TGG ATG CTA CAG CTG <u>GCC</u> <u>GCC</u> <u>GCT</u> ATC GAG GCA CAC CTG AAG 3' 738 739 740
	PLE1C- C738/740A-R	5' T CAG GTG TGC CTC GAT <u>AGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> CAG CTG TAG CAT CCA GC 3' 738 739 740

3.- MÉTODOS GENERALES PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS.

3.1.- Técnicas electroforéticas.

Las muestras de proteínas se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando sistemas electroforéticos Mini-Protean (Bio-Rad).

Los geles separadores se polimerizaron usando 9 - 13 % (v/v) acrilamida: bisacrilamida (37.5:1) en 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % (p/v) persulfato amónico y 0.005 % (v/v) TEMED. El gel concentrador consistía en 4 % (v/v) acrilamida:bisacrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (p/v) SDS, 0.01 % (m/v) persulfato amónico y 0.001 % (v/v) TEMED.

Las muestras se prepararon mezclándolas con un volumen igual de tampón de solubilización 2X que consiste en: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % (p/v) SDS, 2 % (v/v) β -mercaptoetanol, 0.02 % (p/v) azul de bromofenol y 55 % (v/v) glicerol. Las proteínas se desnaturalizaron a 95° C durante 5 min. Las electroforesis se realizaron a intensidad constante, 15-20 mA, en tampón 25 mM Tris, 150 mM glicina y 0.1 % (p/v) SDS. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los patrones preteñidos *Precision Plus* (Bio-Rad).

3.2.- Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro U-2001 (HITACHI) a partir de la absorbancia a 280 nm. Los coeficientes de extinción molar se calcularon a partir de la secuencia de aminoácidos (Pace et al, 1995) empleando el servidor ExPASy (<http://www.expasy.org>) (Tablas M11 y M12).

Tabla M11.- Coeficientes de extinción molar de las proteínas de plectina.

Capítulo 3

Proteína	M ¹ cm ⁻¹	(mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	Proteína	M ¹ cm ⁻¹	(mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
ABD (1-293)	36440	1.089	SR5-SR6-ΔSH3-B (750-818-GSG- 889-1006)	25440	1.134
ABD-SR1 (1-419)	62910	1.293	SR6 (919-1003)	15470	1.502
ABD-SR2 (1-530)	67380	1.100	SR6-SR7 (919-1117)	16960	0.736
ABD-SR3 (1-647)	82850	1.112	SR6-SR7-B (919-1123)	16960	0.715
ABD-SR4 (1-748)	106340	1.233	SR6-SR8 (919-1233)	27960	0.770
SR3-SR9^a (543-1372)	101300	1.060	SR6-SR8-B (914-1233)	27960	0.757
SR3-SR4 (543-748)	38960	1.610	SR6-SR9 (919-1372)	45380	0.861
SR3-SR5 (543-918)	55920	1.291	SR6-SR9-B (914-1372)	45380	0.822
SR3-SR6 (543-1003)	71390	1.342	SR7-SR8 (1004-1233)	12490	0.472
SR4-SR5 (640-918)	40450	1.259	SR7-SR9 (1004-1372)	29910	0.698
SR4-SR6 (640-1003)	55920	1.331	SR8-SR9 (1118-1372)	28420	0.945
SR5-SR6 (749-1003)	32430	1.103	SR8-SR9-B (1107-1372)	29910	0.954
SR5-SR6-ΔSH3-A (750-818-GSGSG- 889-1006)	25440	1.134	SR9 (1234-1372)	17420	1.036

Los números entre paréntesis corresponden a la secuencia de aminoácidos de los fragmentos.

^a Esta proteína incluye en su extremo N-terminal una cola de 8-His, que consiste en la secuencia: MGSSHHHHHHSSGENLYFQ.

Tabla M12.- Coeficientes de extinción molar de las proteínas de β4.

Proteína	M ¹ cm ⁻¹	(mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	Proteína	M ¹ cm ⁻¹	(mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
FnIII-1,2-SC (1126-1355)	41370	1.590	FnIII-1,4-CCT-B (1126-1731)	71280	1.068
FnIII-1,4 (1126-1668)	69790	1.161	FnIII-1,4-CCT-C (1126-1752)	71280	1.031
FnIII-1,4-CCT-A (1126-1710)	71280	1.105			

Los números entre paréntesis corresponden a la secuencia de aminoácidos de los fragmentos.

4.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

4.1.- Análisis de la expresión de proteínas en *E coli*.

Como paso previo a la producción a gran escala de los diferentes fragmentos de plectina y $\beta 4$ se analizó su expresión con el fin de determinar si las proteínas se producían de manera soluble. Para ello, se inocularon 25 ml de medio de cultivo líquido TB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) con una colonia de BL21(DE3)T1 que contenía el plásmido de interés. El cultivo se creció a 37° C en agitación, hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.4-0.6. En este punto, se indujo la expresión de proteína de interés mediante la adicción de 0.2 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG); la expresión se mantuvo durante 3 h a 37° C. Alternativamente, el cultivo se enfrió a 15° C y la expresión se indujo con 0.2 mM IPTG durante 12 h.

Seguidamente, las células se recogieron por centrifugación a 18000 x g durante 15 min a 4° C y se resuspendieron en 1 ml de 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 0.025% (p/v) NaN₃ (solución A), suplementado con 0.1% (v/v) Tritón X-100. Las células se lisaron mediante sonicación (4 pulsos de 10 s). El homogeneizado resultante se centrifugó a 16000 x g a 4° C durante 30 min, y el sobrenadante se decantó. El pellet se resuspendió en 1 ml de la solución A suplementada con 6M urea. La presencia de la proteína de interés en la fracción soluble (sobrenadante) o insoluble (pellet) se analizó mediante SDS-PAGE.

4.2.- Purificación de proteínas.

La expresión de proteínas a gran escala se realizó de forma similar a los ensayos descritos anteriormente, pero empleando entre 1,5 y 3 l de medio de cultivo. Las proteínas se purificaron a partir de la fracción soluble del lisado celular mediante una cromatografía de afinidad empleando una columna quelante de Ni⁺² HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare) y utilizando un equipo de cromatografía AKTA Prime™ (GE Healthcare). Tras cargar la muestra, la columna se lavó extensamente con la solución A. Las proteínas se eluyeron con un gradiente de 9 a 80% de 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 0.025 % (p/v) NaN₃ (solución B). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE. Aquellas que contenían la proteína de interés se juntaron y se dializaron frente a 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl y 0.025% (p/v) NaN₃ durante 12 h a 4° C.

Capítulo 3

A continuación, la cola de His se escindió por digestión con una forma recombinante de la proteasa TEV que contiene una cola de poli-His. Los restos de proteína sin digerir, la cola de poli-His y la TEV se eliminaron mediante un segundo paso de cromatografía de afinidad. Las fracciones que contenían la proteína se sometieron a diálisis extensiva frente a la solución deseada. Por ejemplo, las muestras destinadas a ensayos de cristalización se equilibraron en 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM de NaCl, 1mM DTT. Las proteínas se concentraron mediante ultrafiltración utilizando celdas Amicón (Millipore) y membranas de 10 kDa de límite de separación. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 149000 x *g* durante 30 min a 4° C. Cuando las muestras no se utilizaron inmediatamente, se dividieron en alícuotas, se congelaron mediante inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C.

En la purificación de las proteínas de plectina que se utilizaron para los análisis mediante SAXS, se incluyó un paso de purificación adicional. Tras la segunda cromatografía de afinidad se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Sephacryl S300 26/60 (GE Healthcare). La columna se equilibró en 20 mM NaPi (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 % (v/v) glicerol, 3 mM DTT y 0.025% (p/v) NaN₃. Antes de ser aplicadas a la columna, las muestras se concentraron hasta un volumen inferior a 5 ml y se centrifugaron a 4° C durante 30 min a 16000 x *g*. Se utilizó un flujo de 1.2 ml/min y se recogieron fracciones de 4 ml. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE. Tras la cromatografía, las fracciones de interés se concentraron mediante ultrafiltración y se almacenaron como se ha descrito.

Las proteínas que se expresaban como insolubles en los ensayos iniciales, se purificaron a partir de la fracción insoluble tras la lisis celular por sonicación.

El pellet se solubilizó en la solución A suplementada con 6M Urea y se purificó mediante una cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes, empleando una columna quelante de Ni⁺² HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare). Tras cargar la muestra, la columna se lavó extensamente con la solución A con 6 M Urea y la proteína se eluyó con un tampón 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 0.025 % (p/v) NaN₃, 6 M Urea. Posteriormente, la proteína se replegó

por una dilución 50 veces en un tampón 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl y 0.025% (p/v) NaN_3 , 5 mM EDTA, 1 mM DTT, resultando en una concentración residual de Urea de 0.12 M. La proteína ya soluble se concentró y se dializó frente a 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl y 0.025% (p/v) NaN_3 durante 12 h a 4° C.

Todos los pasos restantes de purificación, como la digestión de la cola de poli-His y el segundo paso de cromatografía, se realizaron siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

5.- CRISTALOGRAFÍA.

5.1.- Cristalización de proteínas.

5.1.1.- Experimentos de cristalización: descripción general.

Los ensayos iniciales de cristalización se llevaron a cabo mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada, utilizando placas de 96 pocillos MRC (Swissci). Las gotas se prepararon mezclando 1 μl de solución de proteína con 1 μl de solución madre de cristalización y se equilibraron frente a 80 μl de la solución de cristalización que se encontraba en el reservorio. Estos ensayos se realizaron a temperatura ambiente y a 4° C empleando las colecciones de soluciones de cristalización: Wizard I y II, Cryo I y II (Emerald BioSystems, WA), Salt Rx, Crystal Screen (Hampton Research, CA) y PACT (Newman et al, 2005), que incluyen un total de 432 soluciones de cristalización.

Una vez que se obtuvieron cristales en los ensayos iniciales, se realizaron experimentos para refinar y mejorar las condiciones de cristalización con el fin de obtener cristales adecuados para el estudio cristalográfico. Estos ensayos se realizaron mediante técnicas de difusión de vapor, empleando placas de 24 pocillos XRL (Molecular Dimensions) o Cryschem (Hampton Research) para experimentos en gota colgante o sentada, respectivamente. Partiendo de las soluciones identificadas en el cribado inicial, se variaron diversos parámetros como: concentración de precipitante o sal, pH del tampón, concentración de proteína, volumen de la gota o la proporción entre el volumen de proteína y el volumen de la solución de cristalización.

5.1.2.- Cristalización del fragmento SR3-SR4.

Los cristales iniciales del fragmento SR3-SR4 (aminoácidos 543-748) se obtuvieron a 4° C con la solución número 41 de la colección de cristalización Crystal Screen (Hampton Research, CA) que consiste en 100 mM HEPES (pH 7.5), 20 % (p/v) PEG 4000, 10 % (v/v) isopropanol. Los cristales que se utilizaron para resolver la estructura cristalográfica se obtuvieron mediante difusión de vapor en gota sentada, con gotas formadas por 3 µl de proteína a 30.9 mg/ml en tampón 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT y 3 µl de la solución de cristalización 100 mM HEPES (pH 7.5), 17 % (p/v) PEG 4000, 8 % (v/v) isopropanol. Previamente a la toma de datos de difracción, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que consistía en 100 mM HEPES (pH 7.5), 18 % (p/v) PEG 4000, 6 % (v/v) isopropanol, 20 % (v/v) glicerol y se enfriaron mediante inmersión en nitrógeno líquido.

5.1.3.- Cristalización del fragmento SR4-SR5.

En los ensayos iniciales de cristalización, se obtuvieron cristales del fragmento SR4-SR5 (aminoácidos 640-918) con varias de las soluciones de PACT (Newman et al, 2005) a 4° C. Los cristales aparentemente mejores se obtuvieron con la solución número 46, que consiste en 100 mM imidazol (pH 8.0), 10 % (p/v) PEG 8000, 200 mM acetato de calcio. Tras refinar las condiciones de cristalización, los cristales empleados para resolver la estructura se obtuvieron con la técnica de difusión de vapor en gota colgante mezclando 3 µl de proteína a 15 mg/ml en tampón 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT con un volumen igual de 100 mM imidazol (pH 7.2), 9 % (p/v) PEG 8000, 200 mM acetato de calcio, 2 mM DTT. Una vez que se obtuvieron cristales, las gotas se equilibraron durante 36 h frente a una solución que contenía dos veces la concentración de todos los componentes de la solución de cristalización: 200 mM imidazol (pH 7.2), 18 % (p/v) PEG 8000, 400 mM acetato de calcio, 4 mM DTT. Antes de tomar los datos de difracción, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que consistía en 200 mM imidazol (pH 7.2), 18 % (p/v) PEG 8000, 400 mM de acetato de calcio, 4 mM DTT, 20 % (v/v) glicerol. A continuación los cristales se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido.

Los cristales de SR4-SR5 empleados para introducir átomos pesados se obtuvieron usando como solución de cristalización: 100 mM imidazol (pH 7.6), 10 % (p/v) PEG 8000, 200 mM acetato de calcio, 2 mM DTT. Los cristales se incubaron durante 3.5 h en 100 mM imidazol (pH 7.6), 12 % (p/v) PEG 8000, 200 mM acetato de calcio, 1 mM etilmercuriotiosalicilato (EMTS). El exceso de EMTS se eliminó durante las breves incubaciones en soluciones crioprotectoras que consistían en 12% (p/v) PEG 8000, 200 mM acetato de calcio, 100 mM imidazol (pH 7.6) y concentraciones crecientes de glicerol hasta el 20 % (v/v). Posteriormente, los cristales se congelaron en nitrógeno líquido.

5.1.4.- Cristalización del fragmento SR5-SR6 Δ SH3-A.

Los ensayos iniciales de cristalización del fragmento SR5-SR6 Δ SH3-A (aminoácidos 750-818-GSGSG-889-1006) se realizaron empleando una solución de esta proteína a 30 mg/ml en 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT. Se obtuvieron cristales a 4° C con la solución número 69 de la colección de cristalización PACT (Newman et al, 2005) que consiste en 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM tartrato de sodio y potasio. Los cristales obtenidos en estos ensayos iniciales fueron de un tamaño adecuado para el estudio cristalográfico. Como paso previo a la toma de datos, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que consistía en 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM tartrato de sodio y potasio, con concentraciones crecientes de glicerol hasta el 15 % (v/v); tras lo cual, los cristales se congelaron por inmersión directa en nitrógeno líquido.

Para introducir átomos pesados en los cristales de SR5-SR6 Δ SH3-A, éstos se incubaron a 4° C en 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM tartrato de sodio y potasio y 1 mM EMTS durante 6 horas. El exceso de EMTS se eliminó durante la incubación en soluciones crioprotectoras que consistían en 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM tartrato de sodio y potasio, y concentraciones crecientes de glicerol hasta el 15 % (v/v). Posteriormente, los cristales se congelaron en nitrógeno líquido.

5.1.5.- Cristalización del fragmento SR5-SR6 Δ SH3-B.

En los ensayos iniciales de cristalización del fragmento SR5-SR6 Δ SH3-B (aminoácidos 750-818-GSG-889-1006) se obtuvieron cristales con ~ 15 soluciones de la colección de PACT (Newman et al, 2005) a temperatura ambiente y a 4° C. De estos cristales iniciales, los de mejor apariencia macroscópica se obtuvieron a 4° C con una solución que consiste en: 100 mM Bis-Tris-propano (pH 6.5), 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM malonato de sodio. A partir de esta condición inicial, se refinaron las condiciones de cristalización. Los cristales que se utilizaron para la resolución estructural se obtuvieron mediante difusión de vapor en gota colgante mezclando 2 μ l de la proteína a 30 mg/ml en 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, con un volumen igual de una solución de cristalización que consistía en 100 mM Bis-Tris-propano (pH 6.0), 18 % (p/v) PEG 3350, 200 mM malonato de sodio. Los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que consistía en 100 mM Bis-Tris-propano (pH 6.0) 19 % (p/v) PEG 3350, 200 mM malonato de sodio y 15 % (v/v) de glicerol, antes de ser congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido.

5.1.6.- Cristalización del fragmento SR7-SR8.

Los cristales iniciales del fragmento SR7-SR8 (aminoácidos 1004-1233) se obtuvieron a temperatura ambiente en la condición número 5 de la colección de PACT (Newman et al, 2005) que consiste en 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM NaF. Tras refinar las condiciones de cristalización, los cristales de SR7-SR8 se obtuvieron en experimentos de difusión de vapor en gota sentada en los que se mezclaron 3 μ l de SR7-SR8 a 27 mg/ml en tampón 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, con un volumen igual de una solución que consistía en 17 % (p/v) PEG 3350, 200 mM NaF. Antes de ser medidos, los cristales se transfirieron de manera secuencial a soluciones crioprotectoras que consistían en 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 18 % (p/v) PEG 3350, 200 mM NaF y concentraciones crecientes de glicerol hasta el 15 %. Los cristales se congelaron por inmersión directa en nitrógeno líquido.

Los cristales del fragmento SR7-SR8 empleados para introducir átomos de mercurio se obtuvieron de forma similar a como se ha descrito empleando una concentración inicial de SR7-SR8 de 14.5 mg/ml y como solución de cristalización: 50 mM Tris-HCl

(pH 7.5), 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM NaF. Los cristales se incubaron durante 15 horas a temperatura ambiente en esta solución de cristalización suplementada con 2 mM EMTS. El exceso de EMTS se eliminó mediante una incubación breve en la solución de cristalización sin EMTS. Los cristales derivados se transfirieron a una solución crioprotectora que consistía en 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM NaF e incrementos del 5 % (v/v) de glicerol hasta el 15 %. Posteriormente, los cristales se congelaron por inmersión directa en nitrógeno líquido.

5.1.7.- Cristalización del fragmento SR7-SR9.

Se obtuvieron cristales del fragmento SR7-SR9 (aminoácidos 1004-1372) a temperatura ambiente con ~20 condiciones de cristalización de la colección de PACT (Newman et al, 2005). Los mejores cristales se obtuvieron con la condición número 71 que consiste en 100 mM Bis-Tris-propano (pH 7.5), 20 % (p/v) PEG 3350, 200 mM tartrato de sodio y potasio. Tras refinar las condiciones de cristalización los cristales empleados en los estudios cristalográficos se obtuvieron en experimentos de difusión de vapor (gota colgante) en los que se mezclaron 3 µl de proteína a 12 mg/ml en 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT con 2 µl de una solución de cristalización que consistía en 100 mM Bis-Tris-propano (pH 8.0), 16 % (p/v) PEG 3350, 300 mM tartrato de sodio y potasio. Antes de ser medidos, los cristales se transfirieron a soluciones que consistían en 100 mM Bis-Tris-propano (pH 7.5), 19 % (p/v) PEG 3350, 250 mM tartrato de sodio y potasio, con concentraciones crecientes de glicerol en incrementos del 5 % hasta alcanzar el 20 %; ésta última actuó como solución crioprotectora.

5.2.- Adquisición y tratamiento de datos de difracción.

5.2.1.- Equipos de difracción y fuentes de radiación.

En este trabajo se han utilizado las siguientes fuentes de rayos-x:

- Generador de rayos-x de ánodo rotatorio: Se ha utilizado un equipo de difracción que se encuentra en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (CSIC-USAL). Este difractómetro consiste en un generador de ánodo rotatorio de cobre Microstar-H (Bruker AXS) que produce radiación con una longitud de onda de 1.5418 Å, un sistema óptico Helios y un detector mar345dtb (MarResearch GmbH) de tipo *image plate*. El equipo dispone además de un sistema criogénico Cryostream Serie 700 (Oxford Cryosystems) que mantiene la muestra a 100 K durante la toma de datos. Este equipo se utilizó para la toma de los datos de todos los cristales con excepción de los cristales del fragmento SR7-SR9.
- Radiación sincrotrón: La colección de datos de difracción del fragmento SR7-SR9 del dominio plakina de plectina se realizó en la línea ID 14.2 del ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) (Grenoble, Francia), utilizando una longitud de onda de 0.993 Å. Como sistema de detección se utilizó una cámara CCD Quantum 4 (ADSC) y la temperatura de trabajo fue de 100 K.

5.2.2.- Procesado de los datos de difracción.

De forma general las intensidades de difracción se indexaron e integraron con los programas XDS y XSCALE (Kabsch, 1993). Las intensidades se convierten en módulos de amplitud de factores de estructura, con el programa XDSCONV que emplea el método de French y Wilson (French & Wilson, 1978). Este programa convierte los datos de reflexión obtenidos por XSCALE en un formato apropiado para ser utilizados con los programas de la suite de CCP4. Los datos se transformaron en el formato MTZ empleando los programas F2MTZ y CAD de CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

Los cristales del fragmento SR7-SR9 produjeron un patrón de difracción marcadamente anisotrópico. En este caso los datos se indexaron e integraron con el programa MOSFLM (Leslie, 1992) que permite definir límites de resolución anisotrópicos y se escalaron con el programa SCALA del paquete CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

5.2.3.- Caracterización inicial de los cristales a partir de los datos de difracción.

Se estimaron el número de moléculas presentes en la unidad asimétrica de los cristales mediante la estimación del coeficiente de Matthews (V_M) y del contenido del

solvente empleando el programa MATTHEWS_COEF (Kantardjieff & Rupp, 2003) de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994)

Se calcularon las funciones de auto-rotación con el programa GLRF (Tong & Rossmann, 1997). Se empleó una convención de ortogonalización estándar (AXABZ) en la que el eje cartesiano x es paralelo al eje a, el eje y es paralelo al eje b y el eje z es paralelo al eje c. Se calcularon mapas nativos de Patterson empleando el programa FFT (Fast Fourier Transform) (Read & Schierbeek, 1988) de CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

5.3.- Resolución de estructuras: faseado.

La resolución de la estructura cristalográfica de una proteína, supone obtener una imagen de la función de distribución de densidad electrónica a partir del patrón de difracción. La densidad electrónica es la transformada de Fourier del patrón de difracción.

Los factores de estructura (F_{hkl}) que forman el patrón de difracción se pueden expresar como:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}}$$

Donde $|F_{hkl}|$ es la amplitud, que a su vez es la raíz cuadrada de la intensidad observada (I_{hkl}) y α_{hkl} es la fase. Durante los experimentos de difracción se pierde la información de las fases de los factores de estructura, lo cual impide calcular la función de densidad electrónica exclusivamente a partir de los datos de intensidad de las reflexiones. Esto constituye el “*problema de la fase*” en cristalografía. Para resolver las estructuras cristalográficas de los fragmentos de plectina se han empleado dos métodos de faseado: reemplazo molecular y reemplazo isomórfico simple con dispersión anómala.

5.3.1.- Reemplazo molecular.

Las estructuras de los fragmentos SR3-SR4, SR5-SR6 Δ SH3-B y SR7-SR9 se resolvieron mediante reemplazo molecular empleando el programa PHASER (McCoy et al, 2007) dentro de la suite de programas CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). En la búsqueda se emplearon dos tipos de modelos. Cuando se dispuso de una estructura previa total o parcial del fragmento

de interés, ésta se empleó como modelo de búsqueda. En los casos en los que sólo se conocía la estructura de regiones homólogas en otras proteínas se construyeron modelos de tipo "mixtos" utilizando el servidor SCWRL (Canutescu et al, 2003). En estos modelos "mixtos" se mantuvieron las conformaciones de las cadenas laterales de los residuos idénticos en ambas secuencias, mientras que los residuos no conservados se modelaron como Ser con la excepción de los residuos de Gly y Ala.

5.3.2.- Reemplazo isomórfico simple con dispersión anómala (SIRAS).

Las estructuras de los fragmentos SR4-SR5, SR5-SR6 Δ SH3-A y SR7-SR8 se fasearon mediante SIRAS. En todos los casos se emplearon datos de un cristal nativo y datos de un cristal tratado con el compuesto mercurial EMTS. Los datos de difracción se tomaron empleando un difractor de ánodo rotatorio de cobre. La elucidación de las sub-estructuras de los átomos de Hg y el cálculo de las fases iniciales a partir de éstas se realizaron con los programas SHELXC/D/E (Sheldrick, 2002) empleando la interfaz gráfica HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004). Las posiciones de los átomos de Hg con mayor ocupación que se encontraron con SHELXD y las distribuciones de probabilidad de sus fases se refinaron posteriormente con el programa autoSHARP (Bricogne et al, 2003). Este proceso permitió identificar sitios de átomos pesados adicionales con menor ocupancia. Las fases obtenidas con SHARP se mejoraron y se extendieron utilizando los programas SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) y DM (Cowtan, 1994). Las fases experimentales así obtenidas permitieron el cálculo de mapas de densidad electrónica interpretables.

5.4.- Refinado de las estructuras cristalográficas.

Las estructuras se refinaron con el programa PHENIX.REFINE (Afonine et al, 2005) empleando funciones de máxima probabilidad (*maximum likelihood*) (Afonine et al, 2005). Durante el refinado se monitorizó el factor de desacuerdo R (R_{work}) que compara las amplitudes observadas (F_{obs}) con las amplitudes calculadas a partir del modelo (F_{cal}):

$$R = 100 \left(\frac{\sum_{(hkl)} |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum_{(hkl)} |F_{obs}|} \right)$$

Un 5% de los datos de difracción se excluyeron del refinado, y se utilizaron para calcular el valor de R_{free} .

Cuando la estructura cristalográfica se resolvió mediante la técnica de reemplazo molecular, inicialmente se realizó un refinado de cuerpos rígidos. En las fases iniciales también se empleó el método de recocido simulado (*simulated annealing*). En etapas más avanzadas se realizó: (i) refinado de las posiciones atómicas, (ii) refinado de valores B o parámetros de desplazamiento atómico (ADP) isotrópicos individuales y (iii) refinado de ADPs según un modelo de translación, libración y desplazamiento helicoidal (TLS) de cuerpos pseudo-rígidos (grupos TLS) (Schomaker & Trueblood, 1968; Winn et al, 2001). Los grupos TLS se identificaron a partir del análisis de los valores de los ADPs de las estructuras empleando el servidor TLS Motion Determination (Painter & Merritt, 2006). En el refinado de las estructuras a media y baja resolución se incluyeron restricciones de simetría no cristalográfica.

De manera habitual, los ciclos de refinado se alternaron con la inspección y modificación manual del modelo con el programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Se emplearon mapas $2mF_{obs}-DF_{calc}$ y $mF_{obs}-DF_{calc}$; también se emplearon mapas promediados a partir de múltiples modelos en los que se introdujeron desplazamientos atómicos aleatorios (mapas *averaged kick*) (Praznikar et al, 2009).

5.5.- Análisis de la geometría de las estructuras cristalográficas.

La geometría de las estructuras se analizó mediante el programa MOLPROBITY (Davis et al, 2007) (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) y con las utilidades del programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

5.6.- Análisis de estructuras.

La identificación de los pares de aminoácidos que podrían formar puentes disulfuro se realizó con el programa SSBOND (Hazes & Dijkstra, 1988). Las superposiciones de las estructuras cristalográficas se realizaron con el programa LSQKAB de CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). La identificación de dominios dinámicos y de los movimientos que relacionan diferentes conformaciones de un determinado fragmento se realizó comparando pares de estructuras con el programa DynDom (Hayward & Berendsen, 1998). Las figuras de las estructuras cristalográficas se realizaron con el programa PyMOL (DeLano, 2002).

6.- DISPERSIÓN DE RAYOS-X A BAJO ÁNGULO (SAXS).

La dispersión de rayos-x a bajo ángulo o SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) es una técnica física que se permite analizar la estructura de macromoléculas en solución. Esta técnica analiza la dispersión de rayos-x producida por una solución de una macromolécula al paso de un haz monocromático a través de ella, a ángulos muy próximos a cero (típicamente entre 0.1° y 10°). Mediante esta técnica se obtiene un perfil de dispersión en el que se representa la intensidad de dispersión I en función del vector de dispersión q , cuyo módulo es:

$$q=4\pi\sin\theta/\lambda$$

Donde 2θ es el ángulo entre el rayo incidente y el detector (ángulo de dispersión) y λ la longitud de onda de los rayos-x. El perfil de dispersión de una muestra homogénea puede derivarse de la distribución de densidad electrónica de la partícula:

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr$$

Donde D_{\max} es la dimensión linear máxima de la partícula y $P(r)$ es la función de distribución de distancias inter-atómicas.

El tamaño medio de la partícula se puede estimar mediante la ecuación de Guinier (Guinier & Fournet, 1955) que utiliza datos de dispersión a bajo ángulo.

$$\ln[I(q)] = \ln[I(0)] - \frac{q^2 Rg^2}{3}$$

Donde $I(0)$ es la intensidad de dispersión extrapolada a ángulo cero y Rg es el radio de giro. La aproximación de Guinier es válida para valores $0.8 < qRg < 1.2$. El Rg de la partícula se obtiene directamente de la pendiente de la región lineal obtenida al representar $\ln [I(q)]$ frente a q^2 .

A partir de la transformada de Fourier del perfil de dispersión de SAXS se calcula la función de distribución de distancias inter-atómicas ($P(r)$), que es una representación de las distancias de todos los pares de electrones dentro de la partícula dispersada. La $P(r)$ proporciona información estructural sobre la forma global de las partículas, de tal manera que las moléculas globulares son distinguibles de las moléculas que presentan una forma alargada. A partir de esta función, se estiman parámetros estructurales, como la D_{max} de la partícula y se calcula el Rg de la molécula.

En el gráfico de Kratky (Glatter & Kratky, 1982) se representan los datos de dispersión (q) frente a $I(q)*q^2$. Esta representación se utiliza habitualmente para analizar o inspeccionar visualmente la conformación de las proteínas o el correcto plegamiento de éstas.

6.1.- Preparación de las muestras para el análisis mediante SAXS.

Las muestras de los fragmentos de plectina que se analizaron mediante SAXS se equilibraron en 20 mM NaPi (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.025 % (p/v) NaN_3 , 3 mM DTT y 5 % (v/v) glicerol. Este tampón contiene DTT y glicerol para minimizar los daños causados por la radiación en las muestras (Kuwamoto et al, 2004).

6.2.- Recogida de datos de dispersión de rayos-x a bajo ángulo.

Las medidas de dispersión de rayos-x a bajo ángulo de los fragmentos de plectina se llevaron a cabo en la estación cSAXS de la fuente de radiación sincrotrón *Swiss Light Source* (SLS), Villigen (Suiza). La cámara de detección utilizada fue PILATUS 2_M Dectris Ltd, con una distancia de la muestra al detector de 2.15 m, de tal manera que se cubrió un rango de vector de dispersión ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$) de 0.015 a 0.5 \AA^{-1} . La energía del haz de rayos-x se ajustó a 12 KeV ($\lambda = 1.0 \text{\AA}$).

Capítulo 3

Las medidas de SAXS de las muestras se llevaron a cabo en capilares de borosilicato de 1 mm de diámetro (Hilgenberg GMBH), usando un soporte de cobre termostaticado diseñado en el laboratorio. La temperatura de la muestra fue de $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se analizaron entre tres y cinco concentraciones de cada proteína, en un rango de 1 - 15 mg/ml. Las muestras se prepararon mediante dilución seriada (1:2) de la solución más concentrada, utilizando el mismo tampón en que estaban equilibradas las proteínas. Los perfiles de dispersión se registraron cada 0.5 s para un tiempo total de exposición de 30 s. Los daños por radiación se minimizaron utilizando celdas oscilantes, de tal manera que la muestra se expuso a la radiación en 10 posiciones diferentes dentro del capilar, con una distancia entre dos posiciones consecutivas de 0.5 mm. Las imágenes que presentaron daño por radiación se eliminaron antes de que los datos fuesen procesados. Los datos se normalizaron por la intensidad del haz y la respuesta del detector. La dispersión del tampón se restó a la dispersión de la muestra, usando una medida registrada en las mismas condiciones pero sin proteína.

6.3.- Procesado de los datos de dispersión de rayos-x a bajo ángulo (SAXS).

El procesado de los datos de dispersión se llevó a cabo utilizando el conjunto de programas del paquete ATSAS 2.3 (Konarev et al, 2006). El análisis del perfil de dispersión experimental, la substracción de la dispersión del tampón, el escalado por la concentración y la extrapolación a dilución infinita, se realizaron con el programa PRIMUS (Konarev et al, 2003). El valor del R_g se calculó a partir de la aproximación de Guinier con el programa PRIMUS (Konarev et al, 2003) La función de distribución de distancias inter-atómicas ($P(r)$) se calculó con el programa GNOM (Svergun, 1992). A partir de esta función se estimó la D_{max} y el R_g de la molécula.

6.4.- Modelado de envueltas *ab initio* de SAXS.

A partir de los perfiles de dispersión unidimensional experimental se calcularon estructuras tridimensionales a baja resolución mediante métodos *ab initio* implementados en los programas de modelado DALAI_GA (Chacon et al, 2000) y DAMMIF (Franke & Svergun, 2009). Estos programas crean un modelo de bolas (*dummy atom model*) tomando como referencia una esfera con un diámetro igual a

la distancia máxima de la molécula (D_{max}) y rellenan con bolas un volumen correspondiente a la dispersión experimental de la muestra.

Con cada programa se generaron típicamente 10 modelos independientes que se compararon entre sí mediante superposición y alineamiento con el programa SUPCOMB20 (Kozin & Svergun, 2000). El parámetro NSD (discrepancia real normalizada) (Kozin & Svergun, 2001) se utilizó para caracterizar las diferencias entre modelos que presentan la misma resolución. En modelos idénticos, el valor de NSD es cero. El modelo que presenta el valor más bajo de NSD se utilizó como referencia, mientras que los modelos que presentan un valor de NSD superior a la media y 2 veces la desviación estándar se eliminaron del análisis. A partir de los modelos alineados se empleó el programa DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) para calcular una estructura promedio que representa el volumen más poblado dentro de cada grupo de modelos.

La representación volumétrica de las envueltas modeladas de SAXS se realizó mediante el programa SITUS 2.5 (Wriggers et al, 1999).

6.5.- Construcción de modelos atómicos del dominio plakina.

Los modelos atómicos del dominio plakina de plectina se construyeron a partir de las posiciones atómicas de las estructuras cristalográficas de los fragmentos que lo componen. Para construir estos modelos, las estructuras cristalográficas se superpusieron en las regiones que comparten mediante el programa LSQKAB de CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

6.6.- Cálculo del perfil teórico de SAXS y parámetros estructurales. Ajuste de los datos teóricos a los datos experimentales.

A partir de los modelos o estructuras atómicas se calcularon los perfiles de dispersión teóricos y el R_g utilizando el programa CRY SOL (Svergun et al, 1995). Los perfiles de dispersión teórico se ajustaron a los correspondientes perfiles de dispersión experimental.

La calidad del ajuste del perfil teórico al perfil experimental se determinó a partir de la función de discrepancia normalizada χ^2 (Svergun et al, 1995). Este parámetro se calcula a partir de la siguiente ecuación.

$$\chi^2 = \frac{1}{N_p - 1} \sum_i \left[\frac{I(q_i)_{\text{exp}} - cI(q_i)_{\text{calc}}}{\sigma(q_i)} \right]^2$$

Donde c es el factor de escalado, $I(q_i)_{\text{exp}}$, $I(q_i)_{\text{calc}}$ es la intensidad del perfil experimental y del perfil teórico respectivamente; y $\sigma(q_i)$ es el error experimental.

Valores de esta función cercanos a cero se corresponden con un buen ajuste entre los datos de dispersión experimental y los datos de dispersión teóricos calculados a partir del modelo. La $P(r)$, la D_{max} teórica y el R_g teórico se calcularon a partir de las estructuras atómicas utilizando el programa HYDROPRO (García De La Torre et al, 2000).

6.7.- Ajuste de las estructuras a alta y baja resolución.

Los modelos atómicos o en su caso las estructuras cristalográficas del dominio plakina, se ajustaron automáticamente dentro del volumen de las envueltas experimentales de SAXS, usando el programa SUPCOMB20 (Kozin & Svergun, 2000)

7.- ENSAYOS BIOQUÍMICOS.

7.1.- Ensayos de la interacción plectina- β 4 basado en fluorescencia.

7.1.1.- Marcaje de fragmentos de plectina con 1,5-I-AEDANS.

En los ensayos de fluorescencia se utilizaron proteínas mutantes de plectina, en las que se sustituyeron las Cys presentes en la secuencia silvestre: (C420, C620, C738, C739 y C740) por Ala y se incorporó la sustitución G162C (de Pereda et al, 2009a).

Estas proteínas se marcaron con la sonda fluorescente 1,5-I-AEDANS (Haran et al, 1992). Soluciones de proteína a 100 μ M en 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl se incubaron durante 2 horas a 4° C con un exceso de 20 veces en concentración molar de 1,5-I-AEDANS. A continuación, la reacción se detuvo añadiendo DTT en un exceso 10 veces superior a la concentración de 1,5-I-AEDANS y se incubó durante 1 hora a 4° C. El exceso de reactivo se eliminó mediante diálisis extensivas frente a 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl. Las proteínas marcadas se concentraron mediante ultrafiltración, se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta el momento de su utilización.

La concentración de 1,5-I-AEDANS en las muestras marcadas se determinó espectrofotométricamente empleando los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{336\text{nm}}=6100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{nm}}= 1060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El grado de marcaje promedio fue de 1.1 ± 0.1 moléculas de 1,5-I-AEDANS por molécula de plectina.

7.1.2.- Ensayo de fluorescencia y determinación de la afinidad de la interacción plectina- $\beta 4$.

La interacción entre $\beta 4$ y plectina se monitorizó midiendo cambios en la intensidad de fluorescencia de la sonda 1,5-I-AEDANS unida selectivamente a fragmentos de plectina 1C que llevan la sustitución G162C.

Las medidas de fluorescencia del 1,5-I-AEDANS se realizaron en un espectrofluorímetro FluoroMax-3 (HORIBA-Jobin-Yvon) a 25° C. La longitud de onda de excitación fue 340 nm (0.5 nm de ancho de banda) y la de emisión 475 nm (5 nm de ancho de banda).

Soluciones de plectina-1,5-I-AEDANS a una concentración 4 μM en 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl se titularon por la adición secuencial de soluciones concentradas de proteínas de $\beta 4$. La intensidad de la fluorescencia se corrigió por la dilución, siendo el volumen total añadido de $\beta 4$ inferior al 12 % del volumen inicial.

Los valores de la constante aparente de disociación (K_d) de la interacción plectina- $\beta 4$, se determinaron ajustando la siguiente ecuación que corresponde a un modelo de unión con una estequiometría 1:1 (de Pereda et al, 2009a).

$$I = I_F + \left[(I_B - I_F) \left(\frac{\gamma - \sqrt{\gamma^2 - 4[Ple]_T [\beta 4]_T}}{2[Ple]_T} \right) \right]$$

$$\gamma = Kd + [Ple]_T + [\beta 4]_T$$

En esta ecuación, $[Ple]_T$ es la concentración total de plectina-1,5-I-AEDANS, $[\beta 4]_T$ es la concentración total de $\beta 4$ añadida e I es la intensidad de la fluorescencia observada.

7.2.- Análisis de la estabilidad térmica de proteínas basado en fluorescencia.

La desnaturalización térmica de la proteína se monitorizó usando un ensayo de termofluor (Pantoliano et al, 2001), en el que se miden los cambios de la intensidad de la fluorescencia de la sonda Sypro Orange (Invitrogen) en función de la temperatura. Se analizaron muestras (25 μ l) que incluyen la proteína de interés a 0.25 mg/ml en 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM de NaCl y la sonda Sypro Orange a una concentración 10X (unidades del fabricante). Estas soluciones estaban suplementadas con diversas concentraciones de CaCl_2 (0.1, 1, 10 y 100 mM) o con 5 mM EGTA.

Los experimentos se realizaron en un instrumento de PCR en tiempo real IQ5 (Bio-Rad), empleando un filtro de excitación de 480 nm (20 nm de ancho de banda) y un filtro de emisión de 530 nm (30 nm de ancho de banda). Se realizaron barridos de temperatura entre 20° C y 85° C con una velocidad de barrido de 1° C/min. Se tomaron medidas de fluorescencia a intervalos de 0.5° C. Cada muestra se analizó por duplicado y las réplicas se ajustaron independientemente. La temperatura de desnaturalización (T_M) se determinó como el máximo de la derivada de la fluorescencia (unidades arbitrarias) frente a la variación de la temperatura (dF/dT).

7.3.- Formación de puentes disulfuro y determinación de grupos tiol libres con DNTB.

La formación de puentes disulfuro en las proteínas de plectina se indujo mediante oxidación. Para ello, muestras de proteína a ~ 20-30 μ M en tampón 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en presencia de 0.1 mM CuSO_4 y 0.1 mM 1,10-fenantrolina (Lee et al, 1994).

Los grupos sulfhidrilos de las proteínas se titularon antes y después de la oxidación mediante una reacción con 5,5' ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DNTB) (Riddles et al, 1983) en tampón 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl en ausencia o presencia de 6 M hidrocloreuro de guanidinio. En esta reacción se forma tionitrobenzoato, como producto de la escisión del puente disulfuro del DNTB al reaccionar con los grupos sulfhidrílos de la proteína. La concentración de tionitrobenzoato liberado se midió espectrofotométricamente a 412 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 13600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El número de grupos sulfhidrílos libres por molécula de proteína se

3.-Materiales y métodos

determinó como el cociente entre las concentraciones de tionitrobenzoato y de proteína.

Capítulo 3

RESULTADOS

Capítulo 4

1.- DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA EMPLEADOS EN ESTUDIOS ESTRUCTURALES.

Para abordar el estudio del dominio plakina se ha generado una amplia colección de fragmentos de plectina. Estos fragmentos contienen un número variable de los sub-dominios SRs y el dominio SH3, que componen el dominio plakina. En el diseño de las construcciones se ha respetado la integridad estructural de los sub-dominios, por ello se han utilizado los límites de secuencia de dichos sub-dominios identificados previamente a partir del análisis de secuencia (Sonnenberg et al, 2007). El diseño de las construcciones del dominio plakina ha sido un proceso iterativo. Tras la producción y caracterización de un conjunto inicial de fragmentos, se han diseñado y generado subsiguientes fragmentos. Todos los fragmentos se han expresado en *E.coli* como proteínas de fusión con una cola de ocho Histidinas en la posición N-terminal. Las proteínas se han purificado mediante cromatografía de afinidad. Salvo que se indique lo contrario, la cola de His se eliminó mediante digestión dirigida con la proteasa rTEV que deja el tetrapéptido GSHM en extremo amino de la proteína.

1.1.- Primera colección de fragmentos del dominio plakina de plectina.

Se generó una colección inicial de 12 construcciones de fragmentos del dominio plakina de plectina, que codifican proteínas que contienen entre dos y cuatro sub-dominios o SRs (Tabla R1, Figura R1).

Tabla R.1. Parámetros de la primera colección de fragmentos del dominio plakina de plectina.

Fragmento	Límites de secuencia ^b	Nº de aminoácidos ^c	Peso molecular teórico ^d (Daltons)
SR3-SR4	543-748	210	24.199
SR3-SR5 ^a	543-918	380	43.309
SR3-SR6 ^a	543-1003	465	53.178
SR4-SR6 ^a	640-1003	367	42.006
SR4-SR5 ^a	640-918	282	32.137
SR5-SR6 ^a	749-1003	259	29.410
SR6-SR7	919-1117	203	23.041
SR6-SR8	919-1233	219	36.308
SR6-SR9	919-1372	458	52.694
SR7-SR8	1004-1233	234	26.439
SR7-SR9	1004-1372	373	42.825
SR8-SR9	1118-1372	259	30.083

^a El dominio SH3 está presente en las conciones que contiene el SR5.

^b La numeración corresponde a la variante 1C de plectina humana.

^c Las proteínas contienen en su extremo N-terminal la secuencia adicional GSHM.

^d Los valores se han calculado a partir de la secuencia de aminoácidos.

Capítulo 4

De estos fragmentos recombinantes, ocho se expresan solubles en *E. coli*, los cuales son: SR3-SR4; SR3-SR5; SR3-SR6; SR4-SR5; SR4-SR6; SR6-SR9; SR7-SR8 y SR7-SR9. Por el contrario, los fragmentos: SR5-SR6; SR6-SR7; SR6-SR8 y SR8-SR9 se expresan como proteínas insolubles.

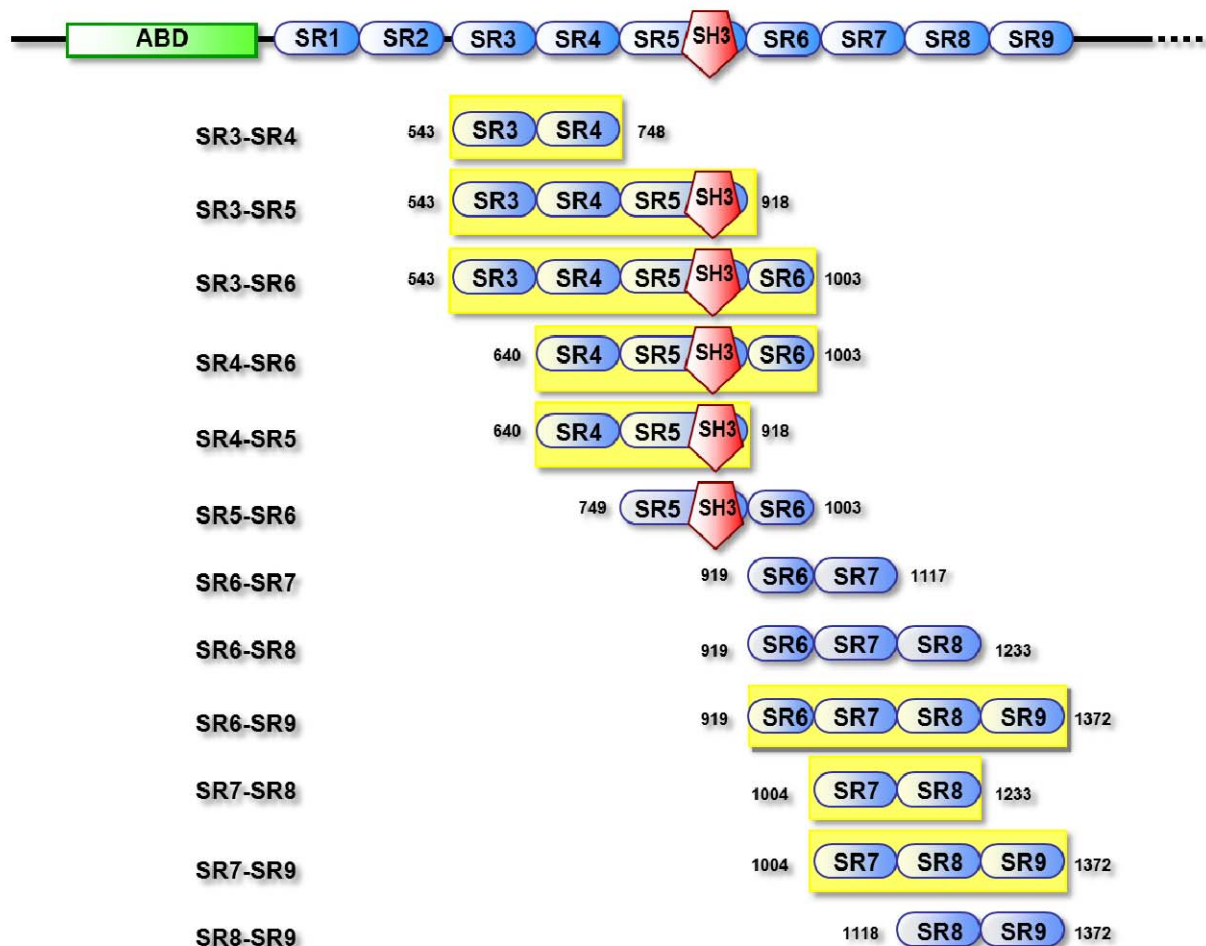


Figura R1.- Primera colección de fragmentos del dominio plakina. Los fragmentos de plectina que se expresan como proteínas solubles en *E. coli* aparecen sombreados en amarillo.

1.2.- Cristalización de proteínas de la primera colección de fragmentos del dominio plakina.

Los ocho fragmentos que se expresan como proteínas solubles, se purificaron y se sometieron a ensayos de cristalización. Se obtuvieron cristales de los fragmentos SR3-SR4, SR4-SR5, SR7-SR8 y SR7-SR9 y se resolvió la estructura cristalográfica de estas cuatro regiones del dominio plakina de plectina (Ver sección 2 de Resultados).

1.3.- Segunda colección de fragmentos del dominio plakina de plectina.

En base a las estructuras cristalográficas de los cuatro fragmentos anteriores, se diseñaron ocho fragmentos adicionales (Tabla R2, Figura R2), con el objetivo de elucidar la estructura cristalográfica de los SRs que no se habían resuelto con los fragmentos anteriores.

Tabla R2. Parámetros de la segunda colección de fragmentos del dominio plakina de plectina.

Fragmento	Límites de secuencia ^b	Nº de aminoácidos ^c	Peso molecular teórico ^d (Daltons)
SR5-SR6- Δ SH3-A	750-818-GSGSG-889-1006	196	22.435
SR5-SR6- Δ SH3-B	750-818-GSG-889-1006	194	22.291
SR6	919-1003	89	10.299
SR6-SR7-B	919-1123	209	23.723
SR6-SR8-B	914-1233	324	36.918
SR6-SR9-B	914-1372	463	53.305
	914-1372 ^a	480	55.187
SR8-SR9-B	1107-1372	270	31.344
SR9	1234-1372	143	16.816

^a Este fragmento contiene una cola de seis His en su extremo N-terminal, que consiste en la secuencia MGSSHHHHHSSGLVPR.

^b La numeración corresponde a la variante 1C de plectina humana.

^c Las proteínas contienen en su extremo N-terminal la secuencia adicional GSHM.

^d Los valores se han calculado a partir de la secuencia teórica de aminoácidos.

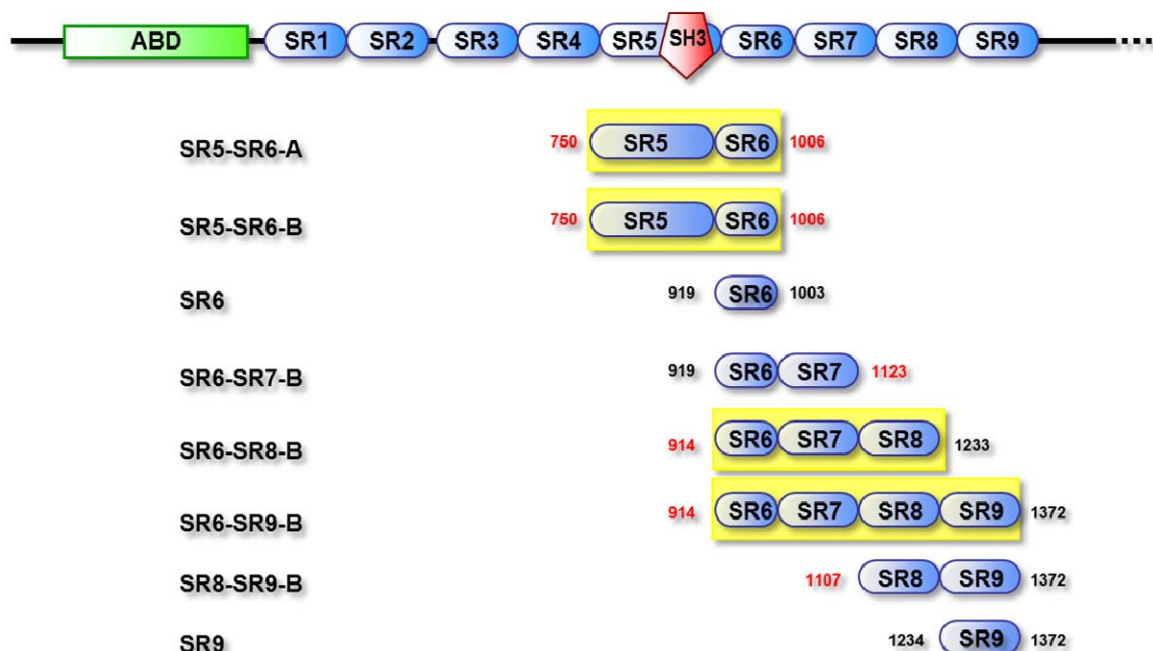


Figura R2.- Segunda colección de fragmentos del dominio plakina. Los fragmentos que se expresan solubles aparecen sombreados en amarillo. En rojo, se indican los nuevos límites utilizados para algunos de los SRs de esta segunda colección de fragmentos.

Capítulo 4

De los ocho fragmentos recombinantes que integran esta segunda colección, seis de ellos corresponden a la región C-terminal del dominio plakina: SR6, SR6-SR7-B, SR6-SR8-B, SR6-SR9-B, SR8-SR9-B y SR9, mientras que los dos fragmentos restantes corresponden a la región central del dominio plakina: SR5-SR6, en los cuales se ha eliminado el dominio SH3.

Estas dos construcciones de la región central se diseñaron en base a la estructura cristalográfica del fragmento SR4-SR5, que revela la inserción del dominio SH3 en un lazo que une dos hélices del SR5, aunque no establece ningún contacto con el SR5 (Ver sección 2.2 de Resultados). Por tanto, parece razonable pensar que el dominio SH3 pueda ser sustituido por una secuencia corta de aminoácidos, sin que esto conlleve la alteración de la estructura y la estabilidad del SR5. Se construyeron dos variantes de este fragmento, denominadas SR5-SR6 Δ SH3-A y SR5-SR6 Δ SH3-B, que difieren en la longitud de la secuencia de aminoácidos empleada para sustituir al dominio SH3. Por un lado, en el fragmento SR5-SR6 Δ SH3-A, el SH3 se sustituyó por el pentapéptido GSGSG; mientras que en el fragmento SR5-SR6 Δ SH3-B se sustituyó por el tripéptido: GSG (Figura R3).

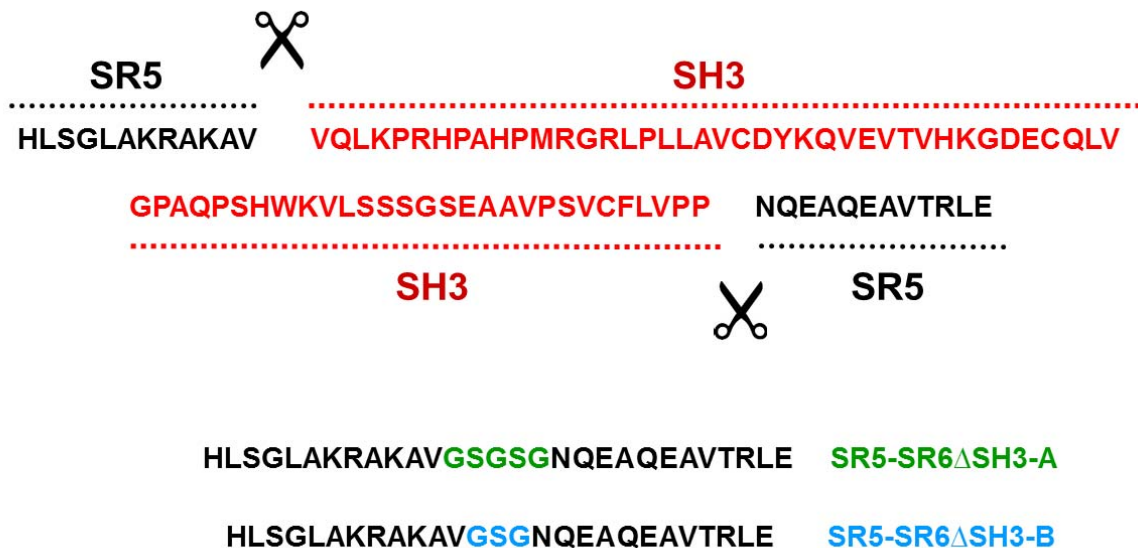


Figura R3.- Secuencia de aminoácidos correspondientes a una región correspondiente al SR5 y al dominio SH3. La secuencia del dominio SH3 que se eliminó en los fragmentos SR5-SR6 Δ SH3-A y B, está representada en rojo. En su lugar, se insertó un lazo de cinco aminoácidos: GSGSG (en verde) o tres aminoácidos: GSG (en azul).

De los ocho fragmentos que componen esta segunda colección las dos versiones del SR5-SR6 Δ SH3 (A y B), SR6-SR8-B y SR6-SR9-B se expresan solubles en *E.coli*. Por el contrario, los fragmentos: SR6, SR6-SR7-B, SR8-SR9-B y SR9 se expresan como proteínas insolubles.

1.4.- Cristalización de proteínas de la segunda colección de fragmentos del dominio plakina.

Los cuatro fragmentos de esta segunda colección que se expresan solubles, se purificaron y se sometieron a ensayos de cristalización. Se obtuvieron cristales de las dos variantes del fragmento SR5-SR6- Δ SH3 (A y B), cuya estructura se resolvió mediante difracción de rayos-x (Ver sección 2.3 de Resultados).

1.5.- Fragmento adicional del dominio plakina

Por último se diseñó una construcción que incluye un mayor número de SRs, que corresponde a la región SR3-SR9 del dominio plakina

Tabla R3. Parámetros de un fragmento adicional del dominio plakina de plectina.

Fragmento	Límites de secuencia ^b	Nº de aminoácidos ^c	Peso molecular Teórico (Daltons)
SR3-SR9 ^a	543-1372 ^d	851 ^d	97.480

^a En este fragmento está presente el dominio SH3.
^b La numeración corresponde a la variante 1C de plectina humana.
^c Las proteínas contienen en su extremo N-terminal la secuencia adicional GS₆HM.
^d Este fragmento contiene una cola de seis His en su extremo N-terminal, que consiste en la secuencia MGSSHHHHHHSSGLVPR.

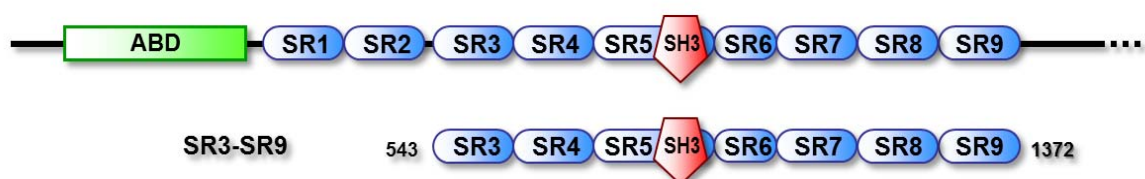


Figura R4.- Fragmento adicional del dominio plakina de plectina. Fragmento recombinante de mayor tamaño que incluyen los siete sub-dominios (SRs) (SR3-SR9) y el dominio SH3.

Este fragmento de plectina se expresa soluble en *E.coli*. Se purificó mediante cromatografía de afinidad de forma similar a como se purificaron los fragmentos de menor tamaño, si bien la cola de ocho His no se digirió con la proteasa y además se incluyó una etapa de purificación adicional mediante cromatografía de exclusión

Capítulo 4

molecular. La caracterización estructural de este fragmentos se realizó aplicando métodos de SAXS.

En resumen, se construyeron 21 fragmentos de plectina (Tabla R4). De éstos, 13 se produjeron como proteínas solubles en bacteria y se emplearon para la caracterización estructural del dominio plakina a diferentes niveles de resolución aplicando métodos estructurales complementarios, tal como se describe a continuación.

Tabla R4.- Resumen de los fragmentos del dominio plakina de plectina construidos para la caracterización estructural de esta región.

Fragmento	Expresión soluble 15° C	Expresión soluble 37° C	Ensayos cristalográficos	Obtención de Cristales	Estructura cristalográfica	Análisis SAXS
SR3-SR9	Si	Si	N.A	N.A	N.A	Si
SR3-SR4	Si	Si	Si	Si	Si	N.A
SR3-SR5	Si	Si	Si	No	No	Si
SR3-SR6	Si	Si	Si	No	No	Si
SR4-SR5	Si	No	Si	Si	Si	N.A
SR4-SR6	Si	No	Si	No	No	N.A
SR5-SR6	No	No	N.A	N.A	N.A	N.A
SR5-SR6- Δ SH3-A	Si	Si	Si	Si	Si	N.A
SR5-SR6- Δ SH3-B	Si	Si	Si	Si	Si	N.A
SR6	No	No	N.A	N.A	N.A	N.A
SR6-SR7	No	No	N.A	N.A	N.A	N.A
SR6-SR7-B	No	No	N.A	N.A	N.A	N.A
SR6-SR8	Si	No	Si	No	No	N.A
SR6-SR8-B	Si	Si	Si	No	No	N.A
SR6-SR9	Si	No	Si	No	No	N.A
SR6-SR9-B	Si	No	Si	No	No	Si
SR7-SR8	Si	Si	Si	Si	Si	N.A
SR7-SR9	Si	Si	Si	Si	Si	Si
SR8-SR9	No	No	N.A	N.A	N.A	N.A
SR8-SR9-B	Si	No	Si	No	No	N.A
SR9	No	No	N.A	N.A	N.A	N.A

N.A. No Analizado.

2.- ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE FRAGMENTOS MULTI-DOMINIO DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA.

Se resolvió la estructura cristalográfica de los siguientes fragmentos del dominio plakina de plectina: SR3-SR4, SR4-SR5, dos construcciones de SR5-SR6- Δ SH3, SR7-SR8 y SR7-SR9. Colectivamente estas 6 estructuras cubren la región comprendida entre el SR3 y SR9 del dominio plakina (Figura R5). A continuación, se describe la estructura cristalográfica de cada una de estas regiones.

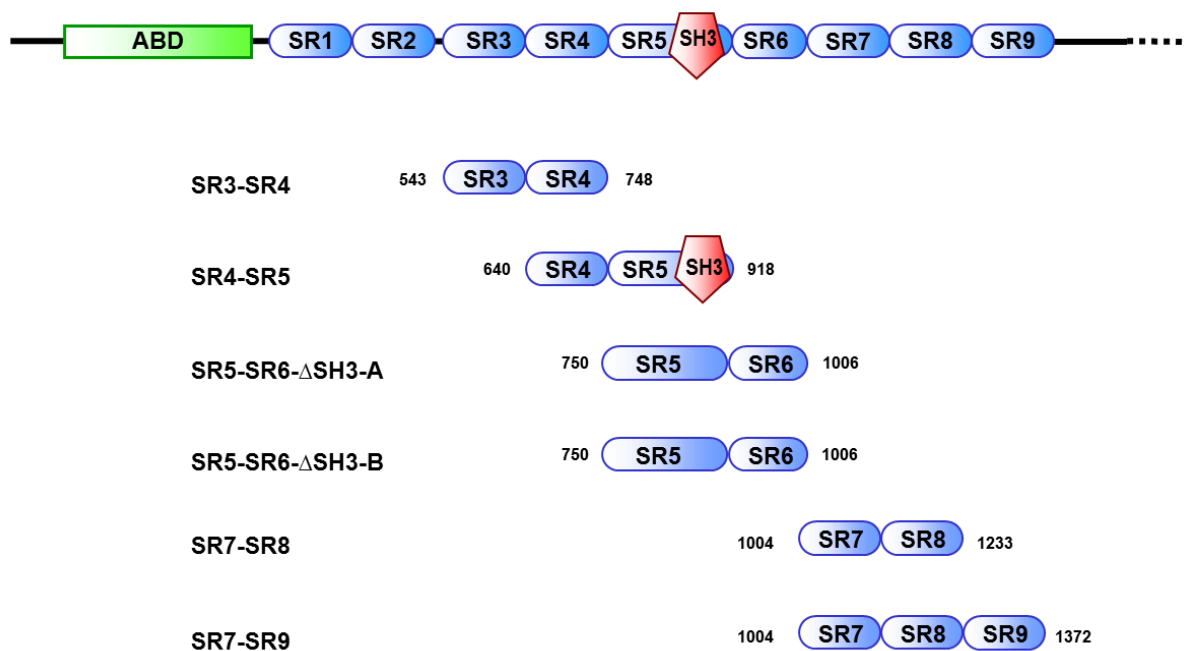


Figura R5.- Fragmentos del dominio plakina de plectina cuyas estructuras cristalográficas se han resuelto en este estudio Las dos variantes del fragmento SR5-SR6- Δ SH3 difieren en la secuencia empleada para sustituir al dominio SH3.

2.1.- Estructura cristalográfica del SR3-SR4.

2.1.1.- Difracción de los cristales de SR3-SR4 y resolución de la estructura.

A partir de un cristal del fragmento SR3-SR4 (aminoácidos 543-748) se tomó un juego de datos de difracción a una resolución máxima de 2.22 Å empleando un generador de rayos-x de ánodo rotatorio. Los cristales de SR3-SR4 pertenecen al grupo espacial $P2_12_12$ con unas dimensiones de la celda unidad de $a=97.4$ Å, $b=119.4$ Å y $c=44.6$ Å (Tabla R5).

Tabla R5.- Estadísticas del procesamiento de los datos de difracción del SR3-SR4.

SR3-SR4 (543-748)	
Conjunto de datos	Nativo
Grupo espacial	$P2_12_12$
Dimensiones de la celda unidad (Å)	$a=97.4$ Å $b=119.4$ Å $c=44.6$ Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Longitud de onda	1.5418
Resolución (Å)	2.22 (2.30-2.22) ^a
Reflexiones únicas	26066
Multiplicidad promedio	7.0 (5.9) ^a
Completitud (%)	98.4 (92.1) ^a
Rmeas^b (%)	6.0 (44.4) ^a
$\langle I/\sigma \rangle$	23.1 (4.9) ^a

^a Los valores entre paréntesis corresponden a los datos de la concha de mayor resolución.

^b Rmeas es el factor independiente R de multiplicidad descrito por Diederichs y Karplus (Diederichs & Karplus, 1997)

De acuerdo con el grupo espacial, las dimensiones de la celda unidad y el peso molecular de la proteína (24.2 kDa) lo más probable era que la unidad asimétrica contuviera 2 o 3 moléculas de SR3-SR4, que corresponden a contenidos de solvente de 55% y 32% respectivamente según los cálculos realizados con el programa MATTHEWS_COEFF de CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). La función de auto-rotación calculada con el programa GLRF (Tong & Rossmann, 1997) indicó la presencia de ejes binarios de simetría no cristalográfica perpendiculares al eje c , que forman 45° con los ejes a y b . Únicamente la sección polar $\kappa = 180^\circ$ mostró picos significativos que diferían de aquellos que corresponden a la simetría cristalográfica (Figura R6).

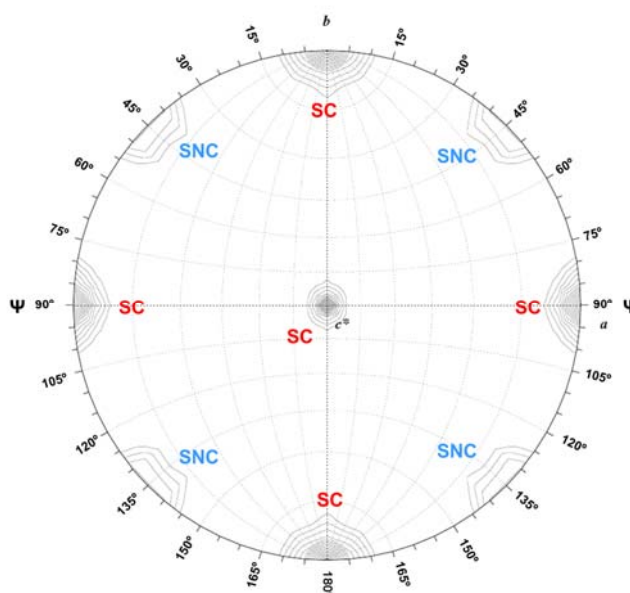


Figura R6.- Función de auto-rotación del fragmento SR3-SR4.-Proyección estereográfica de la sección polar $\kappa = 180^\circ$ de la función de auto-rotación. El gráfico se generó con el programa GRLF (Tong & Rossmann, 1997) usando datos en un rango de resolución 15.0–3.0 Å. El radio de integración fue de 32 Å. Se observan 4 picos que corresponden a ejes de simetría no cristalográfica (SNC) en $\Psi=45^\circ$, $\Phi=0^\circ$; $\Psi=135^\circ$, $\Phi=0^\circ$ y las posiciones equivalentes. Los picos pertenecientes a la simetría cristalográfica se indican como SC.

La estructura cristalográfica del fragmento SR3-SR4 se resolvió mediante el método de reemplazo molecular. La búsqueda se realizó empleando un modelo de homología basado en la estructura cristalográfica de la región SR3-SR4 de BPAG1 (código PDB: 2IAK) (Jefferson et al, 2007). La estructura de BPAG1 cubre el 85% del SR3-SR4 de plectina, existiendo 65% de identidad de secuencia entre plectina y BPAG1 en esta región. En la búsqueda se localizaron dos moléculas de SR3-SR4 en la unidad asimétrica, en el grupo espacial $P2_12_12$.

La estructura se refinó frente a datos de difracción a 2.22 Å de resolución usando el programa PHENIX.REFINE (Afonine et al, 2005). Las dos moléculas de SR3-SR4 se refinaron de forma independiente. Inicialmente el modelo se refinó empleando el método de recocido simulado (*simulated annealing*), tras el cual el factor R cristalográfico (*Rwork*) fue de 37.6% y el *Rfree* (calculado con el 5 % de la reflexiones omitidas en el refinado) fue de 42.4%. El modelo se fue completando manualmente usando el programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004) basándose en la inspección de los mapas $2mF_{obs}-DF_{calc}$ y $mF_{obs}-DF_{calc}$. Posteriormente se alternó la modificación manual del modelo con refinado posicional, refinado de valores B

isotrópicos individuales y refinado de 3 grupos TLS en cada molécula. Se incluyeron moléculas de solvente en picos positivos sobre 3σ en los mapas de diferencia $mF_{obs}-DF_{calc}$ y sobre 1σ en los mapas $2mF_{obs}-DF_{calc}$ cuando se apreció un entorno de puentes de hidrógeno razonable. El refinado convergió en un R_{work} de 20.4 % y un R_{free} de 24.8 %. En la Tabla R6 se muestran las estadísticas del refinado del modelo estructural del SR3-SR4.

Tabla R6.- Estadísticas del refinado de la estructura SR3-SR4.

SR3-SR4 (543-748)	
Rango de resolución (Å)	20-2.22
Reflexiones únicas, work/free	24757 / 1315
R work (%)	20.4
R free^a (%)	24.8
Número de aminoácidos^b	202 / 205
Número de moléculas de solvente	210
Número de hetero-compuestos	2
Valor B promedio (Å²)	
Wilson plot	34.0
Proteína^b	40.1 / 41.7
Solvente	44.1
Etilenglicol	52.9
RMSD	
Longitudes de enlace (Å)	0.004
Ángulos de enlace (°)	0.679
Aminoácidos en las regiones del gráfico de Ramachandran^b	
Más favorecidas	401 (99.5%)
Adicionalmente permitidas	2 (0.5%)
No permitidas	0 (0.0%)
Código PDB	3PDY

^a Calculado con el 5% de las reflexiones que no se incluyeron en el refinado.

^b Valores para la moléculas A y B, respectivamente.

^c Calculado con el programa MOLPROBITY (Davis et al, 2007)

El modelo final incluye los residuos 545-746 en la molécula A y 543-745 en la molécula B. Además, en la molécula B se observa densidad electrónica en el extremo amino donde se modelan dos residuos (His y Met) de la secuencia GSHM. Adicionalmente se observaron dos segmentos de densidad electrónica junto a la molécula A, uno de ellos entre el E696 y el Q728 que se modeló como una molécula de polietilenglicol (PEG) y otro segmento entre S634 y S641 que se modeló como una molécula de dihidroxiéter. El modelo final también incluye 210 moléculas de solvente. Esta estructura presenta una geometría excelente, con el 99.5% de los

ángulos de torsión de la cadena principal localizados en zonas favorecidas del gráfico de Ramachandran y el 0.5% restante en regiones adicionalmente permitidas (Figura R7).

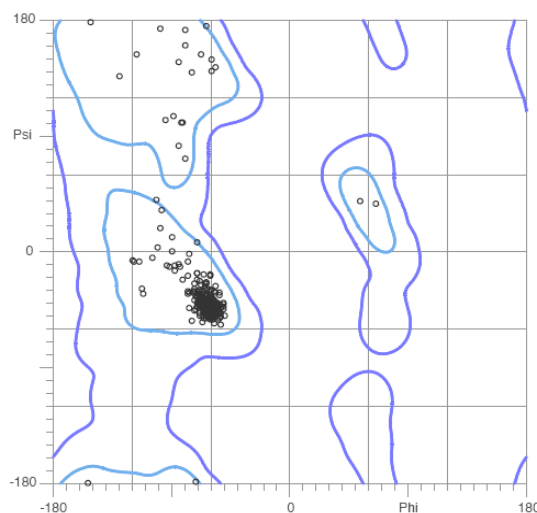


Figura R7.-Diagrama de Ramachandran de la estructura SR3-SR4.

2.1.2.- Descripción de la estructura del SR3-SR4.

Las dos moléculas de SR3-SR4 presentes en la unidad asimétrica tienen una estructura muy similar. Cada SR presenta un plegamiento canónico que consiste en 3 α -hélices (A, B y C) que se unen entre sí de manera antiparalela mediante lazos cortos y se agrupan en un haz con giro levógiro (Pascual et al, 1996; Pascual et al, 1997b). Estas hélices están formadas por “*héptadas repetitivas*” (abcdefg), en las que aminoácidos hidrofóbicos ocupan las posiciones a y d situándose en el mismo lado de la hélice, el cual se oriente hacia el interior del haz. Los dos SRs están conectados mediante una α -hélice continua que se forma por la fusión de la hélice C del SR3 y la hélice A del SR4 (Figura R8). Esta disposición relativa del SR3 y SR4, denominada en *tandém*, hace que el SR3-SR4 tenga una estructura global similar a un cilindro con ~ 100 Å de longitud y ~ 25 Å de diámetro. Esta organización estructural es similar a la observada en otros pares de SRs (Jefferson et al, 2007; Sonnenberg et al, 2007).

La estructura de cada SR individual en las dos moléculas de la unidad asimétrica del cristal es casi idéntica, siendo la diferencia cuadrática media (rmsd) en la posición de los C α de 1.19 Å para el SR3 y 0.54 Å para el SR4. La única diferencia significativa

se localiza en el primer par de vueltas de la hélice A y en el lazo B/C del SR3, que se empaquetan más estrechamente en una molécula que en otra, debido a los contactos dentro del cristal.

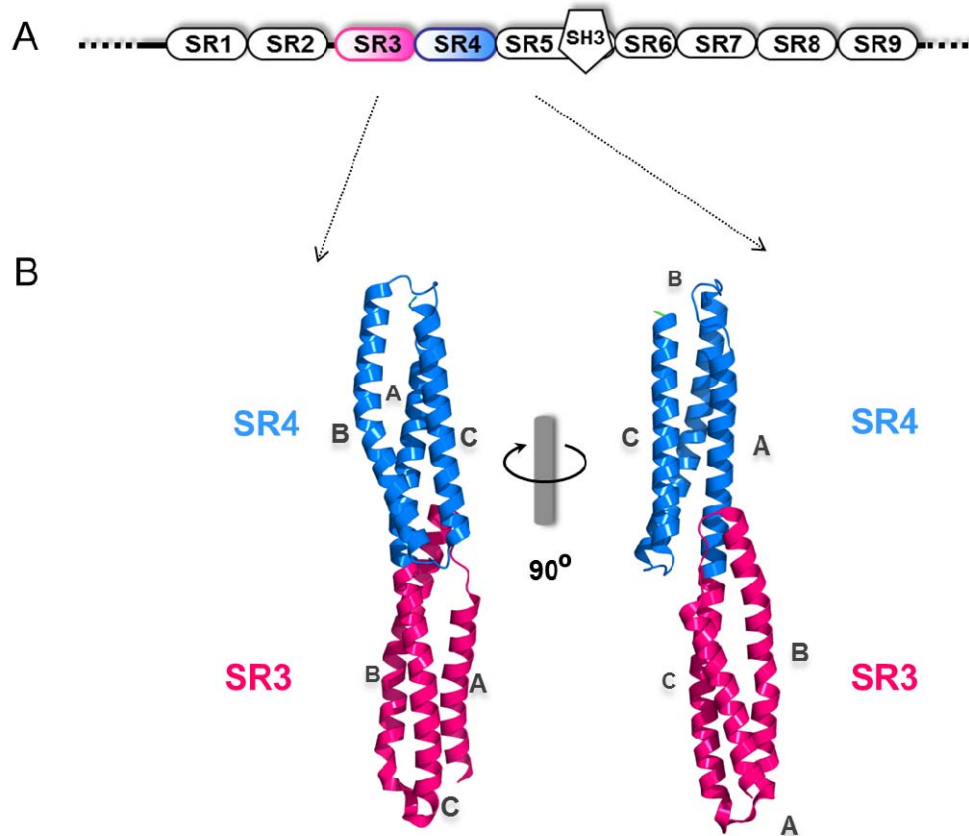


Figura R8.- Estructura cristalográfica de la región SR3-SR4 de dominio plakina de plectina.- (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina, la región estudiada se corresponde con los sub-dominios SR3 (rosa) y SR4 (azul). (B) Dos vistas ortogonales de la representación en lazos de la estructura cristalográfica del SR3-SR4.

La estructura de la región del SR3-SR4 de plectina es muy similar a la región equivalente de BPAG1. Tras superponer cada SR individual de BPAG1 sobre el SR equivalente de plectina, la rmsd para todos los átomos de la cadena principal es 1.00 y 1.32 Å para el SR3 (con cada una de las moléculas de la unidad asimétrica) y 0.75 y 0.79 Å para el SR4. La estructura del SR3-SR4 de plectina se resolvió a mayor resolución (2.22 Å) que la estructura de la región equivalente de BPAG1 (3.0 Å), lo que permitió observar detalles que no habían sido visibles en la estructura de BPAG1. Éstos incluyen: el lazo A/B, las dos primeras vueltas de la hélice B y las

cadena lateral de residuos que se encuentran en las hélices A y B del SR4 (Figura R9). La hélice A es aproximadamente dos vueltas de hélice más corta que las hélices adyacentes B y C, en consecuencia el lazo A/B cubre parte del núcleo hidrofóbico del SR. El W671, que se localiza en el lazo A/B, está enterrado en el interior del haz y las cadenas laterales de D670 y N675 establecen puentes de hidrógeno que contribuyen a estabilizar la conformación de este lazo.

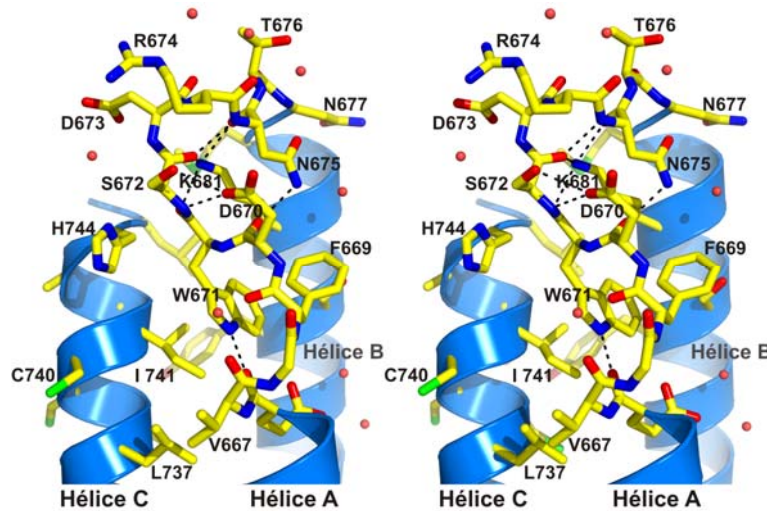


Figura R9.- Estructura del lazo A/B del SR4 en la estructura SR3-SR4. Vista estereoscópica de la región del SR4 alrededor del lazo A/B. El W671 está enterrado en el interior del haz helicoidal. Las cadenas laterales de D670 y N675 forman puentes de hidrógeno con la cadena principal favoreciendo la conformación de esta región.

La comparación entre sí de las dos moléculas de plectina presentes en la unidad asimétrica, revela pequeñas diferencias en la orientación relativa del SR3 y SR4. Tras superponer el SR3 de ambas moléculas se observa un desplazamiento de 4.5 Å en la posición de los C α de los residuos del lazo A/B del SR4 (Figura R10). Estas dos conformaciones del SR3-SR4 están relacionadas por un movimiento de cierre en el que cada SR se comporta como un cuerpo rígido y existe una bisagra localizada en la zona de unión SR3/SR4.

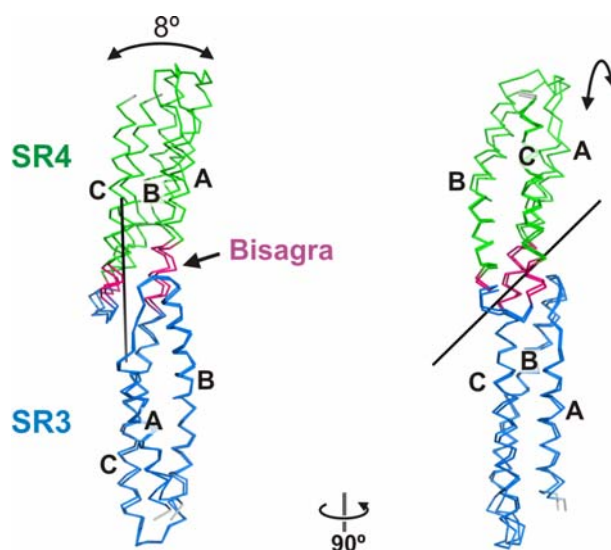


Figura R10.- Identificación del movimiento de bisagra del tándem SR3-SR4 por comparación de la estructura de las dos moléculas de la unidad asimétrica. Dos vistas ortogonales de las dos moléculas de SR3-SR4 tras superponer los SR3. Las estructuras están coloreadas según los dominios que se mueven, identificados con el programa DynDom (Hayward & Berendsen, 1998) que se corresponden aproximadamente con el dominio SR3 (azul) y SR4 (verde). Los residuos que actúan como bisagra (morado) se localizan cerca de la unión SR3/SR4. El eje de rotación del movimiento de bisagra se muestra como una línea negra y las flechas indican la dirección del movimiento.

2.2.- Estructura cristalográfica del SR4-SR5.

2.2.1.- Difracción de los cristales de SR4-SR5 y resolución de la estructura.

La estructura cristalográfica del fragmento SR4-SR5 (aminoácidos 640-918) se resolvió mediante remplazo isomorfo simple con dispersión anómala (SIRAS), usando datos de un cristal nativo y de un cristal derivado con el compuesto mercurial EMTS. Los datos de difracción de ambos cristales se midieron utilizando un generador de rayos-x de ánodo rotatorio. El cristal nativo difractó a una resolución máxima de 2.95 Å, mientras que el cristal derivado difractó a 3.4 Å de resolución (Tabla R7).

Los cristales nativos de SR4-SR5 pertenecen al grupo espacial $P2_12_12_1$, siendo las dimensiones de su celda unidad $a=72.7$ Å, $b=108.5$ Å y $c=112.1$ Å. El cristal derivado con 1 mM EMTS fue isomorfo con el nativo. En base al grupo espacial, las dimensiones de la celda unidad y el peso molecular de SR4-SR5 (32.1 kDa), la unidad asimétrica contendría probablemente 2 o 3 moléculas de SR4-SR5, que corresponde a un contenido de solvente de 64% y 46%, y a un coeficiente de Matthews (V_M) (Kantardjieff & Rupp, 2003; Matthews, 1968) de 3.41 y 2.27 Å³/Da respectivamente.

Tabla R7.- Estadísticas del procesado de los datos de difracción del SR4-SR5.

SR4-SR5 (640-918)		
Conjunto de datos	Nativo	1 mM EMTS
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda unidad (Å)	a=72.7 Å b=108.5 Å c=112.1 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=72.2 Å b=107.9 Å c=113.0 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Longitud de onda (Å)	1.5418	1.5418
Resolución (Å)	2.95 (3.05-2.95) ^a	3.40 (3.53-3.40) ^a
Reflexiones únicas	18051	22352 ^b
Multiplicidad promedio	14.3 (14.5) ^a	7.8 (7.7) ^a
Compleitud (%)	93.6 (85.5) ^a	95.1 (98.6) ^a
Rmeas ^c (%)	5.9 (43.9) ^a	8.9 (62.4) ^a
<I/σI>	29.4 (6.9) ^a	16.5 (3.9) ^a
Riso ^d (%)		32.1
Poder de faseado iso acent / iso cent / ano		0.84 / 0.92 / 0.64
Figura de mérito (FOM) acéntricas / céntricas		0.16 / 0.17

^a Los valores entre paréntesis corresponden a los datos de la concha de mayor resolución

^b Los pares de Bijvoet se mantienen separados.

^c Rmeas es el factor independiente R de multiplicidad descrito por Diederichs y Karplus (Diederichs & Karplus, 1997)

^d Riso = $\sum ||F_{der}| - |F_{nat}|| / \sum |F_{nat}|$, donde Fder es el factor estructural del derivado con el átomo pesado y el Fnat es el factor estructural de la proteína nativa.

Con el fin de analizar con más detalle el contenido de la unidad asimétrica y la posible organización de las moléculas de SR4-SR5 presentes en ella, se calculó la función de auto-rotación. En ninguna de las secciones de la representación se observaron picos diferentes de los debidos a la simetría cristalográfica (Figura R11A). El mapa de Patterson calculado a partir de datos del cristal nativo (Figura R11B) mostró un pico en 0.00, 0.00, 0.46, que revela la presencia de simetría cristalográfica traslacional, según la cual, las moléculas están relacionadas por una traslación de ~52 Å a lo largo del eje c.

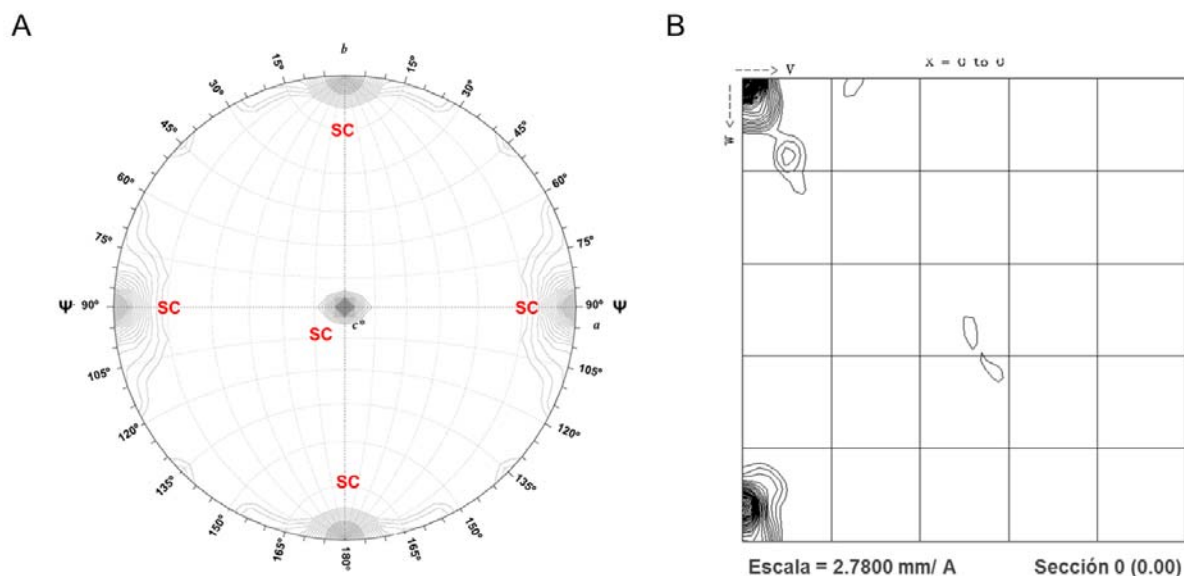


Figura R11. Análisis de la simetría no cristalográfica en los cristales de SR4-SR5. (A) Función de auto-rotación. Proyección estereográfica de la sección polar $\kappa = 180^\circ$. El gráfico se ha generado con el programa GRLF (Tong & Rossmann, 1997) usando datos en un rango de resolución 25-3.2 Å y un radio de integración de 34 Å. (B) Mapa de Patterson nativo calculado con datos hasta 3.2 Å. La sección U = 0 del mapa muestra un máximo en la posición 0.00 0.00 0.46 (esquina inferior izquierda).

La elucidación de la sub-estructura de los átomos de Hg y el cálculo de las fases iniciales a partir de ésta, se realizaron con los programas SHELXC/D/E (Schneider & Sheldrick, 2002) empleando la interfaz gráfica HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004). Las posiciones de los 4 átomos de Hg con mayor ocupación que se encontraron con SHELXD y las distribuciones de probabilidad de sus fases se refinaron posteriormente con el programa autoSHARP (Bricogne et al, 2003). En este proceso se identificó un sitio adicional minoritario para otro átomo de Hg. Las fases que se obtuvieron con SHARP se mejoraron y se extendieron utilizando los programas SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) y DM (Cowtan, 1994). De esta forma se obtuvo un mapa de densidad electrónica interpretable (Figura R12).

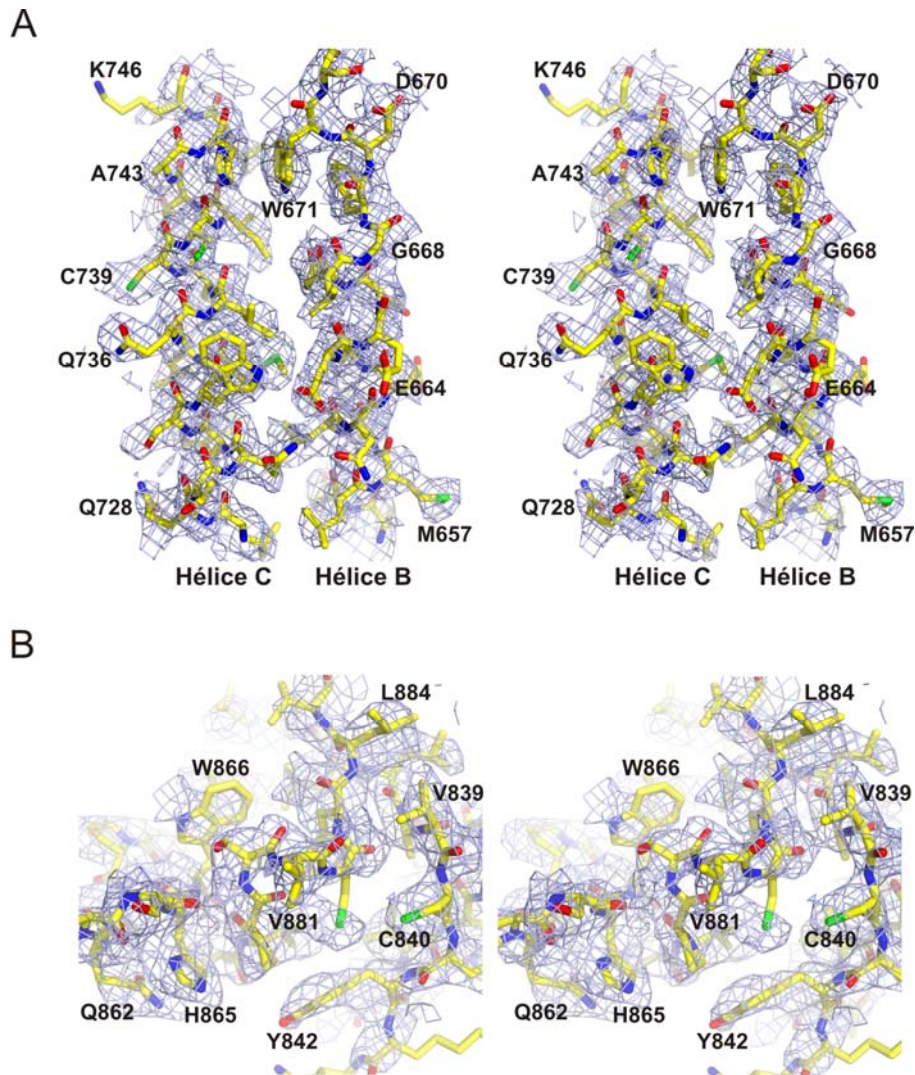


Figura R12.- Mapa de SIRAS de la estructura SR4-SR5. Vistas estereoscópicas de dos zonas representativas del mapa calculado con las fases derivadas de SIRAS, después de la modificación de densidad. El mapa está contorneado a 1σ . (A) Sección correspondiente a las hélices B y C del SR4. (B) Sección correspondiente al dominio SH3, alrededor de la V881.

Para la construcción de la estructura, inicialmente se localizaron dos copias del SR4, de la estructura SR3-SR4, en el mapa de densidad electrónica utilizando el programa MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997). A continuación, se construyeron manualmente las 3 α -hélices del SR5 dentro del mapa de densidad electrónica, usando el programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004). En un tercer paso se construyó un modelo de homología mixto (Schwarzenbacher et al, 2004) del dominio SH3 a partir de la estructura cristalográfica del SH3 de α -espectrina (código PDB: 2PQH), que presenta un 31% de identidad de secuencia con el SH3 de plectina, y se

Capítulo 4

ajustaron manualmente dos copias de esta estructura del SH3 en el mapa experimental.

La estructura se refinó frente a datos nativos de difracción a 2.95 Å usando PHENIX.REFINE (Afonine et al, 2005). En las etapas iniciales de refinado se empleó el método de recocido simulado. En etapas posteriores, se realizó refinado posicional combinado con el refinado de valores B agrupados (dos grupos por residuo) y de 5 grupos TLS en cada molécula. Durante el refinado se incluyeron restricciones de simetría no cristalográfica empleando 10 grupos NCS y restricciones de distancias de enlaces de hidrógeno en la cadena principal.

Usando las diferencias anómalas de los datos de difracción del cristal nativo y las fases obtenidas por SIRAS, se calculó un mapa anómalo, en el cual se observó la mayor densidad en dos picos cerca de los residuos Q792 y D789 en cada una de las moléculas de SR4-SR5. La señal anómala para estos dos picos es mayor que la correspondiente a cualquier átomo de azufre de la proteína. Basándonos en el entorno de estos picos (cerca de los carbonilos del D789 y Q792) se modelaron como dos iones de Ca^{2+} , cuyo valor B se refinó anisotrópicamente.

El refinado convergió en valores de *Rwork* y *Rfree* de 24.1% y 26.5%, respectivamente (Tabla R8). El modelo final incluye los aminoácidos 642-915 en ambas moléculas, a excepción de los residuos 871-873 de la molécula A y los residuos 830-832 de la molécula B, que no se modelaron ya que no se observó una clara densidad electrónica en estas regiones. La estructura tiene una geometría correcta con el 96.8% de los aminoácidos localizados en las regiones más favorables del diagrama de Ramachandran, el 3.2% en regiones adicionalmente permitidas y ningún residuo en zonas prohibidas (Figura R13).

Tabla R8.- Estadísticas del refinado de la estructura SR4-SR5.

SR4-SR5 (640-918)	
Rango de resolución (Å)	20 - 2.95
Reflexiones únicas, work/free	17102 / 9125
R work (%)	24.1
R free ^a (%)	26.5
Número de aminoácidos ^b	271 / 271
Número de Ca ²⁺	2
Valor B promedio (Å ²)	
Wilson plot	75.3
Proteína ^b	91.2 / 88.3
Ca ²⁺	84.2
RMSD	
Longitud de enlace (Å)	0.013
Ángulo de enlace (°)	1.031
Aminoácidos en las regiones del gráfico de Ramachandran ^c	
Más favorecidas	517 (96.8%)
Adicionalmente permitidas	17 (3.2%)
No permitidas	0 (0.0%)
Código PDB	3PEO

^a Calculado con el 5% de las reflexiones que no se incluyeron en el refinado.

^b Valores para la moléculas A y B, respectivamente.

^c Calculado con el programa MOLPROBITY (Davis et al, 2007)

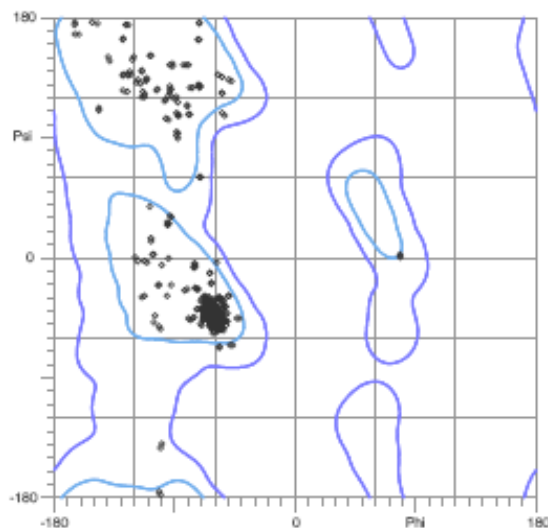


Figura R13.- Diagrama de Ramachandran de la estructura SR4-SR5

2.2.2.- Descripción de la estructura del SR4-SR5.

La estructura del SR4-SR5 está formada por dos sub-dominios o SRs organizados en tándem que dan lugar a una estructura con forma alargada de ~ 104 Å de longitud. La hélice C del SR4 y la hélice A del SR5 se fusionan en una única hélice continua que se expande por ambos SRs, esta disposición es similar a la observada en la estructura del SR3-SR4 y de otros pares de SR en tándem. Las hélices A y B del SR4 y las hélices B y C del SR5 se sitúan en lados opuestos respecto al eje longitudinal de la molécula (Figura R14), por lo que no hay más contactos directos entre el SR4 y el SR5 que los que tienen lugar en la hélice que los une. Esta región incluye un dominio SH3 insertado en el lazo que une las hélices B y C del SR5. A pesar de que este dominio SH3 está insertado en el SR5, no altera la estructura global del SR5 respecto a otros SR canónicos, ni la organización genérica del tándem SR4-SR5 formando una estructura alargada.

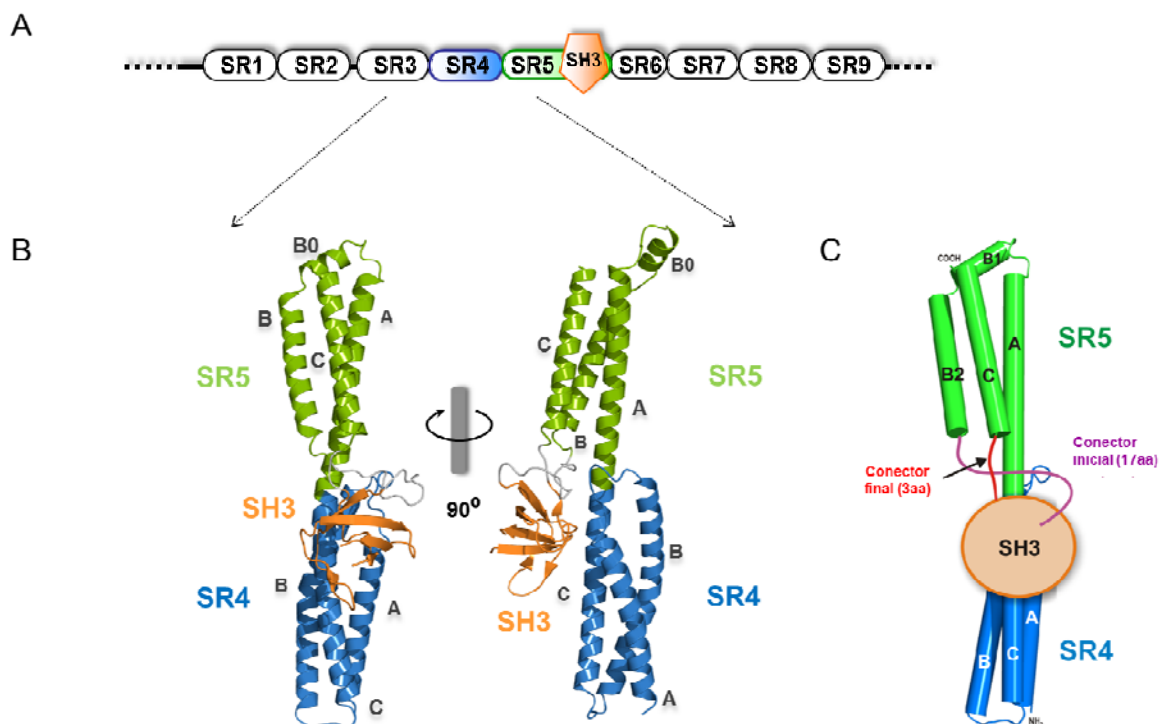


Figura R14.- Estructura cristalográfica de la región SR4-SR5 del dominio plakina de plectina. (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina, la región estudiada se corresponde con los sub-dominios SR4 (azul), SR5 (verde) y el SH3 (naranja). (B) Dos vistas ortogonales de la representación en lazos de la estructura cristalográfica del SR4-SR5. (C) Representación esquemática de la estructura cristalográfica del SR4-SR5, en la que se muestra la inserción del dominio SH3 en el SR5 a través de un conector inicial (17 aminoácidos) y un conector final (3 aminoácidos) y su disposición respecto al SR4.

Las dos moléculas del SR4-SR5 de la unidad asimétrica son muy similares entre sí, siendo la diferencia cuadrática media (rmsd) en la posición de los C α de la cadena principal de toda la molécula de 0.33 Å.

La estructura del SR4 en el fragmento SR4-SR5 es muy similar a la observada en el fragmento SR3-SR4. La única diferencia notable en el SR4 entre las dos estructuras reside en el lazo A/B (Figura R15), donde se observa un desplazamiento de 6 Å en los C α de la cadena principal entre ambas estructuras. Estas diferencias se deben al diferente contexto estructural del lazo A/B en estos fragmentos. En la estructura del SR4-SR5, el lazo A/B contacta con el SH3 y con el SR5, mientras que los sitios para este contacto están ausentes en la estructura SR3-SR4. Por tanto, la conformación nativa del lazo A/B en la proteína completa está mejor representada en la estructura del SR4-SR5.

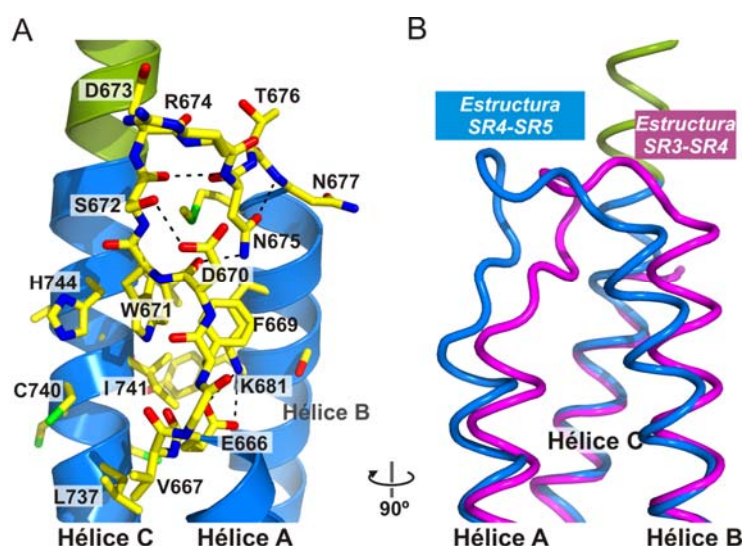


Figura R15.- Estructura del lazo A/B del SR4 en la estructura SR4-SR5. (A) Vista detallada de la región del SR4 alrededor del lazo A/B en la estructura SR4-SR5. (B) Comparación del lazo A/B en la estructura SR3-SR4 (rosa) y en la estructura SR4-SR5 (azul).

El SR5 exhibe el plegamiento característico de los SRs, formado por 3 α -hélices. Además, se observa una α -hélice adicional de 10 aminoácidos, denominada B0, que precede a la α -hélice B y que sobresale en un extremo del eje longitudinal de la molécula (Figura R14). La hélice B0 contiene un grupo de aminoácidos hidrofóbicos: V784, L787, L790 y L791, que interactúan con las α -hélices B y C del SR4 de la molécula vecina del cristal (Figura R16A). Era razonable pensar que en la proteína

Capítulo 4

completa, la superficie hidrofóbica de la hélice B0 establece interacciones análogas con el SR6, tal como se observó más tarde en las estructuras de la región SR5-SR6.

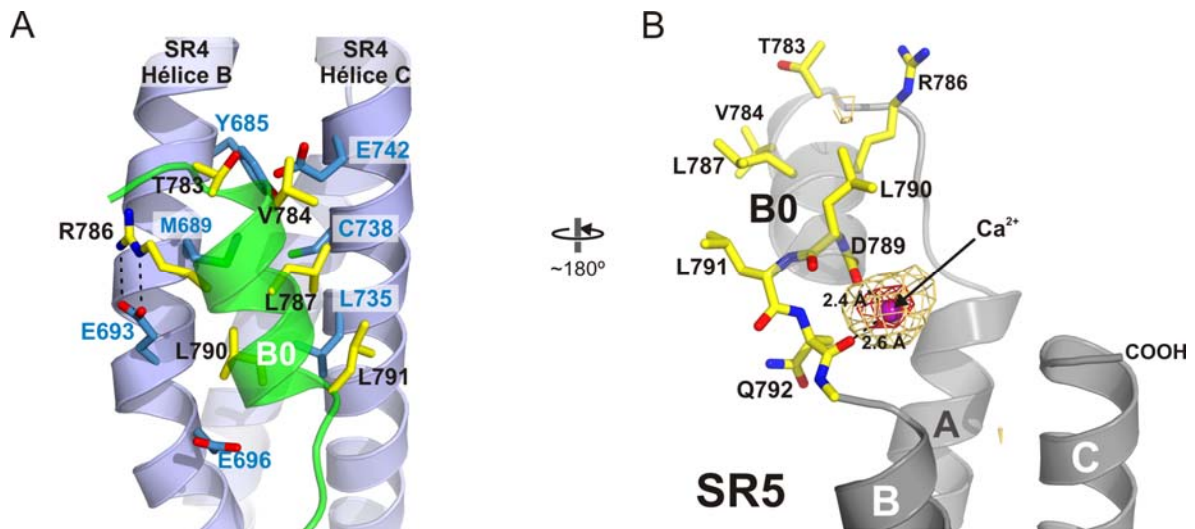


Figura R16.- Estructura de la hélice B0 del SR5. (A) Detalles de la interacción entre la hélice B0 (verde) y el SR4 (azul claro) de la molécula vecina del cristal. Las cadenas laterales de los residuos de la hélice B0 y del SR4 que participan en la interacción se muestran en amarillo y azul respectivamente. (B) Estructura del sitio de Ca²⁺ en el extremo carboxilo de la hélice B0. El Ca²⁺ se corresponde con el pico de mayor densidad en el mapa de diferencia anómala nativa que se calculó usando las fases experimentales de SIRAS. El contorno del mapa es 3.5 σ (naranja) y 7.0 σ (rojo). El Ca²⁺ está aparentemente coordinado por los grupos carbonilo del D789 y del Q792.

Próximo al extremo carboxilo de la hélice B0 del SR5, la estructura contiene un ión Ca²⁺ (Figura R16B). El calcio estaba presente en la solución de cristalización a alta concentración (0.2 M acetato de calcio). Se analizó el efecto del Ca²⁺ en la estabilidad térmica del SR4-SR5 en solución, usando un ensayo basado en fluorescencia. El perfil de desnaturalización térmica del fragmento SR4-SR5 en ausencia de Ca²⁺ se caracteriza por una temperatura de desnaturalización (T_M) de 45.5° C (Tabla R9, Figura R17). No se apreciaron cambios en la T_M en presencia de 5 mM EGTA para eliminar la posible presencia de Ca²⁺ residual, ni de 0.1 o 1 mM de CaCl₂. En presencia de concentraciones más elevadas de CaCl₂ (10 mM y 100 mM) se observó una ligera disminución de ~1.5° C en el valor de T_M . En resumen, el Ca²⁺ no aumenta la T_M tal como cabría esperar si el Ca²⁺ se uniera al estado nativo de la proteína. Por tanto, estos resultados sugieren que el ión Ca²⁺ observado en la estructura cristalográfica no representa un sitio funcional en condiciones fisiológicas.

Tabla R9.- Valor de T_M de la proteína SR4-SR5 con diferentes concentraciones de CaCl_2

CONDICIÓN	T_M (° C)
50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl	45.5
50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5mM EGTA	45.5
50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl_2	45.5
50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2	45.5
50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2	44.0
50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 mM CaCl_2	41.5

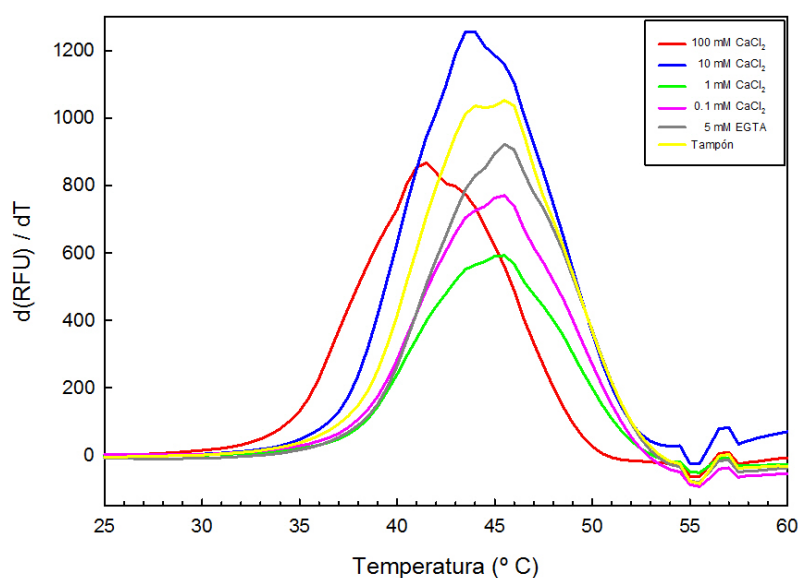


Figura R17.- Desnaturalización térmica del fragmento SR4-SR5 en presencia de CaCl_2 . En cada perfil de desnaturalización se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura. La T_M de la desnaturalización es similar ($\sim 45.5^\circ \text{C}$) en ausencia de Ca^{2+} , en presencia de 5 mM EGTA y en presencia de 0,1 y 1 mM de CaCl_2 . Se observó un desplazamiento moderado de la T_M (44°C) en presencia de 10 mM de CaCl_2 ; este máximo parece corresponder a un hombro que se aprecia en ausencia o con bajas concentraciones de Ca^{2+} . En presencia de 100mM CaCl_2 se aprecia una desestabilización térmica del fragmento SR4-SR5.

El dominio SH3 de plectina comparte la estructura general observada en otros dominios SH3 (Figura R18). Está formado por cinco hebras- β antiparalelas ($\beta 1$ - $\beta 5$) que forman un barril- β (Musacchio, 2002). La hebra $\beta 1$ del dominio SH3 se une al extremo carboxilo de la hélice B a través de un segmento de 17 residuos (817-833). Mientras que el extremo carboxilo del SH3 conecta con la hélice C a través de una secuencia de tres Pro (886-888). Denominamos estos dos segmentos como *conector inicial* y *conector final* respectivamente (Figura R14C).

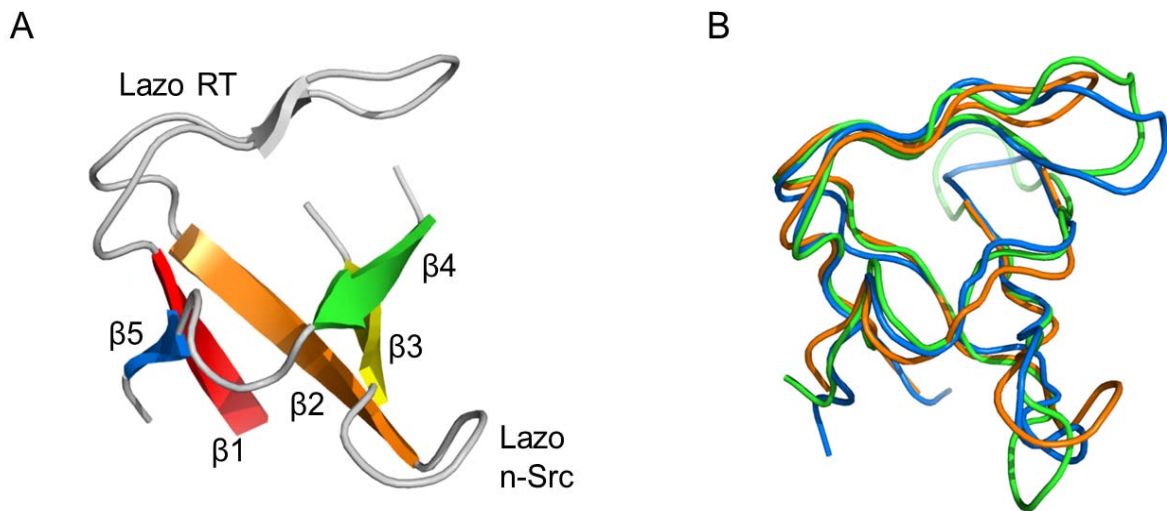


Figura R18.- Estructura del dominio SH3 de plectina. (A) Representación esquemática en lazos de la estructura cristalográfica del dominio SH3 de plectina resuelta en el fragmento SR4-SR5. Las cinco hebras- β (β 1- β 5) están coloreadas en rojo, naranja, amarillo, verde y azul, respectivamente. (B) Comparación de la estructura del SH3 de plectina (en naranja) con la estructura cristalográfica del dominio SH3 de α -espectrina (en azul) (código PDB: 1SHG) y con la estructura cristalográfica del SH3 de la familia C-Src de las Tyr-kinasas (en verde) (código PDB: 1PRM). Las tres estructuras se representan en forma de cordones.

2.2.3.- Interacción entre el SR4 y el dominio SH3.

A pesar de que este dominio está insertado entre dos hélices del SR5, no establece ningún contacto con él. Por el contrario, el dominio SH3 establece una interacción extensa con el SR4 en la que se ocluyen $\sim 560 \text{ \AA}^2$ de la superficie expuesta al solvente del SH3 y una superficie similar en el SR4 (Figura R19A). Los contactos entre el SR4 y el dominio SH3 son principalmente hidrofóbicos. La superficie de unión al SR4 en el dominio SH3 se centra en la V881, localizada en el lazo β 4/ β 5. La cadena lateral de V881 se inserta en un bolsillo hidrofóbico en la superficie del SR4. Este bolsillo hidrofóbico está formado por los residuos V667, W671, W733, L737, C740 y H740, que se localizan en el lazo A/B y en la α -hélice C. Además, la región N-terminal del lazo β 1/ β 2, conocido como lazo RT, también contacta con el SR4.

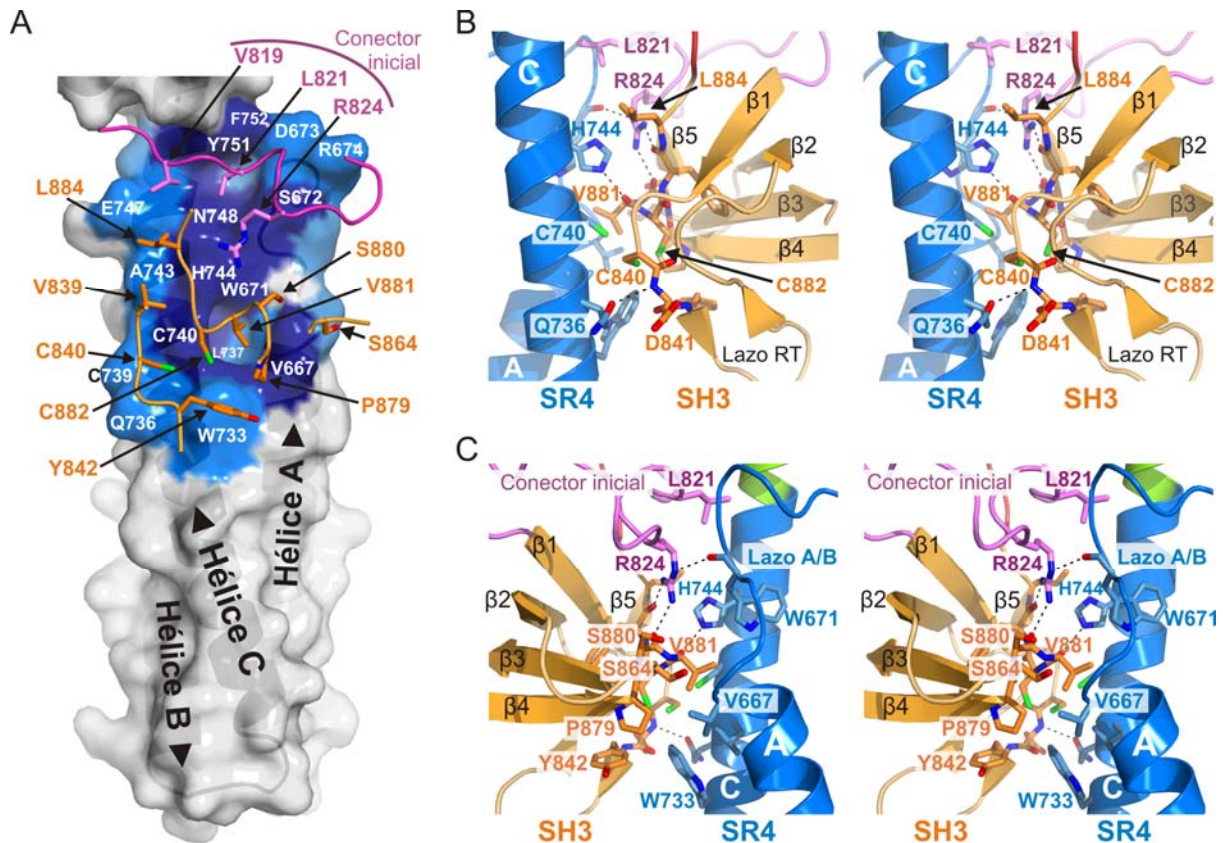


Figura R19.- Interacción intra-molecular entre el SR4 y el dominio SH3 de plectina.- (A) Huella del dominio SH3 y del *conector inicial* en la superficie del SR4. Se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos del *conector inicial* (violeta) y del dominio SH3 (naranja) que contactan con el SR4. Los aminoácidos del SR4 que participan en la interacción están rotulados sobre la superficie y están coloreados según la fracción de su superficie expuesta al solvente que queda ocluida por esta interacción, calculado con el servidor PISA (Krissinel & Henrick, 2007). En azul oscuro están coloreados los aminoácidos que se encuentran mayoritariamente ocluidos (más del 70% del área ocluida) y en azul claro los aminoácidos que están parcialmente ocluidos (entre el 20-30%). (B y C) Representación de dos vistas estereoscópicas de los contactos intra-moleculares entre el SR4 (azul), el dominio SH3 (naranja) y el *conector inicial* (violeta). Estas dos vistas están relacionadas por una rotación de 180° alrededor de un eje vertical.

La interacción SR4-SH3 está estabilizada por el *conector inicial* (aminoácidos 817-833) que se inserta entre el SR4 y el SH3 y actúa como una cuña. La cadena lateral de L821 encaja en un bolsillo hidrofóbico del SR4, mientras que la R824 queda enterrada entre el SR4 y el SH3 y posiblemente forma puentes de hidrógeno con residuos de ambos dominios (Figura R19B-C).

Por otro lado, el *conector final* no interacciona directamente con el SR4, únicamente lo hace con el dominio SH3 y con el extremo N-terminal del *conector inicial*. Este conector consiste en tres Pro consecutivas (⁸⁸⁶PPP⁸⁸⁸), lo cual sugiere que aporta un anclaje relativamente rígido del extremo C-terminal del dominio SH3 al SR5. Por lo

tanto, es posible que el *conector final* favorezca la interacción entre el SR4 y el SH3 limitando la libertad conformacional del dominio SH3.

La superficie de interacción SR4-SH3 ocluye un grupo de Cys próximas entre sí; C740 en el SR4, C840 y C882 en el SH3. C739 se encuentra próxima a las otras tres Cys, si bien no se ve ocluida por la interacción SR4-SH3. El análisis de un mapa de diferencia anómala calculado empleando las fases derivadas de SIRAS, reveló cuatro picos independientes que se asignaron a los átomos de azufre de estas Cys (Figura R20). Las distancias entre los picos en el mapa de diferencia anómala, son mayores que la distancia esperada entre azufres en puentes disulfuro. Para comprobar el estado de oxidación de las Cys del fragmento SR4-SR5 (7 Cys) los grupos tiol se titularon con DNTB en ausencia de agentes reductores. Se detectaron 7.0 ± 0.1 grupos sulfhidrilo libres por molécula, lo que indica que todas las Cys de la proteína están reducidas. En base a los datos cristalográficos y bioquímicos, C739, C740, C840 y C882 se modelaron en la estructura en estado reducido.

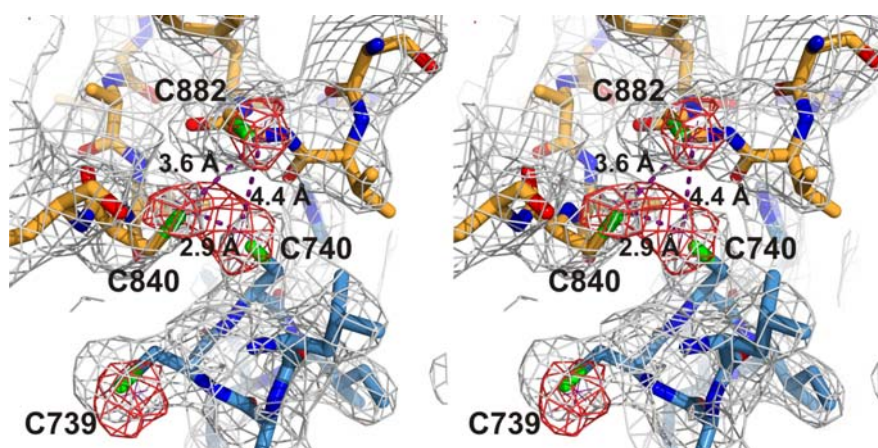


Figura R20.- Estructura la región rica en Cys en la interfase entre el SR4 y el dominio SH3.- Representación estereográfica de la región alrededor de C739, C740, C840 y C882. Los residuos del SR4 están coloreados en azul y los del dominio SH3 en naranja. Se muestra un mapa de diferencia anómala nativa contorneado a 3.5σ (en rojo). Los máximos de densidad correspondientes a los átomos de azufre de C740, C840 y C882 están conectados por líneas discontinuas sobre las que se indican las distancias entre ellos. Se muestra también un mapa $2mF_{obs}-DF_{calc}$ que se contorneó a 1σ (gris) calculado promediando múltiples modelos “agitados” (*averaged kicked*) en las últimas etapas de refinado.

2.2.4.- Conservación de la interfase entre el SR4 y SH3 en la familia plakina.

Los aminoácidos del SR4, del dominio SH3 y de los *conectores* que participan en la interacción entre el SR4 y el SH3 en plectina, están conservados en otras plakinas (Figura R21). Esto sugiere que la organización del SR4 y el SH3 observada en plectina está probablemente conservada en toda la familia de las plakinas.

De forma similar a las plakinas, las α -espectrinas también contienen un dominio SH3 insertado en el lazo B/C del SR9 (Pascual et al, 1997a). Sin embargo, las α -espectrinas muestran diferencias significativas con las plakinas en los residuos implicados en la interacción SR4-SH3 en plectina. Las posiciones en el SR8 de α -espectrina que son equivalentes a los residuos que forman la superficie de interacción hidrofóbica en el SR4 de plectina, están ocupadas por residuos polares.

En el dominio SH3, las posiciones equivalentes a C840 y C882 de plectina (que contactan con el SR4) están ocupadas por Tyr en α -espectrinas. Las secuencias del *conector inicial* y *final* en α -espectrinas no muestran similitudes con los correspondientes en plakinas. En resumen, todos los elementos estructurales que participan en la interacción SR4-SH3 en plakinas son diferentes en α -espectrinas, lo cuál sugiere que en estas últimas la disposición del SH3 es diferente a la observada en la estructura de plectina.

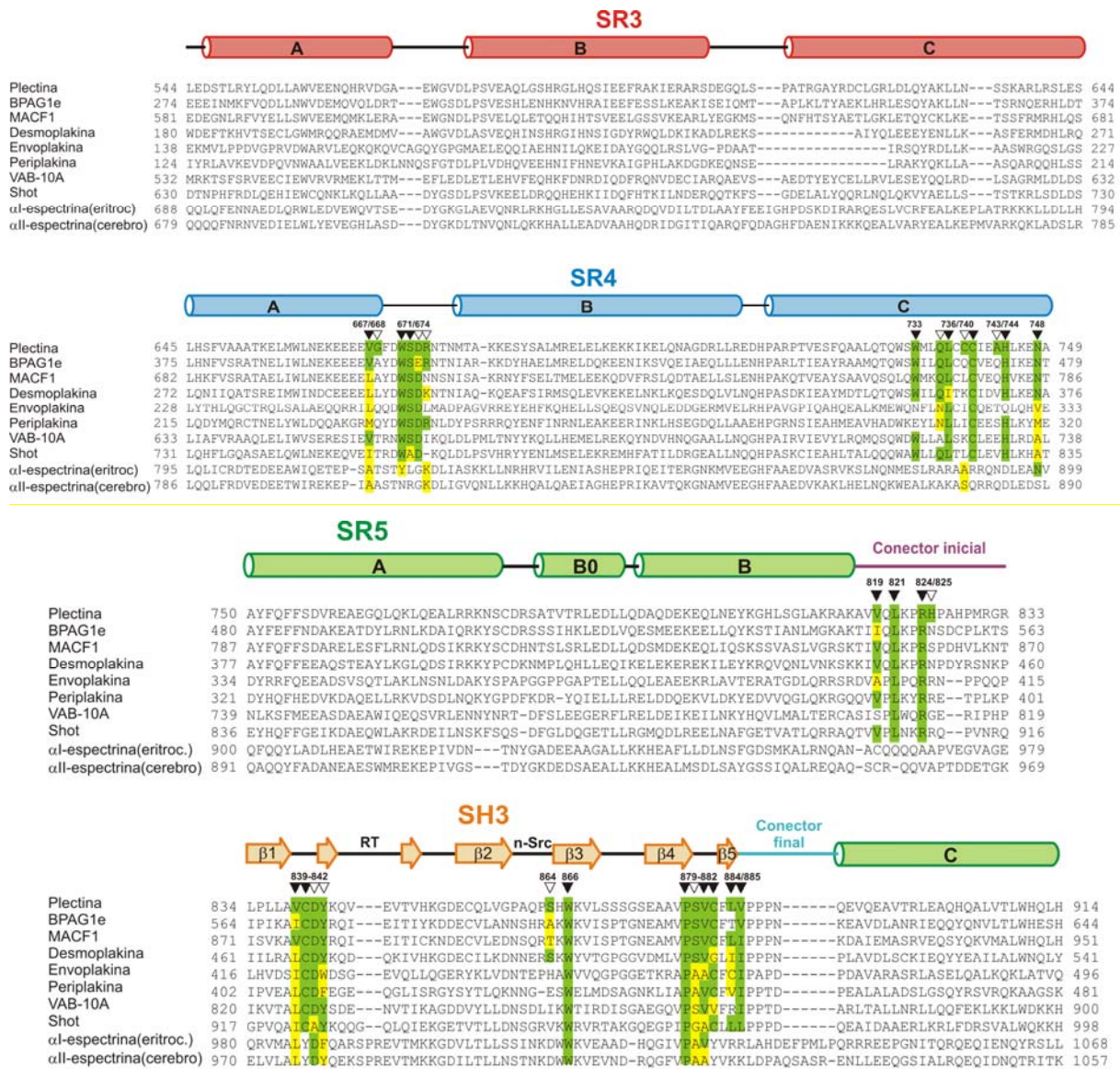


Figura R21.- Alineamiento múltiple de secuencias.- La secuencia de la región SR3-SR5 de plectina humana (Uniprot Q15149-2) se alineó con las secuencias de la región equivalente de las plakinas humanas BPAG1e (Q03001-3), MACF1 (Q9UPN3-2), desmoplakina (P15924), envoplakina (Q92817), periplakina (O60437), la plakina VAB-10A de *Caenorhabditis elegans* (Q86NF8), la plakina Shot de *Drosophila melanogaster* (A1Z9J1) y la región SR7-SR8-SR9-SH3 de αI-espectrina (eritrocito, P02549) y αII-espectrina (cerebro, Q13813). Los elementos de estructura secundaria de la estructura de plectina están representados sobre la secuencia. Los aminoácidos que participan en los contactos entre el SR4, el conector inicial y el dominio SH3 están indicados por triángulos invertidos. Los símbolos rellenos y vacíos corresponden a los residuos del núcleo y de la periferia de la interacción, respectivamente. Los aminoácidos idénticos a los de la superficie de interacción de plectina están indicados por cajas verdes, mientras que las sustituciones por contactos similares a los observados en plectina, se muestran en cajas amarillas.

2.2.5.- Estructura del pseudo-sitio de unión a ligando del dominio SH3 de plectina.

Los dominios SH3 están implicados frecuentemente en interacciones proteína-proteína. La mayoría de estos dominios reconocen y se unen a ligandos con secuencias ricas en Pro que contienen el motivo xPxxP (donde x puede ser cualquier aminoácido) que adopta una conformación de hélice de poli-Pro de tipo II (PPII) (Kaneko et al, 2008; Musacchio, 2002; Zarrinpar et al, 2003). En los SH3 canónicos, el sitio de unión a poli-Pro se localiza entre el lazo RT (que une las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$) y el lazo n-Src (que une las hebras $\beta 2$ y $\beta 3$). El sitio de unión tiene dos cavidades paralelas entre sí, denominadas bolsillos *XP*, cada uno de los cuales reconoce a un dipéptido *XP* del ligando. Estos bolsillos están formados por aminoácidos aromáticos conservados en el lazo RT, la hebra $\beta 4$ y en el lazo $\beta 4/\beta 5$. Adyacente a uno de los *bolsillos XP*, los lazos RT y n-Src forman el bolsillo de *especificidad* que reconoce a un aminoácido básico que precede o sigue al motivo xPxxP del ligando y que determina la orientación con la que el ligando se une al dominio SH3 (Feng et al, 1994; Lim & Richards, 1994; Lim et al, 1994). (Figura R22A,B).

El dominio SH3 de plectina muestra diferencias significativas en el sitio de unión a ligando, en comparación con los dominios SH3 canónicos. Por un lado, tres residuos aromáticos conservados que forman los bolsillos *XP* están sustituidos en plectina por aminoácidos con cadenas laterales más cortas: C840, H865 y C882 (Figura R22C). La presencia de estos residuos no-aromáticos, C840, H865 y C882, crea en plectina una superficie relativamente plana en lugar de los dos bolsillos *XP* (Figura R22D). Además, el lazo RT de plectina tiene tres residuos menos que el de dominios SH3 canónicos y en consecuencia el bolsillo de *especificidad* de plectina es más ancho que el de otros dominios SH3. En resumen, las diferencias del dominio SH3 con respecto a los dominios canónicos sugieren que plectina no une ligandos con secuencias ricas en Pro.

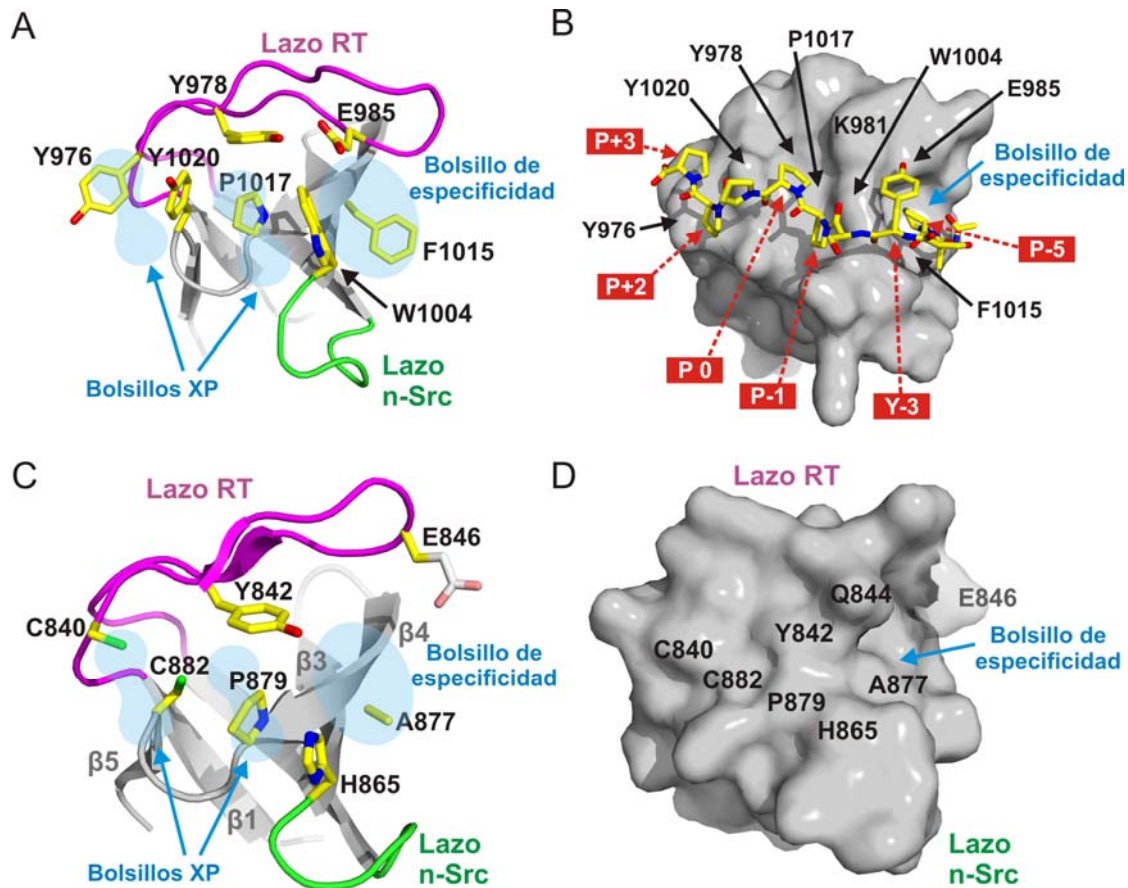


Figura R22.- Estructura del posible sitio de unión del SH3 de plectina.- (A) Representación en lazos de la estructura cristalográfica del dominio SH3 de la α -espectrina de pollo (código PDB: 1SHG) (Musacchio et al, 1992), el cuál es un arquetípico dominio SH3. Se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos importantes que forman los bolsillos de unión. Los bolsillos XP y el bolsillo de *especificidad* se muestran como áreas azules. La numeración se corresponde con la secuencia del dominio SH3 de la α II-espectrina humana, la cual es idéntica a la de la estructura mostrada. (B) Superficie de la estructura por RMN del dominio SH3 del mutante R21A de α -espectrina (R984A en la α II-espectrina humana) en complejo con el péptido modelo p41 (APSYSPPPPP) representado sobre éste (código PDB: 2JMA) (Casares et al, 2007). Los aminoácidos del SH3 están rotulados en negro. Los aminoácidos claves del ligando están rotulados en cajas rojas. El péptido p41 se une en una orientación de tipo I. (C) Representación en lazos de la estructura cristalográfica del dominio SH3 de plectina, en el cuál se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos que ocupan las posiciones equivalentes de aquellos que forman los bolsillos de unión en los dominios SH3 canónicos. La cadena lateral de E846 no se pudo modelar a partir del C α debido a la falta de densidad electrónica definida; aquí se muestra una conformación arbitraria favorable. Se utilizó la misma orientación del panel A al panel D. (D) Representación de la superficie del dominio SH3 de plectina. C840, C882, Y842, P879 y H865 forman una superficie relativamente plana.

Las diferencias del pseudo-sitio de unión de plectina con respecto a dominios SH3 canónicos se observan también en otros miembros de la familia plakina (Figura R23). C840 y C882 están altamente conservadas en otras plakinas. Por otro lado, H865 y A877, que contribuirían al bolsillo de *especificidad*, están poco conservadas en otras plakinas. La posición de H865 se encuentra ocupada mayoritariamente por

Lys en otras plakinas, mientras que en la posición de A877 hay una mayor variabilidad. En resumen, estos datos sugieren que ninguna plakina reconoce ligandos ricos en Pro, o al menos no lo hace de una forma canónica. Sin embargo, las secuencias de dominios SH3 de α -espectrinas (I y II) presentan residuos aromáticos en las posiciones que forman el sitio de unión a ligando ricos en Pro.

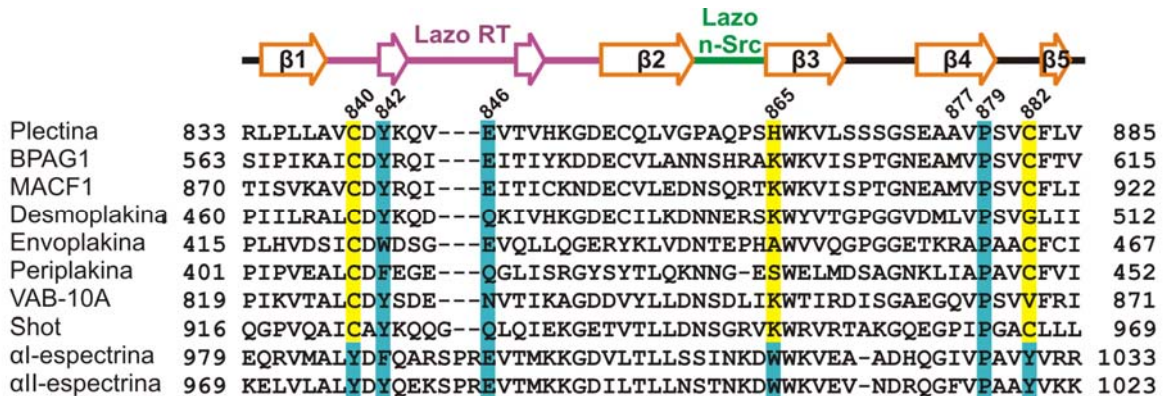


Figura R23.-Alineamiento múltiple de las secuencias de dominios SH3 de plakinas y α -espectrinas.- La secuencia del SH3 de la plectina humana (Uniprot Q15149-2) se alineó con la de otras plakinas humanas: BPAG1e (Q03001-3), MACF1 (Q9UPN3-2), desmoplakina (P15924), envoplakina (Q92817), periplakina (O60437), las plakinas de invertebrados: VAB-10A de *Caenorhabditis elegans* (Q86NF8) y Shot de *Drosophila melanogaster* (A1Z9J1); y dos α -espectrinas humanas: α I-espectrina (eritrocito, P02549) y α II-espectrina (cerebro, Q13813). Los elementos de estructura secundaria de la estructura del SH3 están representados sobre el alineamiento. Los residuos conservados que forman parte de los bolsillos de unión en α -espectrinas están sombreados en azul, mientras que los residuos de plakinas que posiblemente no se unen a un ligando de una manera canónica están sombreados en amarillo.

Por último, el pseudo-sitio de unión a ligando de plectina está parcialmente ocluido debido a la interacción intra-molecular entre el SR4 y el SH3 (Figura R24), lo que impide su participación en la interacción con ligandos potenciales. Los residuos C840, Y842, P879 y C882 contribuyen a la superficie de interacción con el SR4 (ver antes). Esto sugiere que en plectina y otras plakinas, el área correspondiente a los bolsillos *XP* ha evolucionado para participar en una interacción intra-molecular con el SR4, en lugar de interactuar con ligandos de poli-Pro. Por otro lado, el bolsillo de *especificidad* está accesible en la superficie de la molécula.

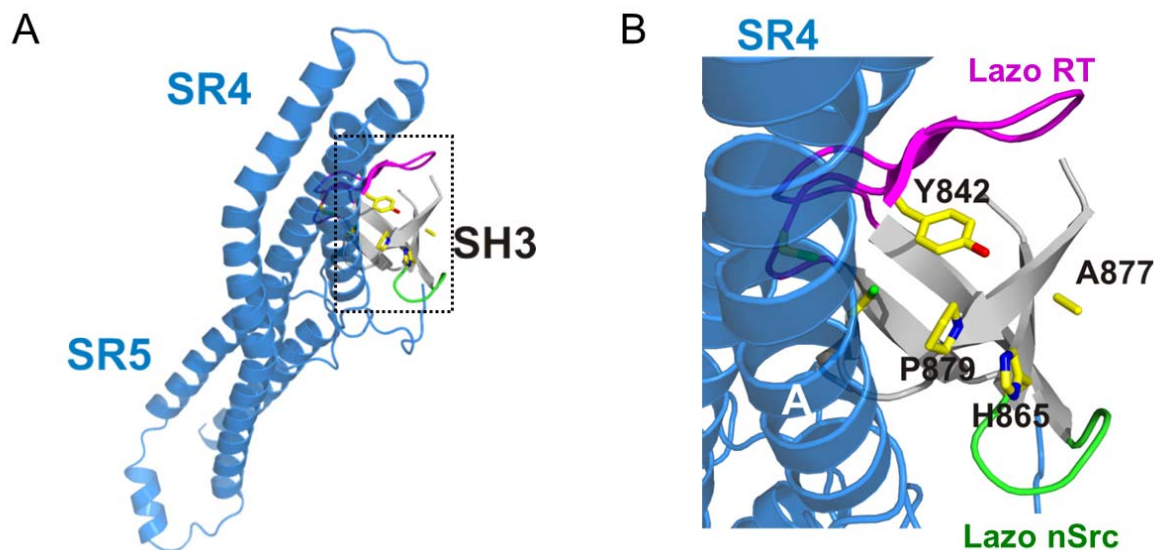


Figura R24.- Oclusión del pseudo-sitio de unión del dominio SH3 de plectina en la interacción con el SR4.-(A) Estructura del dominio SH3 en el contexto de la estructura del fragmento SR4-SR5. El SH3 se muestra en la misma orientación que en la figura 17. (B) Vista detallada de la oclusión parcial del pseudo-sitio de unión del dominio SH3 por el SR4.

2.3.- Estructura cristalográfica de la región SR5-SR6- Δ SH3.

La estructura de la región SR5-SR6 del dominio plakina se ha resuelto empleando dos fragmentos similares. En la construcción SR5-SR6- Δ SH3-A la región correspondiente al dominio SH3 se ha sustituido por la secuencia GSGSG, mientras que en la construcción SR5-SR6- Δ SH3-B el SH3 se ha sustituido por el tripéptido GSG. En las dos construcciones la F752 se sustituyó por Ala. En la estructura del SR4-SR5 el anillo aromático de F752 está ocluido por el lazo A/B del SR4. Mediante la mutación F752A se ha reducido el carácter hidrofóbico de esta superficie, ahora expuesta al solvente en las construcciones SR5-SR6- Δ SH3.

2.3.1.- Resolución de la estructura del SR5-SR6- Δ SH3-A.

La estructura cristalográfica del fragmento SR5-SR6- Δ SH3-A (750-818-GSGSG-889-1006) se resolvió mediante SIRAS, usando datos de difracción de un cristal nativo y de un cristal derivado con 1 mM del compuesto mercurial EMTS. Los datos de difracción de ambos cristales se tomaron empleando un generador de rayos-x de ánodo rotatorio. El cristal nativo difractó a una resolución máxima de 3.05 Å, mientras que el cristal derivado difractó a 4.8 Å de resolución (Tabla R10). Los

cristales nativos del SR5-SR6- Δ SH3-A pertenecen al grupo espacial H3, con unas dimensiones de la celda unidad $a=b=175.1 \text{ \AA}$ y $c=50.5 \text{ \AA}$.

Según el grupo espacial, las dimensiones de la celda unidad y el peso molecular de este fragmento (22,3kDa), en la unidad asimétrica cabrían 2 o 3 moléculas del SR5-SR6- Δ SH3-A que corresponde con un contenido de solvente de 63% y 44.6 %, y un coeficiente de Matthews (V_M) (Kantardjieff & Rupp, 2003; Matthews, 1968) de 3.32 y $2.21 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, respectivamente.

Para analizar el contenido del cristal y la organización de las moléculas dentro de la unidad asimétrica, se calculó la función de auto-rotación de este fragmento. La sección polar $\kappa = 120^\circ$ mostró un único pico correspondiente al eje ternario de simetría cristalográfica (Figura R25A). En la sección polar $\kappa = 180^\circ$ se observaron 6 picos en $\Phi=0^\circ$ con un espaciado de 60° en Ψ . Estos picos no se corresponden a los ejes de simetría cristalográfica y sugieren la presencia de ejes binarios de simetría no cristalográfica perpendiculares al eje z en el plano x-y (Figura R25B).

Tabla R10.- Estadísticas de los datos de difracción del SR5-SR6- Δ SH3-A.

SR5-SR6-ΔSH3-A (750-818-GSGSG-889-1006)		
Conjunto de datos	Nativo	1 mM EMTS
Grupo espacial	H3	H3
Dimensiones de la celda unidad	$a=b=175.1 \text{ \AA}$ $c=50.6 \text{ \AA}$ $\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$	$a=b=177.5 \text{ \AA}$ $c=50.5 \text{ \AA}$ $\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$
Longitud de onda (\AA)	1.5418	1.5418
Resolución (\AA)	3.05 (3.17-3.05) ^a	4.8 (5.0-4.8) ^a
Reflexiones únicas	10927	5826 ^b
Multiplicidad promedio	4.8 (4.8) ^a	4.4 (4.4) ^a
Compleitud (%)	99.2 (97.9) ^a	99.9 (100.0) ^a
Rmeas^c (%)	9.1 (60.6) ^a	13.0 (38.4) ^a
$\langle I/\sigma \rangle$	18.7 (3.6) ^a	11.3 (4.3) ^a
Riso^d (%)		30.1
Poder de faseado isomórfico / anómalo		1.29 / 0.69
Figura de mérito (FOM)		0.42

^a Los valores entre paréntesis corresponden a los datos de la concha de mayor resolución.

^b Los pares de Bijvoet se mantienen separados.

^c Rmeas es el factor independiente R de multiplicidad descrito por Diederichs y Karplus (Diederichs & Karplus, 1997)

^d $Riso = \frac{\sum |F_{der}| - |F_{nat}|}{\sum |F_{nat}|}$, donde F_{der} es el factor estructural del derivado con el átomo pesado y el F_{nat} es el factor estructural de la proteína nativa.

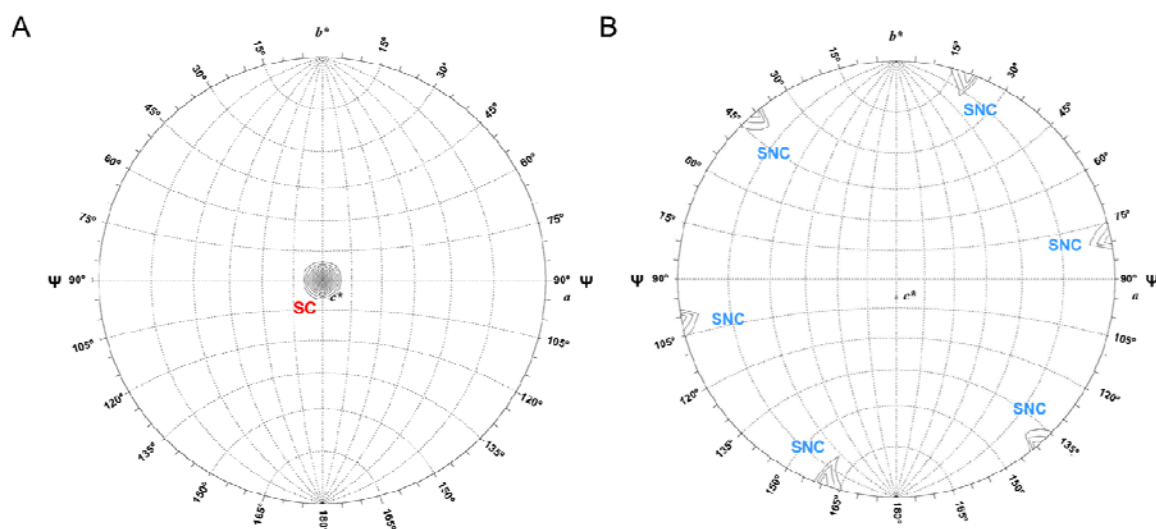


Figura R25.- Función de auto-rotación del fragmento SR5-SR6- Δ SH3-A.-(A) Proyección estereográfica desde el eje c en la sección polar $\kappa = 120^\circ$, en la cual se observa un pico que corresponde al eje ternario de simetría cristalográfica (SC). (B) Proyección estereográfica desde el eje c en la sección polar $\kappa = 180^\circ$. Se observan 6 picos (5.8σ) que corresponden a ejes de simetría no cristalográfica (SNC) en $\Psi=20^\circ, \Phi=0^\circ$; $\Psi=80^\circ, \Phi=0^\circ$ y $\Psi=140^\circ, \Phi=0^\circ$ y las posiciones equivalentes. El gráfico se ha generado con el programa GRLF (Tong & Rossmann, 1997) usando datos en un rango de resolución 15-3.2 Å. El radio de integración fue de 34 Å.

La subestructura formada por 4 átomos de Hg se resolvió utilizando el programa SHELXD (Sheldrick & Schneider, 1997) y la interfaz gráfica HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004). La posición de los átomos de Hg y la distribución de probabilidad de fases se refinó usando el programa autoSHARP (Bricogne et al, 2003). Por último, las fases se mejoraron mediante modificación de la densidad electrónica y se extendieron hasta una resolución de 3.1 Å utilizando el programa SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996). A partir de las fases obtenidas por SIRAS se obtuvo un mapa de densidad electrónica interpretable (Figura R26). Empleando la estructura cristalográfica del fragmento SR4-SR5, se localizaron dos copias del SR5 en el mapa de densidad electrónica experimental, utilizando el programa MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) en la suite CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Seguidamente, se construyó manualmente la hélice A del SR6 como una poli-Ala continuando la hélice C del SR5. Por último, se construyeron manualmente hélices de poli-Ala correspondientes a las hélices B y C del SR6.

La estructura se refinó frente a datos nativos a 3.05 Å de resolución usando el programa PHENIX.REFINE (Afonine et al, 2005). Inicialmente, se refinó de forma independiente la posición del SR5 y de las 3 hélices del SR6 mediante refinado de 8

cuerpos rígidos. En etapas posteriores, se combinó refinado posicional, refinado de valores B individuales y refinado de 4 grupos TLS en cada molécula. Durante el refinado se incluyeron restricciones de simetría no cristalográfica, empleando 4 grupos que se corresponden aproximadamente con: (i) el SR5, la hélice A del SR6 y el lazo B/C del SR6; (ii) el lazo A/B del SR6; (iii) los dos primeros tercios de la hélice B de SR6; y (iv) la hélice C del SR6.

Durante los ciclos de inspección y modificación manual de la estructura, además del mapa obtenido por SIRAS se emplearon mapas $2mF_{obs}-DF_{calc}$ y $mF_{obs}-DF_{calc}$ calculados tanto a partir de los modelos refinados, como promediando múltiples modelos en los que se aplica un desplazamiento aleatorio a las posiciones atómicas (*averaged kick*) (Praaenikar et al, 2009). Además se emplearon mapas afilados en los que se aplicaron valores B negativos para dar mayor peso a los términos de alta resolución, aumentando así los detalles del modelo (DeLaBarre & Brunger, 2006)

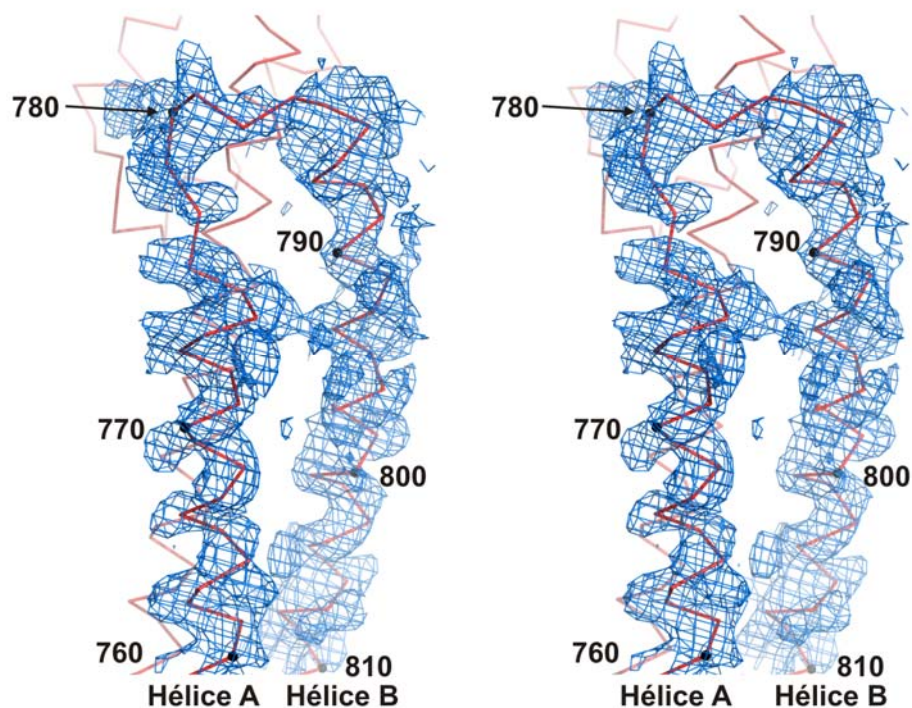


Figura R26.- Mapa de SIRAS de la estructura SR5-SR6- Δ SH3A. Vista estereoscópica de una zona representativa del mapa calculado con las fases derivadas de SIRAS, después de la modificación de densidad con SOLOMON. El mapa está contorneado a 1σ (2.7\AA). Sección correspondiente a las hélices A y B del SR5 representadas como una cadena de $C\alpha$.

En una de las moléculas se observó densidad electrónica que no pertenecía a la cadena polipeptídica y se encontraba rodeada por los grupos carbonilo de S967,

E968, A970 y F973 en el lazo B/C del SR6. En esta densidad se modeló un ión Na⁺ cuyas distancias a los mencionados carbonilos se restringió a 2.38 Å (Harding, 2006). El refinado convergió en un *Rwork* de 20.5% y un *Rfree* de 24.5% (Tabla R11). El modelo final incluye los residuos del 750 al 818 y del 888 al 1000 en la molécula A y del 750 al 818 y del 889 al 996 en la molécula B, a excepción de una región del lazo B/C del SR6 en la molécula B (aminoácidos 972–974), para la cuál no se observa una clara densidad electrónica. Tampoco se modelaron los cinco residuos (GSGSG) que se encuentran en el lazo B/C del SR5 sustituyendo al dominio SH3. Únicamente, en la molécula A se modeló una de las Gly de esta secuencia. La estructura tiene una geometría excelente, con el 99.1% de los ángulos de torsión de la cadena principal están localizados en regiones favorecidas del gráfico de Ramachandran y el 0.9% restante en regiones adicionalmente permitidas. Las dos moléculas de la unidad asimétrica están relacionadas por una rotación de 180° (detectada en el análisis de auto-rotación) y un desplazamiento de ~10 Å a lo largo del eje longitudinal de las moléculas. Este dímero asimétrico no parece tener una relevancia biológica.

Tabla R11.- Estadísticas del refinado del SR5-SR6-ΔSH3-A

SR5-SR6-ΔSH3-A (750-818-GSGSG-889-1006)	
Rango de resolución (Å)	48 – 3.05
Reflexiones únicas, work/free	10400 / 524
R work (%)	20.5
R free^a (%)	24.5
Número de aminoácidos^b	182 / 174
Número de Na⁺	1
Valor B promedio (Å²)	
Wilson plot	56.9
Proteína^b	60.9 / 113.8
Na⁺	72.2
RMSD	
Distancias de enlace (Å)	0.007
Ángulos de enlace (°)	0.966
Aminoácidos en las regiones del diagrama de Ramachandran^c	
Más favorecidas	343 (99.1%)
Adicionalmente permitidas	3 (0.9%)
No permitidas	0 (0.0%)

^a Calculado con el 5% de las reflexiones que no se incluyeron en el refinado.

^b Valores para la moléculas A y B, respectivamente.

^c Calculado con el programa MOLPROBITY (Davis et al, 2007)

2.3.2.- Resolución de la estructura del SR5-SR6- Δ SH3-B.

A partir de un cristal del fragmento SR5-SR6- Δ SH3-B (aminoácidos 750-818-GSG-889-1006) se midió un juego de datos hasta una resolución máxima de 3.1 Å empleando un generador de rayos-x de ánodo rotatorio. El cristal pertenece al grupo espacial C2, con unas dimensiones de la celda unidad de: a=129.4 Å, b=47.8 Å, c=106.8 Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=126.7^\circ$ y $\gamma=90^\circ$ (Tabla R12).

Según las dimensiones de la celda unidad, el grupo espacial y el peso molecular del SR5-SR6- Δ SH3-B (22,4 kDa), lo más probable es que la unidad asimétrica contuviese 2 o 3 moléculas, que corresponde a un contenido de solvente de 60.3% y 40.4%, y un V_M de 3.09 y 2.06 Å³/Da, respectivamente.

Tabla R12.- Estadísticas de los datos de difracción del SR5-SR6- Δ SH3-B

SR5-SR6-ΔSH3-B (750-818-GSG-889-1006)	
Conjunto de datos	Nativo
Grupo espacial	C2
Dimensiones de la celda unidad (Å)	a=129.4 Å b= 47.8 Å c=106.8 Å $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=126.7^\circ$
Longitud de onda	1.5418
Resolución (Å)	3.10 (3.27 - 3.10) ^a
Reflexiones únicas	9587
Multiplicidad promedio	3.9 (4.2) ^a
Compleitud (%)	97.6 (96.8) ^a
Rmeas^b (%)	8.9 (55.7) ^a
<I/σ>	15.7 (3.1) ^a

^a Los valores entre paréntesis corresponden a los datos de la concha de mayor resolución.

^b Rmeas es el factor independiente R de multiplicidad descrito por Diederichs y Karplus (Diederichs & Karplus, 1997)

La estructura de SR5-SR6- Δ SH3-B se resolvió mediante reemplazo molecular empleando la estructura SR5-SR6- Δ SH3-A como modelo de búsqueda. Se localizaron dos copias en la unidad asimétrica. La estructura se refinó frente a datos de difracción a 3.1 Å de resolución. Inicialmente se empleó refinado DEN (*Deformable Elastic Network*) con el programa CNS (Brunger, 2007; Brunger et al, 1998; Schroder et al, 2010). Seguidamente, la estructura se refinó con el programa PHENIX.REFINE (Afonine et al, 2005) de manera similar a como se había refinado la estructura de SR5-SR6- Δ SH3-A. Las principales diferencias fueron el refinado de 6 grupos TLS (3 en cada molécula) y la utilización de 13 grupos para definir las

restricciones de simetría no cristalográfica. El refinado convergió en un *Rwork* de 23.8 % y un *Rfree* de 27.8 % (Tabla R13). El modelo final del SR5-SR6- Δ SH3-B incluye las regiones 747-818 y 889-1000 en la cadena A; y 747-818 y 889-1001 en la cadena B. En el extremo N-terminal de ambas moléculas, se observó densidad electrónica adicional que se modeló como tres residuos (Ser, His y Met) (numerados 747-749) presentes en la proteína de fusión. Además, en ambas moléculas se construyeron los tres aminoácidos (GSG) que sustituyen al dominio SH3 en el lazo B/C del SR5. Este modelo tiene una geometría óptima, el 99.5% de los ángulos de torsión de la cadena principal están localizados en regiones favorecidas del gráfico de Ramachandran y el 0.5% restante está en regiones adicionalmente permitidas.

Tabla R13.- Estadísticas del refinado del SR5-SR6- Δ SH3-B

SR5-SR6-ΔSH3-B (750-818-GSG-889-1006)	
Rango de resolución (Å)	36 - 3.10
Reflexiones únicas, work/free	9123 / 460
R work (%)	23.8
R free^a (%)	27.8
Número de aminoácidos^b	187 / 188
Valor B promedio (Å²)	
Wilson plot	61.7
Proteína^b	71.4 / 86.5
RMSD	
Distancias de enlace (Å)	0.005
Ángulos de enlace (°)	0.759
Aminoácidos en las regiones del diagrama de Ramachandran^c	
Más favorecidas	369 (99.5%)
Adicionalmente permitidas	2 (0.5%)
No permitidas	0

^a Calculado con el 5% de las reflexiones que no se incluyeron en el refinado.

^b Valores para la moléculas A y B, respectivamente.

^c Calculado con el programa MOLPROBITY (Davis et al, 2007)

2.3.3.- Descripción de la estructura SR5-SR6- Δ SH3.

La estructura de la región SR5-SR6- Δ SH3 es similar en ambos fragmentos. Los dos SRs se disponen en tándem uno a continuación del otro, adoptando una estructura con forma alargada con unas dimensiones aproximadas de 85 Å de longitud y ~20-25 Å de diámetro (Figura R27). La unión del SR5 con el SR6 tiene lugar a través de una α -hélice continua C-A, como se ha observado en otros pares de SRs (ver antes).

Las hélices A y B del SR5 y las hélices B y C del SR6 se sitúan en lados opuestos del eje longitudinal de la molécula. En la zona de unión SR5/SR6, el lazo A/B del SR5 se aproxima al lazo B/C del SR6 (Figura R28A). La cadena lateral de R780 en el SR5 podría llegar a establecer un puente de hidrógeno con el carbonilo de G972 en el lazo B/C del SR6.

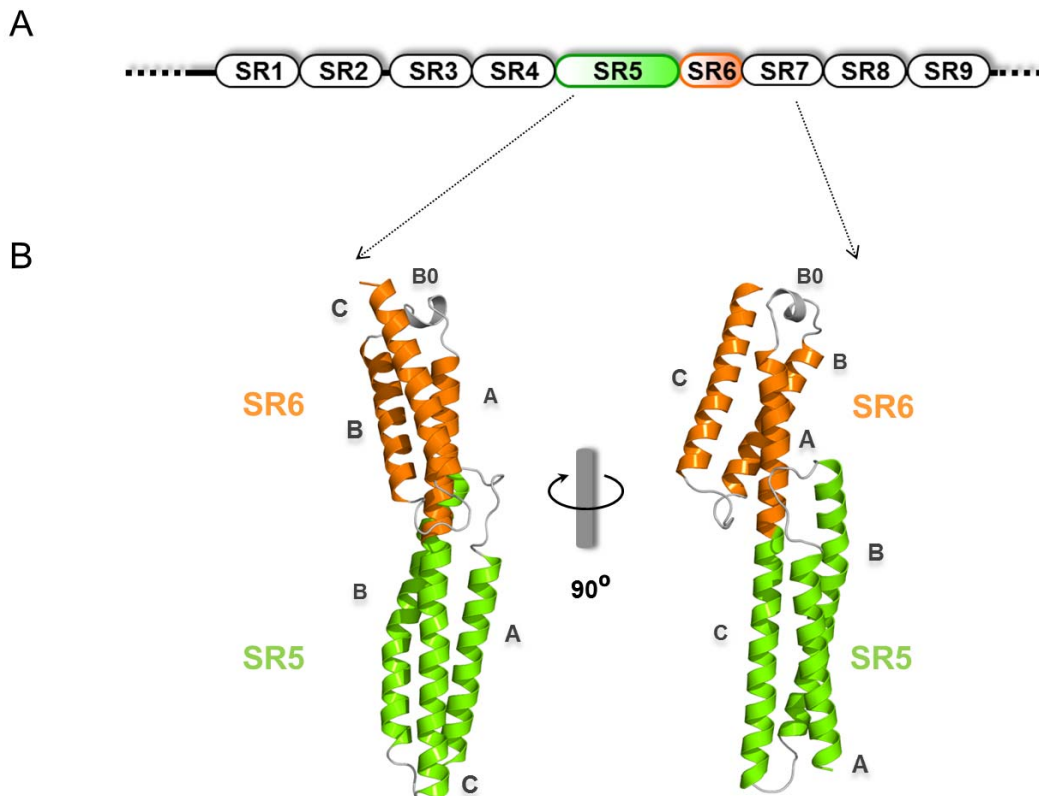


Figura R27.- Estructura cristalográfica de la región SR5-SR6- Δ SH3-A del dominio plakina de plectina.- (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina, la región estudiada se corresponde con los sub-dominios SR5 (verde) y SR6 (naranja). (B) Dos vistas ortogonales de la representación en lazos de la estructura cristalográfica de la región SR5-SR6- Δ SH3-A.

Cada SR individual tiene la estructura prototípica de estos sub-dominios, constituida por 3 α -hélices que forman un haz con giro levógiro. La estructura del SR5 en los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3-A y B es en general similar a la observada en el fragmento SR4-SR5. La eliminación del dominio SH3 en los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3-A y B no altera la estructura del SR5. Sin embargo, se observan diferencias significativas en zonas del SR5 adyacentes al SR6. La hélice B0 que se había observado en el fragmento SR4-SR5 se encuentra integrada dentro de la hélice B en

las construcciones SR5-SR6- Δ SH3. En consecuencia también existen variaciones significativas en el lazo A/B del SR5 que resultan en diferencias de hasta ~ 4 Å en la posición de los C α entre ambas estructuras (Figura R28B). Estas diferencias se deben a la presencia o ausencia del SR6, por lo tanto la conformación de esta región del SR5 en la plectina íntegra está mejor representada por la estructura de los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3.

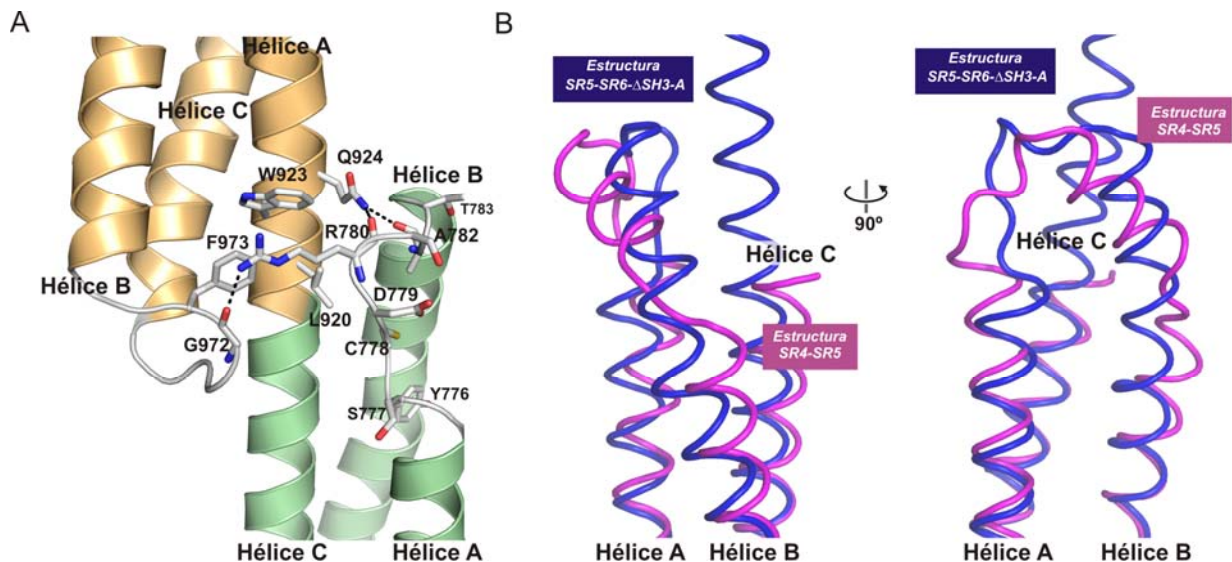


Figura R28.- Estructura de la región en torno al lazo A/B del SR5 en el fragmento SR5-SR6- Δ SH3 (A) Vista detallada del SR5 (verde) y SR6 (dorado) alrededor del lazo A/B del SR5 y del lazo B/C del SR6 en la estructura SR5-SR6- Δ SH3-A. Es posible que el grupo carboxamino de Q924 en el SR6 establezca puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo de R780 o A782 en el SR5. (B) Comparación del lazo A/B en la estructura SR4-SR5 (rosa) y en la estructura SR5-SR6- Δ SH3-A (azul). Se muestran dos vistas ortogonales. La conformación de esta región en la estructura SR5-SR6- Δ SH3-B es similar a la mostrada para SR5-SR6- Δ SH3-A.

El SR6 es de menor tamaño que los otros SRs. Las hélices del SR6 son aproximadamente una o dos vueltas de hélice más cortas que en otros SRs de plectina. Destaca la presencia de una hélice corta, denominada B0 (aminoácidos 938-944), en el lazo A/B, que está orientada de forma aproximadamente perpendicular al eje longitudinal del haz formado por las hélices A-B-C (Figura R27B). La hélice B0 del SR6 recuerda a la hélice B0 observada en el SR5 en la estructura SR4-SR5. Sin embargo en el SR6 la hélice B0 no sobrepasa el extremo de la hélice C. Por lo tanto es razonable que su entorno estructural sea similar en la molécula de plectina completa.

2.3.4.- Comparación de las dos estructuras de la región SR5-SR6- Δ SH3.

La estructura de cada SR individual es muy similar en las cuatro moléculas de los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3-A y B (dos moléculas en la unidad asimétrica de cada cristal). Tras superponer por pares las cuatro estructuras del SR5, la rmsd en la posición de todos los C α oscila entre 0.02 y 0.62 Å (Tabla R14, Figura R29A). De forma similar, la comparación por pares de las 4 estructuras del SR6 da una rmsd entre 0.46 y 0.75 Å (Figura R29B).

Tabla R14. Comparación de las estructuras del SR5 y SR6 en los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3-A y B. se muestran los valores de la rmsd en la posición de los C α tras la superposición por parejas de los SRs.

		SR5				SR6			
		SR5-SR6- Δ SH3-A		SR5-SR6- Δ SH3-B		SR5-SR6- Δ SH3-A		SR5-SR6- Δ SH3-B	
		mol A	mol B	mol A	mol B	mol A	mol B	mol A	mol B
SR5-SR6-ΔSH3-A	mol A	-	0.02 Å ^a	0.54 Å	0.49 Å	-	0.75 Å ^c	0.57 Å	0.61 Å
SR5-SR6-ΔSH3-A	mol B	-	-	0.53 Å	0.44 Å	-	-	0.57 Å	0.84 Å
SR5-SR6-ΔSH3-B	mol A	-	-	-	0.62 Å ^b	-	-	-	0.45 Å ^d

Los superíndices (a,b,c y d) indican que las dos moléculas que se comparan se han refinado conjuntamente empleando restricciones de simetría no cristalográfica (SNC) entre ellas. El número de grupos SNC empleados dentro de cada SR ha sido: Uno, seis, tres y siete grupos de SNC, correspondiente a los superíndices a,b,c y d respectivamente.

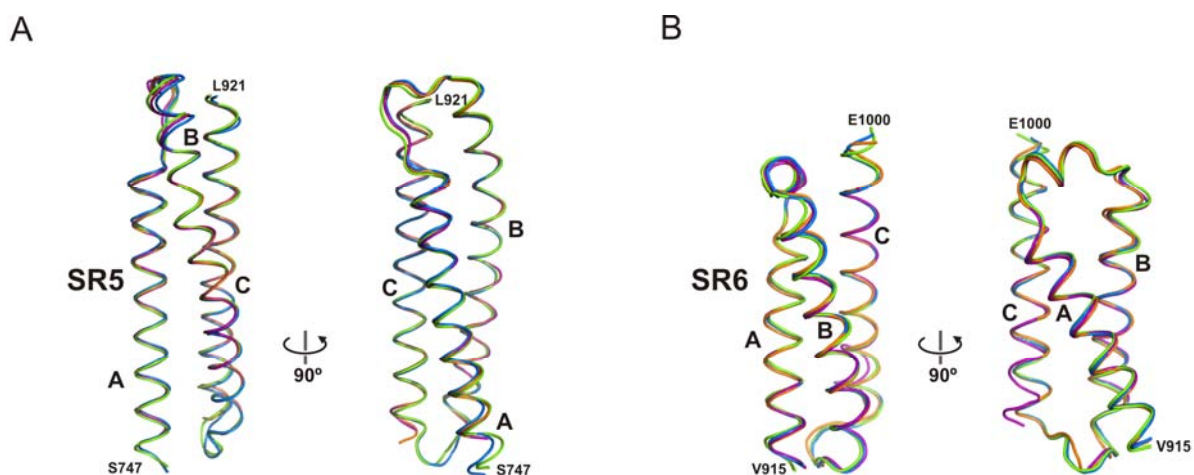


Figura R29.- Comparación de las estructuras del SR5 y el SR6 en los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3-A y SR5-SR6- Δ SH3-B.- (A) Dos vistas ortogonales de la superposición de las estructuras del SR5 en las dos moléculas de la unidad asimétrica de los cristales del fragmento SR5-SR6- Δ SH3-A (naranja y morado) y las dos moléculas de SR5-SR6- Δ SH3-B (azul y verde). (B) Dos vistas ortogonales de la superposición de las estructuras del SR6 en las dos moléculas de SR5-SR6- Δ SH3-A (naranja y morado) y las dos moléculas de SR5-SR6- Δ SH3-B (azul y verde). El primer y último aminoácido de cada estructura está rotulado en ambos paneles.

Cuando se superponen los SR5 en las cuatro estructuras de la región SR5-SR6- Δ SH3 se observan diferencias significativas en la orientación de la posición del SR6 respecto al SR5 (Figura R30A). Las mayores diferencias se observan entre las dos moléculas de la estructura SR5-SR6- Δ SH3-B, que representan dos conformaciones extremas. En cambio, las diferencias entre las dos moléculas de SR5-SR6- Δ SH3-A son menores y muestran conformaciones intermedias respecto a las moléculas de SR5-SR6- Δ SH3-B. Tras superponer el SR5 en las dos moléculas de SR5-SR6- Δ SH3-B se observa una diferencia de ~ 10 Å en la posición de los C α de la hélice B0 y del extremo C-terminal del SR6. Estas dos conformaciones están relacionadas por un movimiento de bisagra en el cuál el SR6 gira como un cuerpo rígido $\sim 17^\circ$ respecto al SR5 entre ambas estructuras. Los residuos que se localizan en la zona de unión SR5/SR6 actúan como una bisagra en el movimiento. Además, este movimiento de cierre de la molécula está acompañado por un desplazamiento del lazo A/B del SR5 (Figura R30B). Estos resultados sugieren que la región de unión SR5/SR6 es una zona preferencial de variabilidad conformacional que permite una moderada pero significativa flexibilidad.

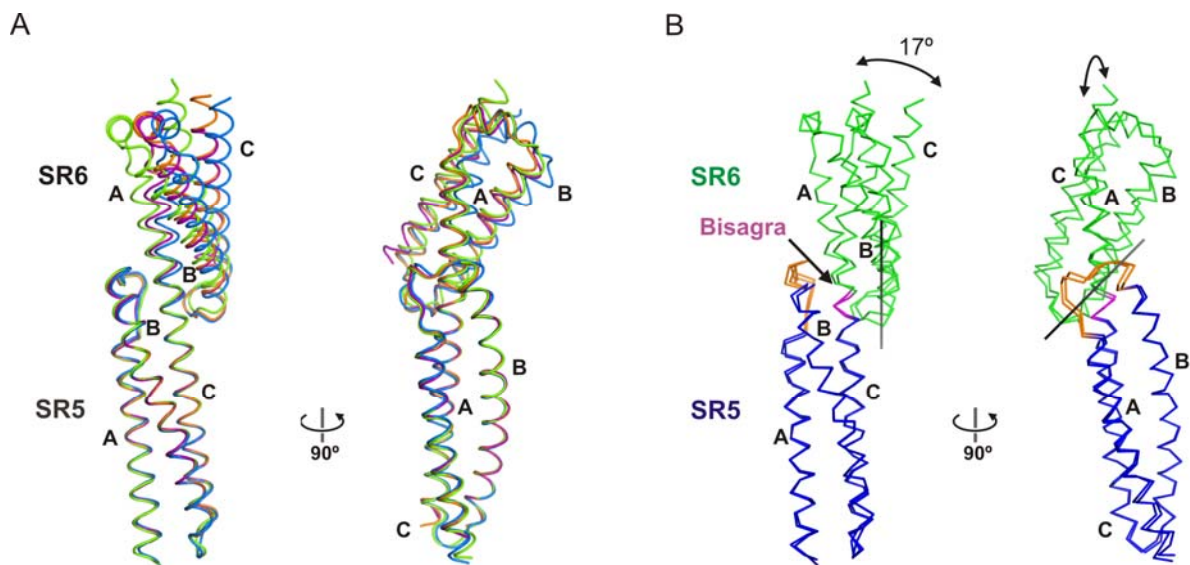


Figura R30.- Identificación del movimiento de bisagra entre el SR5 y el SR6 por comparación de la estructura de las dos moléculas de la unidad asimétrica de SR5-SR6- Δ SH3-B.-(A) Dos vistas ortogonales de las dos moléculas de la estructura SR5-SR6- Δ SH3-A (naranja y morado) y las dos moléculas de SR5-SR6- Δ SH3-B (azul y verde), tras superponer los SR5. (B) Identificación de movimientos de dominios por comparación de la estructura de las dos moléculas del SR5-SR6- Δ SH3-B. Las estructuras están coloreadas según los dominios que se mueven, identificados con el programa DynDom (Hayward & Berendsen, 1998) que corresponden al SR5 (azul) y SR6 (verde). Los residuos que actúan como bisagra (morado) se localizan en la unión SR5/SR6. Los aminoácidos del lazo A/B (naranja) acompañan el movimiento del SR6. El eje de rotación del movimiento de bisagra se muestra como una línea negra y las flechas indican la dirección del movimiento.

2.4.- Estructura cristalográfica del SR7-SR8.

2.4.1.- Difracción de los cristales de SR7-SR8 y resolución de la estructura.

La estructura cristalográfica del fragmento SR7-SR8 (aminoácidos 1004-1233) se resolvió mediante SIRAS, usando datos de difracción de un cristal nativo y de un cristal derivado con 1 mM del compuesto mercurial EMTS. Se obtuvo un conjunto de datos de difracción del cristal nativo a una resolución máxima de 2.05 Å y datos del cristal derivado a 2.5 Å, utilizando en ambos casos un generador de rayos-x de ánodo rotatorio. Los cristales nativos pertenecen al grupo espacial $P2_1$ siendo las dimensiones de la celda unidad: $a=45.9$ Å, $b=115.4$ Å, $c=64.5$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=97.7^\circ$ $\gamma=90^\circ$ (Tabla R15). El cristal derivado es isomorfo con el cristal nativo.

Tabla R15.-Estadísticas de los datos de difracción del SR7-SR8.

SR7-SR8 (1004-1233)		
Conjunto de datos	Nativo	1 mM EMTS
Grupo espacial	$P2_1$	$P2_1$
Dimensiones de la celda unidad (Å)	$a=45.9$ Å $b=115.4$ Å $c=64.5$ Å $\alpha=90^\circ$ $\beta=97.7^\circ$ $\gamma=90^\circ$	$a=45.1$ Å $b=115.9$ Å $c=64.4$ Å $\alpha=90^\circ$ $\beta=97.4^\circ$ $\gamma=90^\circ$
Longitud de onda (Å)	1.5418	1.5418
Resolución (Å)	2.05 (2.15-2.05) ^a	2.5 (2.6-2.5) ^a
Reflexiones únicas	40717	42703 ^b
Multiplicidad promedio	7.5 (7.3) ^a	3.8 (3.9) ^a
Complejidad (%)	97.6 (99.4) ^a	95.5 (94.3) ^a
Rmeas ^c (%)	6.1 (53.2) ^a	7.8 (46.1) ^a
$\langle I/\sigma \rangle$	23.1 (6.1) ^a	13.7 (4.2) ^a
Riso ^d (%)		37.3
Poder de faseado iso cent / iso acent / anom		1.04 / 0.83 / 0.86
Figura de mérito (FOM) acéntricas / céntricas		0.36 / 0.29

^a Los valores entre paréntesis corresponden a los datos de la concha de mayor resolución.

^b Los pares de Bijvoet se mantienen separados.

^c Rmeas es el factor independiente R de multiplicidad descrito por Diederichs y Karplus (Diederichs & Karplus, 1997)

^d $Riso = \frac{\sum |F_{der}| - |F_{nat}|}{\sum |F_{nat}|}$, donde F_{der} es el factor estructural del derivado con el átomo pesado y el F_{nat} es el factor estructural de la proteína nativa.

Según el grupo espacial, las dimensiones de la celda unidad y el peso molecular de esta proteína (26.4kDa), era probable que la unidad asimétrica incluyese 2 o 3 moléculas de SR7-SR8, que corresponde a un contenido en solvente de 62% y 43% y un coeficiente de Matthews de 3.24 Å³/Da y 2.16 Å³/Da, respectivamente. Dentro de la caracterización cristalográfica inicial, se calculó la función de auto-rotación a partir de los datos del cristal nativo (Figura 25). Únicamente la sección polar $\kappa = 180^\circ$

mostró dos picos significativos en $\phi=10^\circ$ $\psi=90^\circ$ y $\phi=100^\circ$ $\psi=90^\circ$ que difieren de los que corresponden a la simetría cristalográfica. Estos picos sugieren la presencia de un eje binario de simetría no cristalográfica (SNC) perpendicular al eje y, que al ser perpendicular al eje binario cristalográfico resulta en dos picos (picos de Klug).

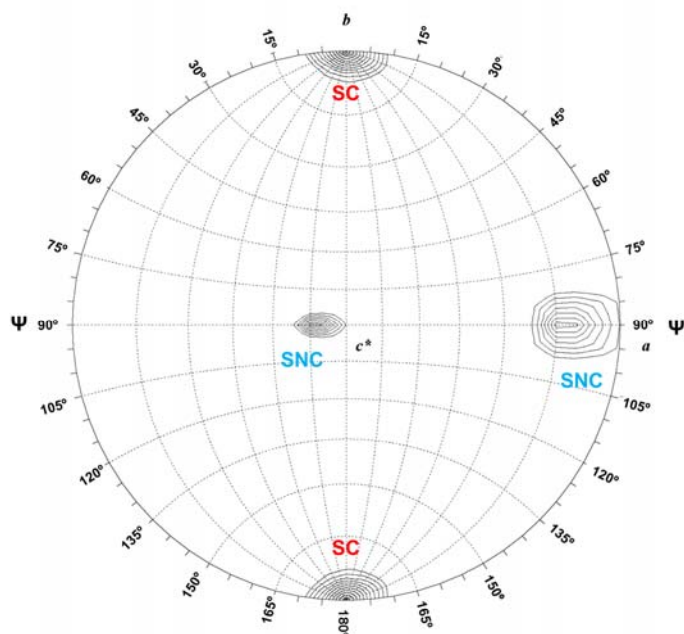


Figura R31.- Función de auto-rotación del fragmento SR7-SR8.- Proyección estereográfica de la sección polar $\kappa = 180^\circ$ de la función de auto-rotación. El gráfico se generó con el programa GRLF (Tong & Rossmann, 1997) usando datos en un rango de resolución 10 - 3.5 Å y un radio de integración de 25 Å. Se observan 2 picos que corresponden a ejes de simetría no cristalográfica (SNC) en $\Psi=90^\circ$, $\Phi=10^\circ$; $\Psi=90^\circ$, $\Phi=100^\circ$. Los picos pertenecientes a la simetría cristalográfica se indican como SC.

La subestructura de átomos de Hg se resolvió inicialmente utilizando los programas SHELXC/D/E (Schneider & Sheldrick, 2002) y la interfaz gráfica HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004). A continuación, los 5 átomos de Hg con mayor ocupación se refinaron con el programa autoSHARP (Bricogne et al, 2003), que además permitió la identificación de otros 7 átomos de Hg. Por último, las distribuciones de probabilidad de sus fases se mejoraron y se extendieron hasta el límite de resolución de los datos nativos (2.05 Å) mediante modificación de densidad con el programa SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996). Las fases así obtenidas permitieron calcular un mapa de densidad electrónica interpretable (Figura R32). A partir de este mapa se construyó automáticamente un modelo atómico inicial que cubría

aproximadamente el 76 % del trazado final de la proteína (352 residuos) utilizando el programa ARP/wARP (Perrakis et al, 1999).

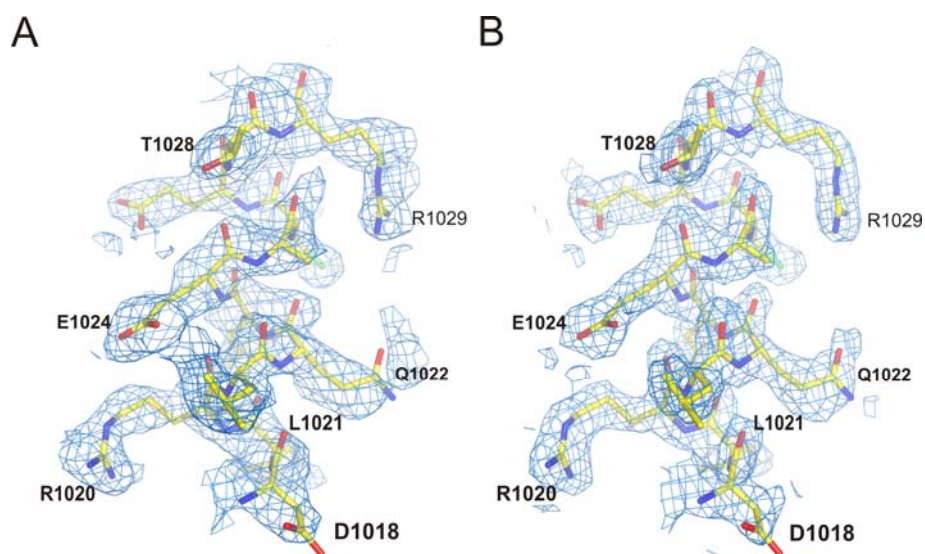


Figura R32.- Mapa de SIRAS de la estructura SR7-SR8.- (A) Vista de una sección correspondiente a la hélice A del SR7 del mapa calculado con las fases derivadas de SIRAS, después de la modificación de densidad. El mapa está contorneado a 1σ . (B) Vista de la misma sección de la hélice A del SR7 de un mapa OMIT $2mF_{obs}-DF_{cal}$ obtenido después de un ciclo de refinado mediante recocido simulado (*simulated annealing*) tras la eliminación de esta región de la estructura. El mapa se muestra a un nivel de 1σ . En ambas figuras se muestra la estructura final de esta región.

La estructura de SR7-SR8 se refinó frente a datos nativos a 2.05 Å de resolución usando el programa PHENIX.REFINE (Afonine et al, 2005), de forma similar a como se refinó la estructura del fragmento SR3-SR4 (ver antes). En las etapas iniciales, el modelo se refinó empleando el método de recocido simulado. En etapas posteriores, se realizó refinado posicional, refinado de valores B individuales y refinado de 3 grupos TLS en cada molécula. En las etapas iniciales del refinado se utilizaron restricciones de simetría no cristalográfica, que se dejaron de emplear en las etapas finales. Se incluyeron moléculas de solvente en picos positivos sobre 3σ en los mapas de diferencia $mF_{obs}-DF_{calc}$ y sobre 1σ en mapas $2mF_{obs}-DF_{calc}$ cuando se apreció un entorno de puentes de hidrógeno razonable. El refinado convergió en un valor de Rwork de 21.5 % y de Rfree de 25.6 % (Tabla R16). La estructura final del SR7-SR8 incluye los aminoácidos 1005-1229 de la molécula A, 1005-1232 de la molécula B y 311 moléculas de solvente. La estructura presenta una excelente geometría, el 99.4% de los ángulos de torsión de la cadena principal se localizan en

regiones favorecidas del diagrama de Ramachandran y el 0.6% están en regiones adicionalmente permitidas (Figura R33).

Tabla R16.- Estadísticas del refinado de la estructura SR7-SR8.

SR7-SR8 (1004-1233)	
Rango de resolución (Å)	19.6 - 2.05
Reflexiones únicas, work/free	38638 / 2056
R work (%)	21.5
R free ^a (%)	25.6
Número de aminoácidos ^b	225 / 228
Número de moléculas de solvente	311
Valor B promedio (Å ²)	
Wilson plot	30.9
Proteína ^b	43.28 / 48.66
Solvente	45.61
RMSD	
Distancias de enlace (Å)	0.009
Ángulos de enlace (°)	1.086
Aminoácidos en las regiones del mapa de Ramachandran ^c	
Más favorecidas	403 (99.4%)
Adicionalmente permitidas	10 (0.6%)
No permitidas	0 (0.0%)

^a Calculado con el 5% de las reflexiones que no se incluyeron en el refinado.

^b Valores para las moléculas A y B, respectivamente.

^c Calculado con el programa MOLPROBITY (Davis et al, 2007)

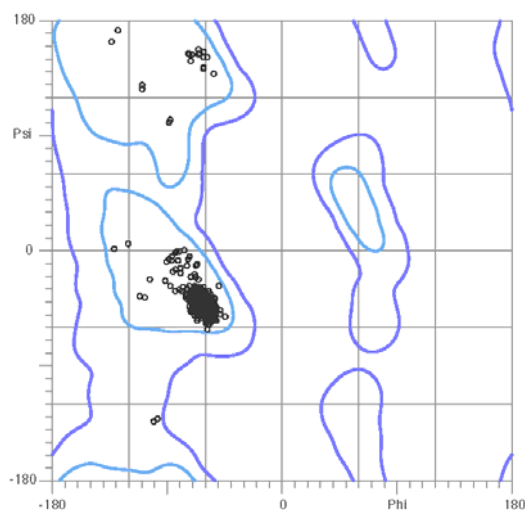


Figura R33.- Diagrama de Ramachandran de la estructura SR7-SR8.

2.4.2.- Descripción de la estructura del SR7-SR8.

La estructura del SR7-SR8 está formada por dos sub-dominios organizados en tándem, de manera similar a la organización de otros pares de SRs del dominio plakina, dando lugar a una estructura con forma de varilla alargada de ~ 105 Å de longitud y 20–25 Å de ancho (Figura R34). Las dos moléculas de SR7-SR8 son muy similares entre sí, siendo la rmsd en la posición de todos los átomos de la cadena principal 0.34 Å y 0.31 Å para el SR7 y SR8 respectivamente. Las dos moléculas presentes en la unidad asimétrica están relacionadas por un eje binario no cristalográfico detectado en el análisis de la función de auto-rotación y establecen contacto a nivel de los dominios SR8 que se disponen de forma antiparalela. No hay indicios para asignar una función biológica a este dímero cristalográfico.

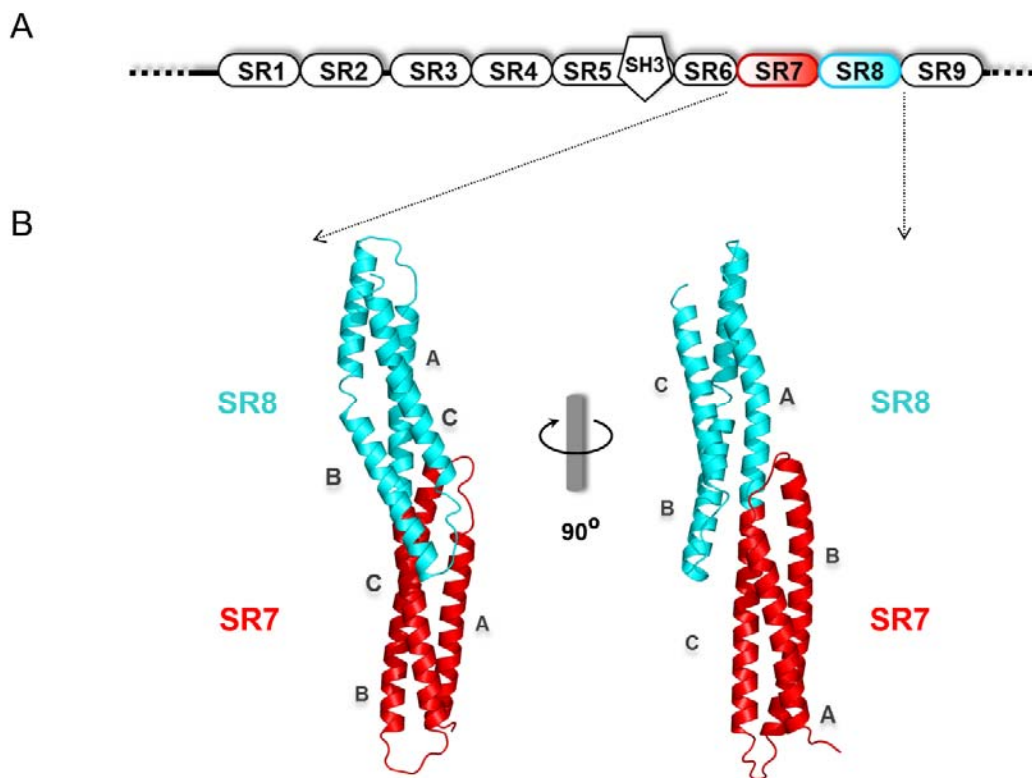


Figura R34.- Estructura cristalográfica de la región SR7-SR8 del dominio plakina de plectina.- (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina, la región estudiada se corresponde con los sub-dominios SR7 (rojo) y SR8 (azul). (B) Dos vistas ortogonales de la representación en lazos de la estructura cristalográfica del SR7-SR8.

Tanto el SR7 como el SR8 muestran la estructura característica de los SR canónicos, formados por tres α -hélices. Destaca que la hélice B del SR8 se extiende aproximadamente dos vueltas de hélice más allá del inicio de la hélice C lo que hace que se solape con el SR7. La hélice B del SR8 tiene una discontinuidad debida a la presencia de P1171, este tipo de alteración de la estructura helicoidal es frecuente la hélice B de otros SRs (Sonnenberg et al, 2007).

En la región de unión SR7/SR8 se solapan los haces de hélices del SR7 y el SR8. Las hélices B del SR7 y el SR8 y la hélice C-A se disponen aproximadamente en el mismo plano. Esto da lugar a la formación de dos pequeñas zonas en las que los haces contiene 4 hélices (Figuras R34 y R35). Además, existe una interacción entre el lazo A/B del SR7 y el lazo B/C del SR8. Entre ambos lazos predominan contactos polares. Las cadenas laterales de E1200 y R1203 en el SR8 establecen puentes de hidrógeno con la cadena principal del SR7, mientras que las cadenas laterales del R1035 (SR7) y E1196 (SR8) que forman un puente salino.

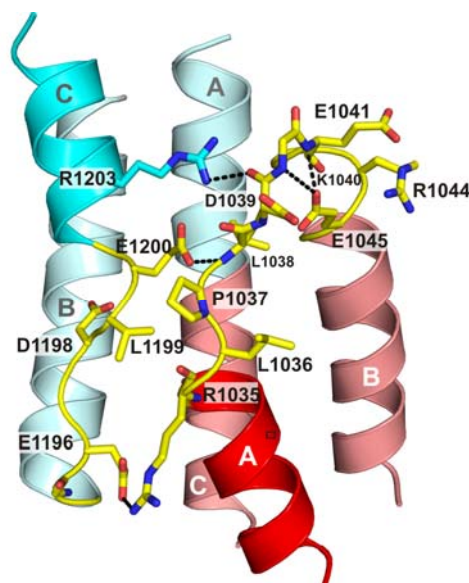


Figura R35.- Estructura de la zona de unión entre el SR7 y el SR8.- Las hélices B del SR7 y del SR8 se solapan con la hélice C-A que une el SR7 y el SR8. Los lazos A/B del SR7 y B/C del SR8 establecen contactos adicionales. Se muestran las cadenas laterales de residuos de los lazos A/B del SR7 y B/C del SR8 implicados en la interacción entre los dos sub-dominios o en la estabilización de la estructura de esta región. Los puentes de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas. Además de las interacciones polares, existen contactos hidrofóbicos, como el establecido entre P1037 y V1199.

En resumen, esta estructura sugiere que la zona de unión SR7-SR8 tiene muy limitada variabilidad conformacional y que es una región rígida, a diferencia de otros pares de SRs del dominio plakina.

2.5.- Estructura cristalográfica del SR7-SR9.

2.5.1.- Difracción de los cristales de SR7-SR9 y resolución de la estructura.

Se tomaron datos de difracción de cristales del fragmento SR7-SR9 (aminoácidos 1004-1372) usando radiación sincrotrón en la línea ID 13.2 del ESRF (Grenoble, Francia). La difracción de estos cristales es marcadamente anisotrópica (Figura R36). El mejor cristal difractó a una resolución máxima de ~ 3.5 Å en la mejor dirección de difracción y ~ 4 Å en la peor dirección. Los intentos por mejorar la calidad de los cristales, tanto durante la cristalización como mediante el tratamiento de los cristales (empleando diferentes soluciones crioprotectoras, deshidratación de los cristales, procesos de re-congelación, etc) fueron infructuosos.

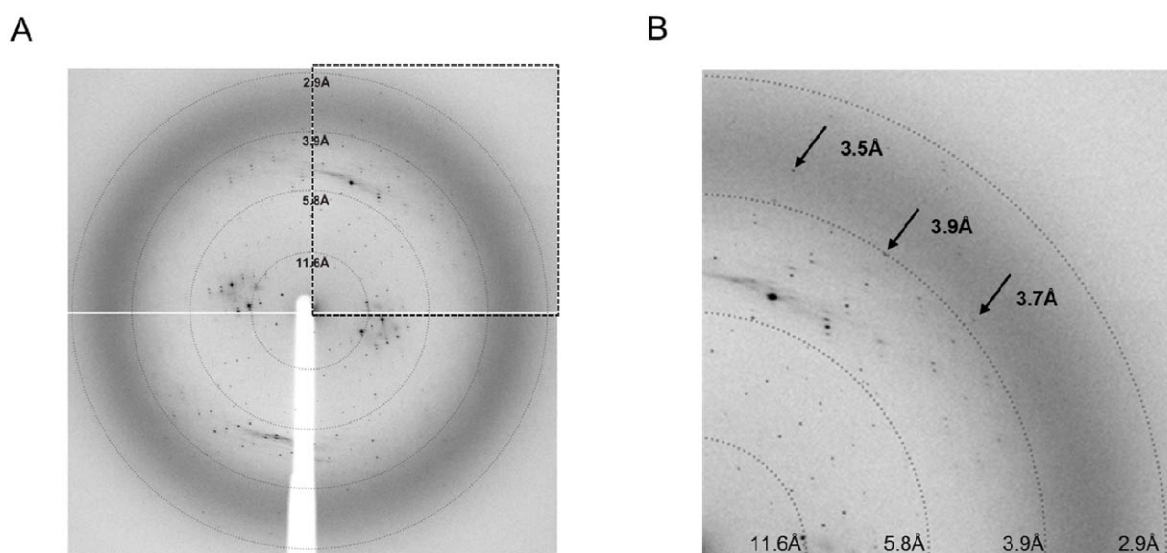


Figura R36.- Patrón de difracción de un cristal nativo del SR7-SR9.- (A) Imagen del patrón de difracción del SR7-SR9 correspondiente a una oscilación de 1° . Debido a la marcada anisotropía, no se observan reflexiones en varias regiones del patrón de difracción. Los anillos concéntricos indican diversos valores de resolución. (B) Detalle de una región del patrón de difracción de la figura A. Se observan reflexiones hasta una resolución de 3.5 Å en la parte superior izquierda (indicadas con flechas).

Los cristales de SR7-SR9 pertenecen al grupo espacial C2, siendo las dimensiones de su celda unidad: $a=75.2$ Å, $b=90.6$ Å, $c=154.3$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=99.2^\circ$ $\gamma=90^\circ$ (Tabla R17). La estimación del contenido de la unidad asimétrica sugirió que lo más probable era la presencia 2 o 3 moléculas de SR7-SR9, que corresponden a un contenido en solvente de 59.4% y 39.2%, y un V_M de 3.03 Å³/Da y 2.02 Å³/Da, respectivamente. La función de auto-rotación muestra varios picos en la sección polar $\kappa = 180^\circ$ (Figura R37). El pico más significativo diferente del eje binario de

simetría cristalográfica (SC) aparece a $\Psi=90^\circ$, $\Phi=45^\circ$ y sugiere la presencia de un eje binario de simetría no cristalográfica perpendicular el eje y que se orientaría en la diagonal formada por los ejes x y z. La aplicación del eje binario cristalográfico sobre el eje no cristalográfico crea un pico de Klug en $\Psi=90^\circ$, $\Phi=135^\circ$, que está enmascarado por unos picos con forma alargada que enlazan los extremos del eje b.

Tabla R17.-Estadísticas de los datos de difracción del SR7-SR9.

SR7-SR9 (1004-1372)	
Conjunto de datos	Nativo
Grupo espacial	C2
Dimensiones de la celda unidad (Å)	a=75.2 Å b=90.6 Å c=154.3 Å $\alpha=90^\circ \beta= 99.2 \gamma=90^\circ$
Longitud de onda (Å)	0.933
Resolución (Å)	3.5 (3.7-3.5) ^a
Reflexiones únicas	11322
Multiplicidad promedio	7.2 (6.9) ^a
Completitud (%)	86.8 (62.4) ^a
Rmeas^b (%)	8.4 (75.9) ^a
<I/σI>	13.5 (3.2) ^a

^a Los valores entre paréntesis corresponden a los datos de la concha de mayor resolución.

^b Rmeas es el factor independiente R de multiplicidad descrito por Diederichs y Karplus (Diederichs & Karplus, 1997)

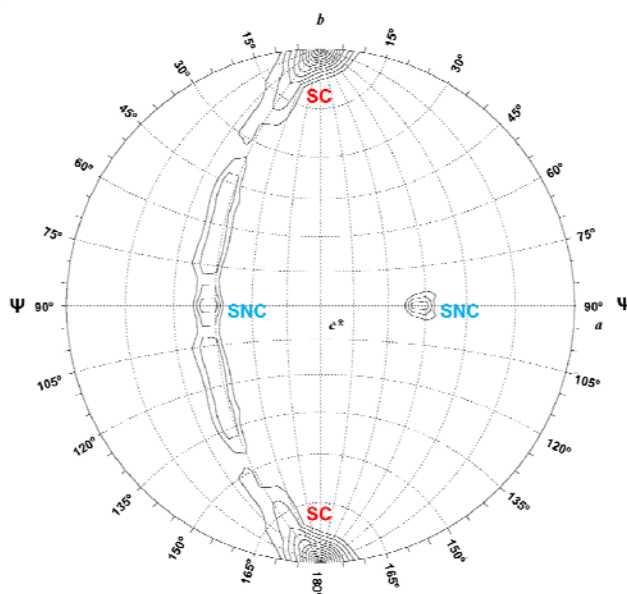


Figura R37.- Función de auto-rotación del fragmento SR7-SR9.- Proyección estereográfica de la sección polar $\kappa = 180^\circ$ de la función de auto-rotación. El gráfico se generó con el programa GRLF (Tong & Rossmann, 1997) usando datos en un rango de resolución 15.0–3.7 Å. El radio de integración fue de 40 Å. Se observan dos picos que corresponden a un eje de simetría no cristalográfica (SNC) en $\Psi=90^\circ \Phi=45^\circ$ y $\Psi=90^\circ \Phi=135^\circ$. Los picos pertenecientes a la simetría cristalográfica se indican como SC.

La estructura se faseó mediante reemplazo molecular. En un primer paso se empleó la estructura de la región SR7-SR8 como modelo de búsqueda. Se localizaron dos copias del SR7-SR8 en la unidad asimétrica. A continuación, se construyó un modelo de homología del SR9 a partir de la estructura cristalográfica del SR1 de α -espectrina eritrocítica (código PDB: 3LBX) (Ipsaro et al, 2010), que muestra un 17% de identidad de secuencia con la de plectina. En la búsqueda se localizaron dos copias del modelo del SR9. En cada una de ellas, el extremo N-terminal se encontraba adyacente al extremo C-terminal de un SR8.

A partir de este modelo inicial se llevó a cabo un proceso de refinado frente a datos experimentales hasta una resolución de 3.7 Å, con el programa PHENIX.REFINE (Afonine et al, 2005). En las primeras etapas, se refinó la posición de cinco cuerpos rígidos en cada molécula, correspondientes al SR7, SR8 y a cada una de las tres hélices del SR9. Se continuó con ciclos de refinado empleando recocido simulado y refinado de valores B agrupados (un grupo por residuo). En etapas posteriores se combinó refinado posicional, refinado de valores B individuales y refinado de tres grupos TLS en cada molécula. Durante el refinado, se utilizaron restricciones de simetría no cristalográfica, empleando tres grupos, cada grupo correspondiente a un SR. También se utilizaron restricciones derivadas de la estructura a alta resolución de la región SR7-SR8 a partir de la cual se definieron restricciones de ángulos diedros en la estructura. Los ciclos de refinado se alternaron con la modificación manual de la estructura usando el programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Se emplearon mapas $2mF_{obs}-DF_{calc}$ y $mF_{obs}-DF_{calc}$, también se emplearon mapas afilados (DeLaBarre & Brunger, 2006) mediante la aplicación de valores B negativos (típicamente entre -75 \AA^2 y -150 \AA^2) los cuales también se promediaron mediante aplicación de simetría no cristalográfica.

Tabla R18.- Estadísticas del refinado de la estructura SR7-SR9

SR7-SR9 (1004-1372)	
Rango de resolución (Å)	56.1 - 3.7
Reflexiones únicas, work/free	9468 / 527
R work (%)	29.6
R free ^a (%)	32.7
Número de aminoácidos ^b	326 / 337
Valor B promedio (Å²)	
Wilson plot	114
Proteína ^b	181 / 180
RMSD	
Distancias de enlace (Å)	0.006
Ángulos de enlace (°)	1.315
Aminoácidos en las regiones del diagrama de Ramachandran ^c	
Más favorecidas	638 (98.9%)
Adicionalmente permitidas	7 (1.1%)
No permitidas	0 (0.0%)

^a Calculado con el 5% de las reflexiones que no se incluyeron en el refinado.

^b Valores para las moléculas A y B, respectivamente.

^c Calculado con el programa MOLPROBITY (Davis et al, 2007)

El modelo final incluye los residuos 1008-1078, 1086-1263, 1278-1320 y 1335-1368 en la molécula A y 1006-1080, 1084-1142, 1148-1262, 1268-1320, 1335-1369 en la molécula B. Las regiones que no se incluyeron por falta de densidad electrónica definida, incluyen el lazo B/C del SR7, el lazo A/B del SR9 y el lazo B/C del SR9 en ambas moléculas. Además, en la molécula B tampoco se incluyó el lazo A/B del SR8. La estructura contiene las cadenas laterales de los residuos de los dominios SR7 y SR8, que se refinaron empleando como referencia la estructura a alta resolución de SR7-SR8. Sin embargo, en el SR9 sólo se incluyeron las cadenas laterales de aquellos residuos en los que la densidad electrónica ofrecía una clara indicación de la conformación de éstas; mientras que el resto de los residuos se truncaron tras el C β . Gracias a las restricciones empleadas por el programa PHENIX.REFINE, el 98.9% de los ángulos de torsión de la cadena principal de esta estructura se localizan en regiones favorecidas del diagrama de Ramachandran, el 1.1% restante de los aminoácidos ocupan regiones adicionalmente permitidas y no hay residuos en regiones prohibidas (Figura R38).

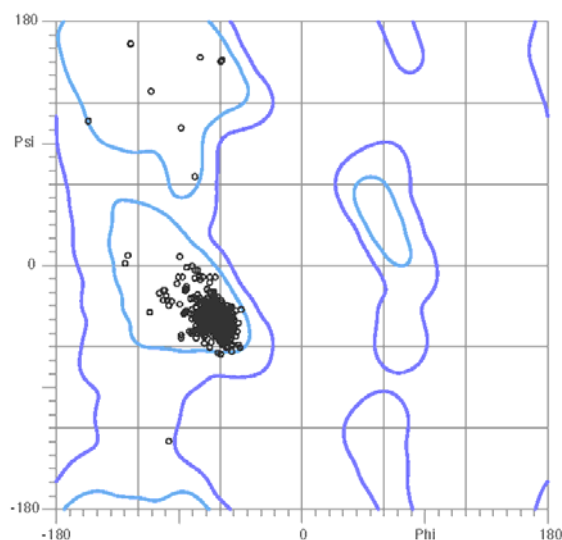


Figura R38.-Diagrama de Ramachandran de la estructura SR7-SR9.

2.5.2.- Descripción de la estructura del SR7-SR9.

La estructura del SR7-SR9 consiste en tres SRs que se disponen de manera contigua a lo largo del eje longitudinal de la molécula, dando lugar a una estructura alargada de ~ 150 Å (Figura R39). Éste es el único fragmento del dominio plakina de plectina formado por tres SRs, cuya estructura se ha resuelto en este trabajo. Los SRs que constituyen esta región están unidos entre sí a través de α -hélices continuas, la hélice C del SR de la región amino de la molécula se une con la hélice A del SR adyacente de la región carboxilo.

En este fragmento, la organización estructural del primer par de SRs (SR7-SR8) es idéntica a la observada en la estructura cristalográfica a alta resolución de SR7-SR8. Únicamente existen pequeñas diferencias en el extremo N-terminal de la hélice B del SR8 y en el lazo A/B respecto a la estructura SR7-SR8, que se debe a la interacción de esta región de la hélice B con el SR9, que hace que las α -hélices se empaqueten más estrechamente.

El SR9 también tiene una estructura de SR canónico, formada por tres α -hélices. La secuencia que une las hélices B y C del SR9 de plectina y otras plakinas, es aproximadamente 20-residuos más extenso que en otros SRs (Sonnenberg et al, 2007). Esta secuencia adicional extiende la hélice B aproximadamente 3 o 4 vueltas, de modo que esta prolongación de la hélice B forma un haz de 4 hélices con el SR8.

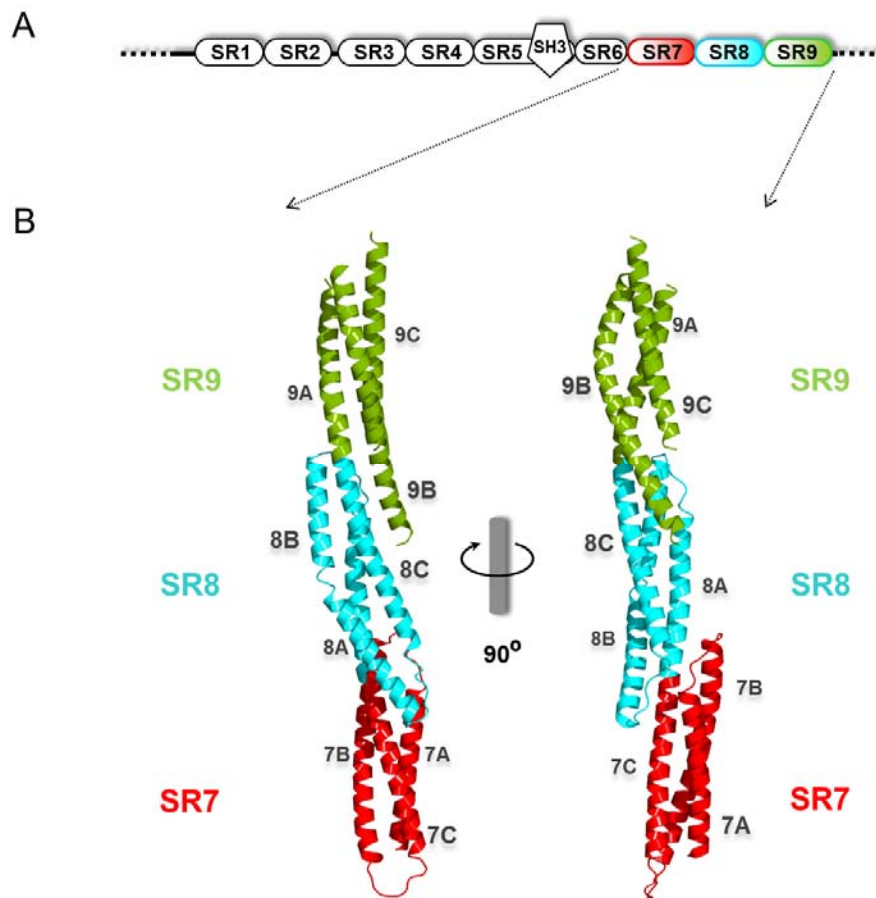


Figura R39.- Estructura cristalográfica de la región SR7-SR9 del dominio plakina de plectina.- (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina, la región estudiada se corresponde con los sub-dominios SR7 (rojo), SR8 (azul) y SR9 (verde). (B) Dos vistas ortogonales de la representación en lazos de la estructura cristalográfica del SR7-SR9.

Los cristales del SR7-SR9 contienen dos moléculas en la unidad asimétrica. La orientación relativa de los tres SRs es prácticamente igual en las dos moléculas (las restricciones de simetría no cristalográfica se aplicaron dentro de cada SR individual pero no a la disposición relativa de los SRs). Las dos moléculas del SR7-SR9 están relacionadas por un eje de simetría binario paralelo al eje longitudinal de la molécula (Figura R40). Las dos moléculas establecen contactos a lo largo de los tres SRs, siendo la mayor zona de contacto la que establecen las hélices C de los SR9. Además se producen contactos inter-moleculares adicionales a nivel del lazo A/B del SR7, el lazo B/C del SR8, y el extremo C-terminal de la hélice B del SR9.

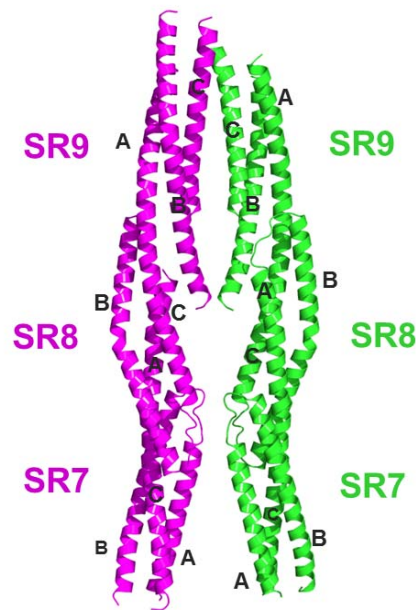


Figura R40.- Representación de las dos moléculas del SR7-SR9 relacionadas por simetría.

2.6.- Estructura individual de cada repetición de espectrina (SR) del dominio plakina.

En la Figura R41 se muestra de forma comparativa la estructura individual de los nueve SRs presentes en el dominio plakina de plectina. Todos los SRs tienen una estructura global alargada similar de ~60-70 Å de longitud y ~25-30 Å de ancho, a excepción del SR6 que es de menor tamaño y tiene una longitud de ~40 Å.

A pesar de la similitud estructural, se observan diferencias entre los SRs. Por ejemplo, la longitud de las α -hélices no está conservada entre los distintos SRs. Las diferencias más notables se aprecian en la hélice B, que es inusualmente larga en el SR8 y el SR9 sobresaliendo del haz helicoidal junto al extremo N-terminal. Por otro lado, en algunos dominios la hélice B se encuentra interrumpida por un quiebro en la zona central helicoidal. Esta interrupción en la hélice B aparece en los SRs de espectrinas, como en el SR3 de α -actinina. En plectina se observa en los dominios SR1, SR3, SR8 y SR9. En el SR1 y el SR8 se debe a la presencia de un residuo de Pro (P357 en el SR1 y P1171 en el SR8), el cual no está presente en el SR3 ni el SR9. Esta deformación de la hélice B parece estar relacionada con la presencia de residuos relativamente voluminosos en el núcleo hidrofóbico del SR.

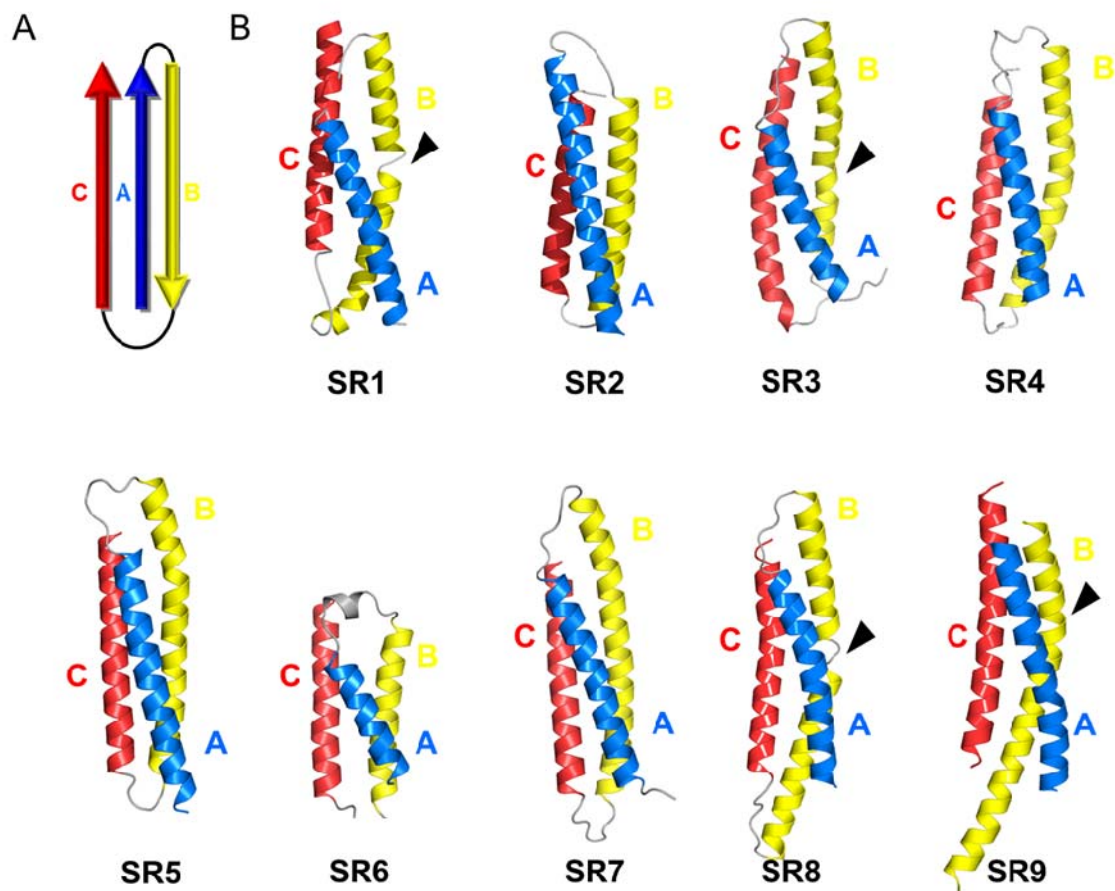


Figura R41.-Comparación estructural de los nueve SRs individuales del dominio plakina de plectina. (A) Diagrama de las tres hélices (A, B y C) de un SR canónico, que se unen con una topología: arriba-abajo-arriba. (B) Representación en lazos de la estructura cristalográfica de los nueve SR. Todos los SRs se representan en la misma orientación a lo largo del panel. Las hélices están rotuladas con letras mayúsculas y las hélices equivalentes en cada SR se muestran en el mismo color, siguiendo el esquema de color del diagrama A. Las estructuras del SR1 y SR2 provienen del par SR1-SR2 (código PDB: 2ODU), el SR3 del fragmento SR3-SR4, el SR4 del fragmento SR4-SR5, el SR5 y SR6 del fragmento SR5-SR6- Δ SH3-A, el SR7 y SR8 del fragmento SR7-SR8 y el SR9 del fragmento SR7-SR9. La posición del quiebro en la hélice B del SR1, SR3, SR8 y SR9 está indicado con un triángulo relleno.

2.7.- Comparación de la organización relativa entre SRs del dominio plakina.

En el dominio plakina, los SRs adyacentes están unidos por una región helicoidal que se forma por la fusión de la hélice C del primer SR(n) con la hélice A del segundo SR(n+1) (Figura R42). A pesar de compartir esta característica común, la orientación relativa de los SRs adyacentes no está conservada a lo largo del dominio plakina. En la Figura 36 se representa la estructura cristalográfica de cada uno de los cinco pares de SRs de plectina resueltos en este trabajo, además de la estructura del par SR1-SR2 (Sonnenberg et al, 2007). Estas seis estructuras constituyen todos los posibles pares de SRs del dominio plakina, a excepción de los

pares SR6-SR7 y SR2-SR3. En este último, el SR2 está unido al SR3 por una región de aproximadamente 25 aminoácidos no helicoidal.

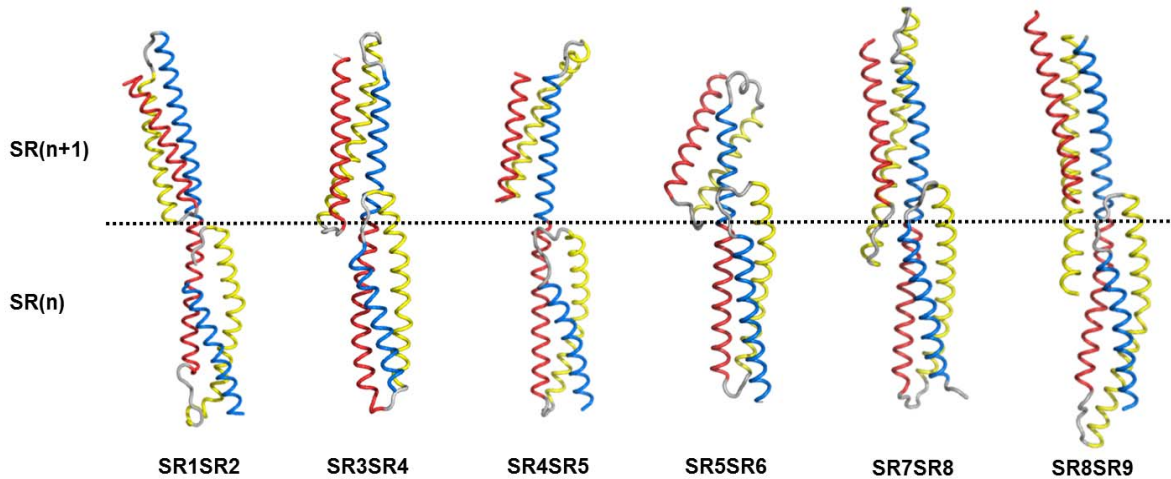


Figura R42.- Comparación de la orientación relativa entre pares de SRs del dominio plakina.- Representación en forma de cordón de la estructura cristalográfica de seis pares de SRs del dominio plakina de plectina. Todos los pares de SRs están centrados respecto a la región de unión entre SRs, sobre la línea negra discontinua. El primer SR de cada par: (SR) n se muestra con una orientación similar en todos los pares de SRs, para comparar visualmente la orientación relativa del segundo SRs. Las hélices equivalentes en todos los SRs están coloreadas en azul, amarillo y rojo, respectivamente (Hélices A,B y C).

Se observa una gran variabilidad en la organización de SRs contiguos a lo largo del dominio plakina. Para analizar la relación entre SRs adyacentes podemos suponer que en cada par de SRs, el primer SR(n) se puede superponer aproximadamente sobre el segundo SR($n+1$) realizando una traslación y un giro a lo largo del eje longitudinal de la molécula. Por un lado, se observan diferencias en el desplazamiento o traslación que relaciona a los SRs a lo largo del eje longitudinal de la molécula, que dan lugar a un mayor o menor solapamiento de los SRs a lo largo de este eje. En los pares SR3-SR4, SR5-SR6, SR7-SR8 y SR8-SR9 hay una región de ~10-15 aminoácidos que forma parte de ambos dominios (Figura R42), mientras que en la estructura del par SR4-SR5 y del SR1-SR2 no se observa un solapamiento longitudinal entre los SRs. Por otro lado, se aprecian diferencias en la orientación relativa de los SRs adyacentes, que se corresponden con variaciones en el grado de giro y/o inclinación de un SR respecto al anterior.

En resumen, existe una gran variabilidad en el grado de imbricación longitudinal de los SRs contiguos y en la orientación relativa de un SR respecto al anterior a lo largo

Capítulo 4

de todo el dominio plakina. Esto sugiere que la variabilidad conformacional y posiblemente la flexibilidad entre los SRs es también diferente en distintas regiones del dominio plakina.

3.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL DOMINIO PLAKINA EN SOLUCIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DE RAYOS-X A BAJO ÁNGULO (SAXS).

Con el fin de caracterizar la estructura del dominio plakina en solución hemos aplicado métodos de dispersión de rayos-x a bajo ángulo (SAXS), ya que esta técnica proporciona información sobre la forma y el tamaño de proteínas en solución y permite la estimación de estructuras a baja resolución.

Se han analizado mediante SAXS cinco fragmentos de la región SR3-SR9 del dominio plakina de plectina (Figura R43). Dos de éstos corresponden a la región central del dominio plakina: SR3-SR5 y SR3-SR6; otros dos corresponden a la región C-terminal: SR7-SR9 y SR6-SR9; y por último, se ha analizado un fragmento que incluye la región SR3-SR9 completa.

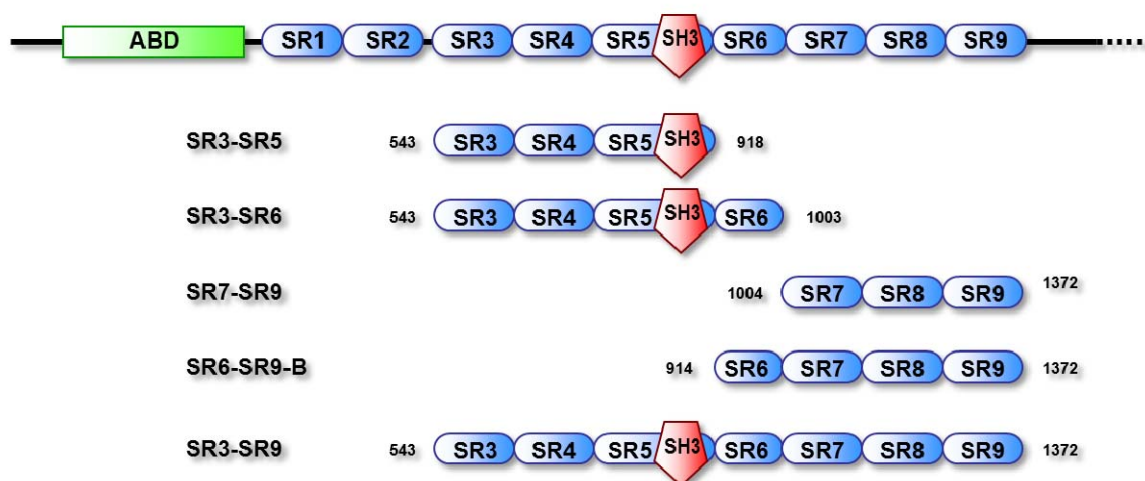


Figura R43.- Fragmentos recombinantes del dominio plakina de plectina analizados mediante SAXS. Todos los fragmentos se expresan como proteínas solubles en *E.coli*.

La estrategia seguida en el análisis mediante SAXS de los fragmentos del dominio plakina se muestra en la Figura R44. En primer lugar, a partir de los perfiles experimentales de SAXS de los fragmentos analizados se han estimado sus parámetros estructurales y se han calculado estructuras a baja resolución mediante métodos *ab initio*. Además, puesto que se dispone de la estructura cristalográfica de los subdominios que forman los fragmentos analizados, ha sido posible construir modelos atómicos de estas regiones. Posteriormente, estos modelos se han evaluado frente a los datos experimentales de SAXS a tres niveles, comparando: los

perfiles de dispersión, los parámetros estructurales y las estructuras a baja y a alta resolución.

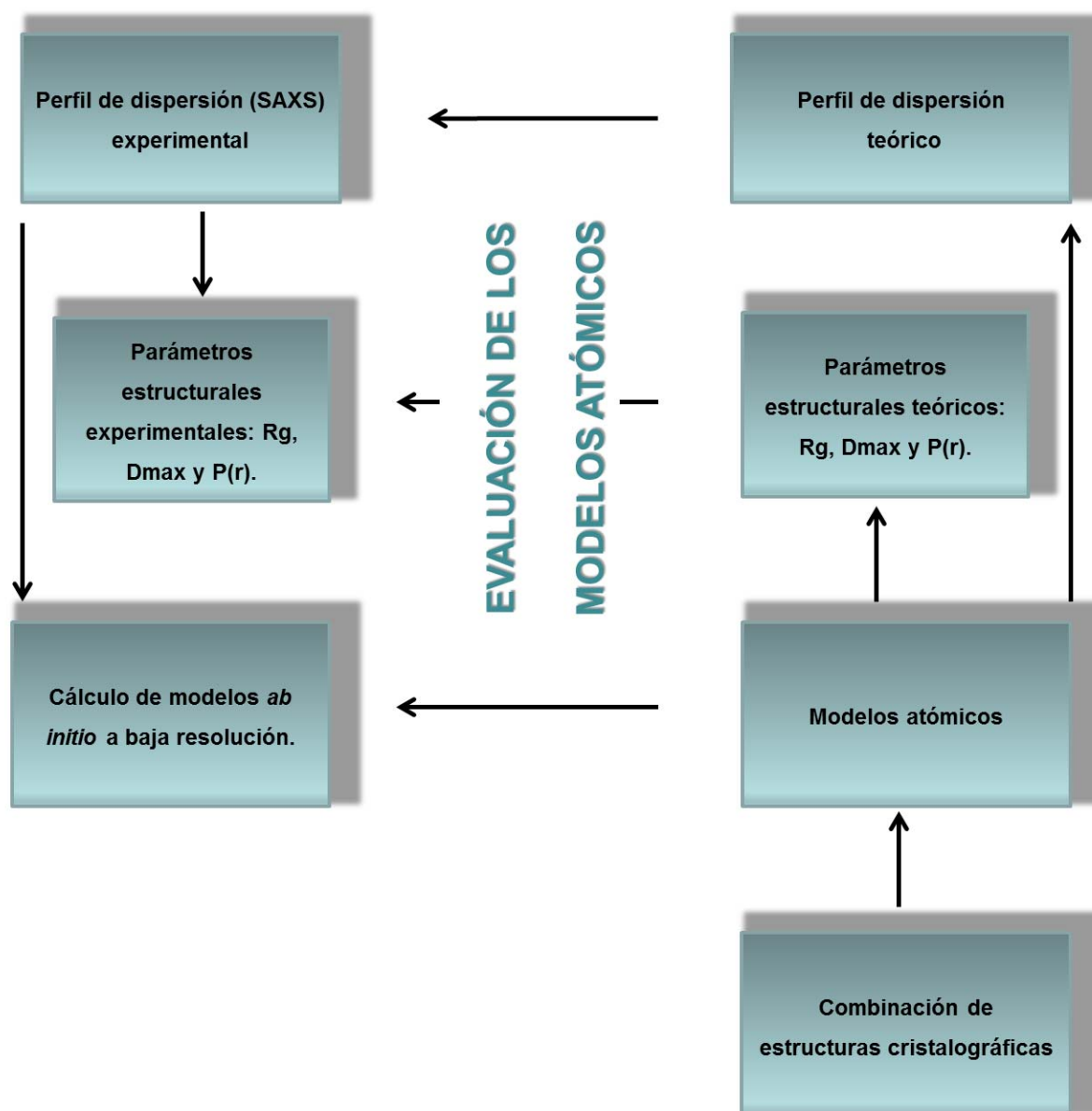


Figura R44.- Estrategia seguida en la caracterización estructural mediante SAXS de fragmentos del dominio plakina en solución.

3.1.- Caracterización estructural de la región SR3-SR5 en solución.

En el estudio de la región SR3-SR5 (residuos 543-918) mediante SAXS se midió el perfil de dispersión a cuatro concentraciones: 1.2, 2.4, 4.8 y 9.6 mg/ml. Los datos no mostraron síntomas de que exista agregación de forma apreciable en el rango de concentraciones ensayadas. En la Figura R45A se muestra el perfil de dispersión extrapolado a dilución infinita. La masa molecular aparente de SR3-SR5

correspondiente al volumen excluido calculado a partir de los datos de SAXS es 45.2 ± 0.5 kDa. Este valor es similar a la masa molecular calculada a partir de su secuencia (43.3 kDa) y confirma que este fragmento de plectina es un monómero en solución. El análisis de Guinier revela que el SR3-SR5 tiene un R_g de 43.9 ± 4.5 Å (Figura R45C, Tabla R19). Este valor es similar dentro del error experimental al R_g de 42.9 ± 2.3 Å determinado en el cálculo de la función de distribución de distancias ($P(r)$) usando datos en un rango de vector de dispersión q entre 0.017 y 0.35 Å⁻¹. La $P(r)$ se caracteriza por un máximo en torno a una distancia de 20 Å y una larga cola hasta una distancia máxima (D_{max}) de 145 Å (Figura R45B). La forma de esta $P(r)$ es característica de estructuras alargadas.

La representación de los datos de SAXS mediante el gráfico de Kratky (Figura R45D) muestra una curva que se aproxima a cero a altos valores de q ; esto es característico de proteínas plegadas y sugiere que el SR3-SR5 en solución tiene una estructura compacta sin una presencia significativa de regiones desordenadas.

Tabla R19.- Parámetros estructurales de la región SR3-SR5.

	R_g^b	R_g^c	D_{max}	Volumen de Porod	Peso molecular
SAXS^a	43.9 ± 4.5 Å	42.9 ± 2.3 Å	145 Å	60136 Å ³	45.2 ± 0.5 kDa
Modelo	40.3 Å ^d		155 Å ^d		43.3 kDa

^a Parámetros estructurales determinados a partir de los datos experimentales de SAXS

^b Estimación a partir de la aproximación lineal de Guinier

^c Estimación a partir de la $P(r)$

^d Calculado con el programa HYDROPRO.

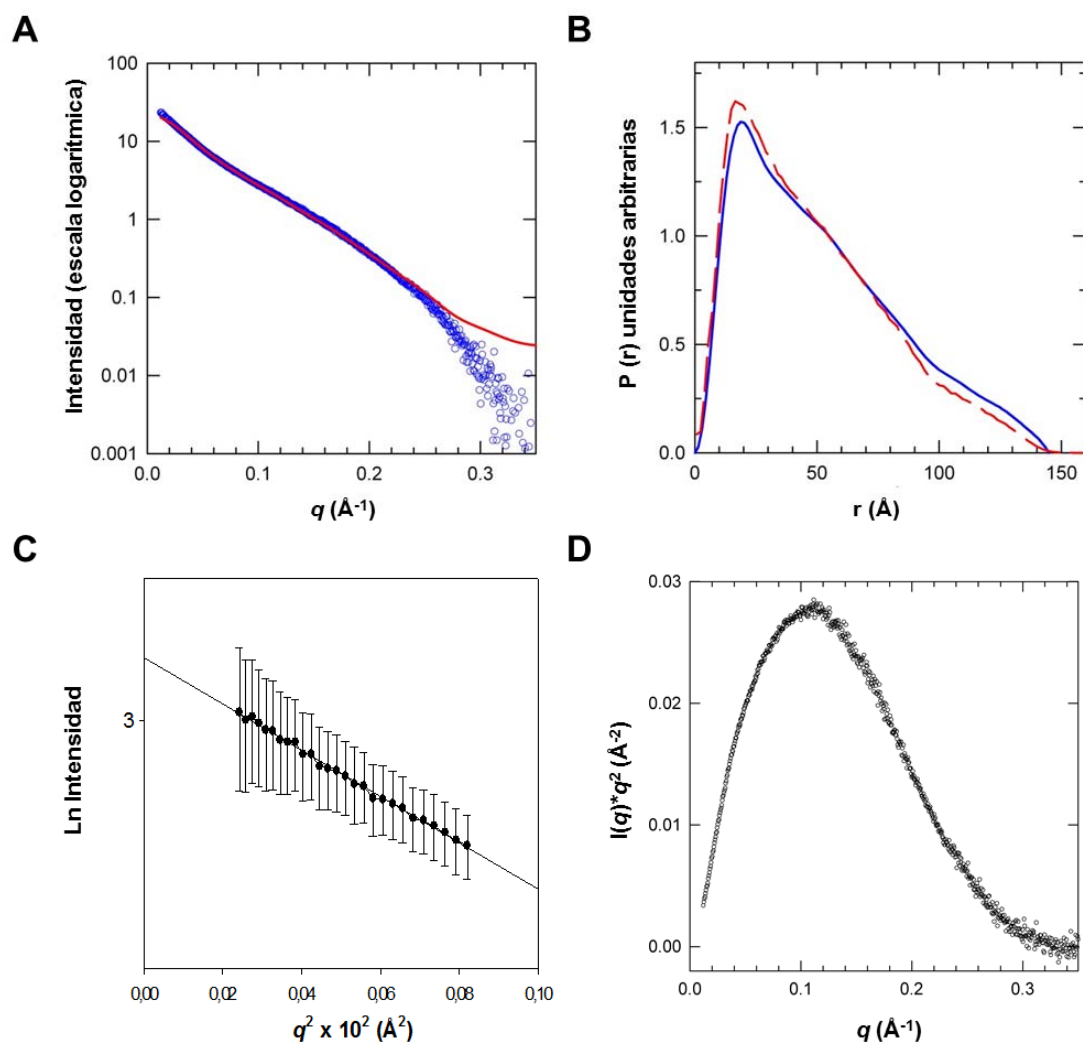


Figura R45.- Análisis mediante SAXS de la región SR3-SR5. (A) Perfil de dispersión experimental del fragmento SR3-SR5 para el rango de vector de 0.01 a 0.35 Å⁻¹ (círculos azules). La línea roja corresponde al perfil de dispersión calculado a partir del modelo atómico de esta región. (B) Función de distribución de distancias inter-atómicas (P(r)), calculada a partir de los datos experimentales (línea continua azul) y P(r) calculada a partir de la estructura atómica (línea discontinua roja). (C) Gráfico de Guinier en el cual se representan los datos experimentales en el rango 0.68 < qR_g < 1.26 con sus barras de error. (D) Gráfico de Kratky calculado a partir de los datos de SAXS.

3.1.1.- Estructura de la región SR3-SR5 en solución a baja resolución.

A partir de los datos experimentales de SAXS del fragmento SR3-SR5 se construyeron modelos a baja resolución mediante métodos *ab initio* utilizando los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000). Con cada programa se generaron 10 reconstrucciones independientes. El valor promedio de NSD de los modelos calculados con DAMMIF y DALAI_GA fue 0.59 ± 0.03 y 0.63 ± 0.02 respectivamente, lo que ilustra que cada programa genera

reconstrucciones estables que dan lugar a modelos muy similares entre sí. A partir de cada conjunto de 10 modelos se calculó una estructura promedio (Figura R46). Las estructuras promedio calculadas con DAMMIF y DALAI_GA son muy similares entre sí, siendo el valor de NSD entre ellas de 0.56.

La estructura del SR3-SR5 en solución se asemeja a un cilindro o varilla de ~ 145 Å de longitud y ~ 30 Å de diámetro, con una protuberancia lateral. Esta protuberancia está descentrada a lo largo del eje longitudinal y define un brazo largo y un brazo corto en la varilla.

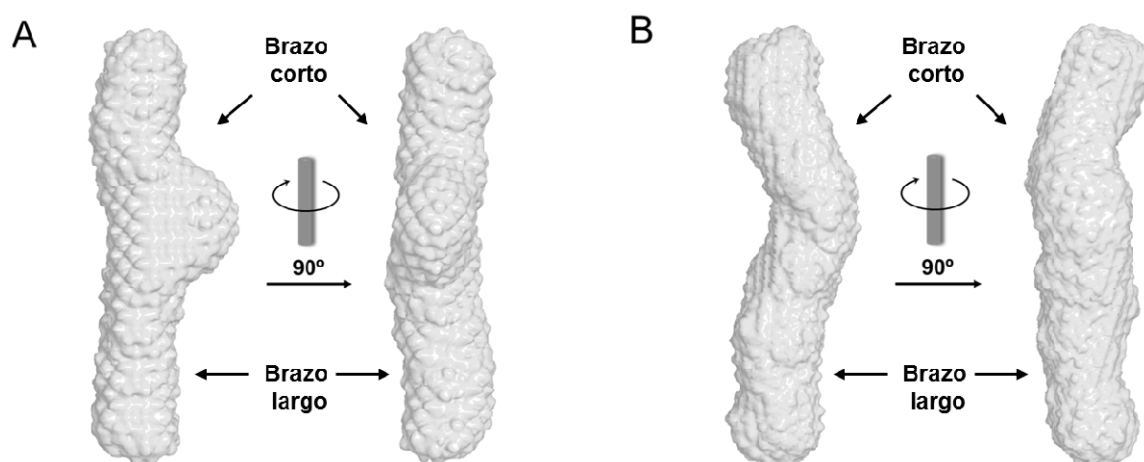


Figura R46.- Estructura a baja resolución de la región SR3-SR5 calculada a partir de los datos de SAXS. Envoltas de las estructuras promedio calculadas con los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) (A) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000) (B).

3.1.2.- Modelo atómico de la región SR3-SR5 y comparación con la estructura derivada de los datos de SAXS.

A pesar de que no se tuvo éxito en la cristalización del fragmento SR3-SR5, fue posible construir un modelo de la estructura de esta región empleando como moldes las estructuras cristalográficas de los fragmentos SR3-SR4 y SR4-SR5.

La estructura de SR3-SR5 se construyó superponiendo las regiones estructuralmente conservadas del SR4 en las estructuras de SR3-SR4 y SR4-SR5 (Figura R47). Seguidamente, se combinaron las coordenadas de los aminoácidos 543-660 y 692-727 de la estructura cristalográfica de SR3-SR4 (correspondientes al SR3 y regiones del SR4) con la estructura de las regiones 661-691 y 728-915 de la estructura cristalográfica de SR4-SR5 (correspondientes a regiones del SR4, SR5 y al dominio SH3). El modelo así construido revela que el SR3-SR5 tiene una forma

alargada o de varilla en la que los tres SRs están aproximadamente alineados a lo largo del eje longitudinal de la molécula.

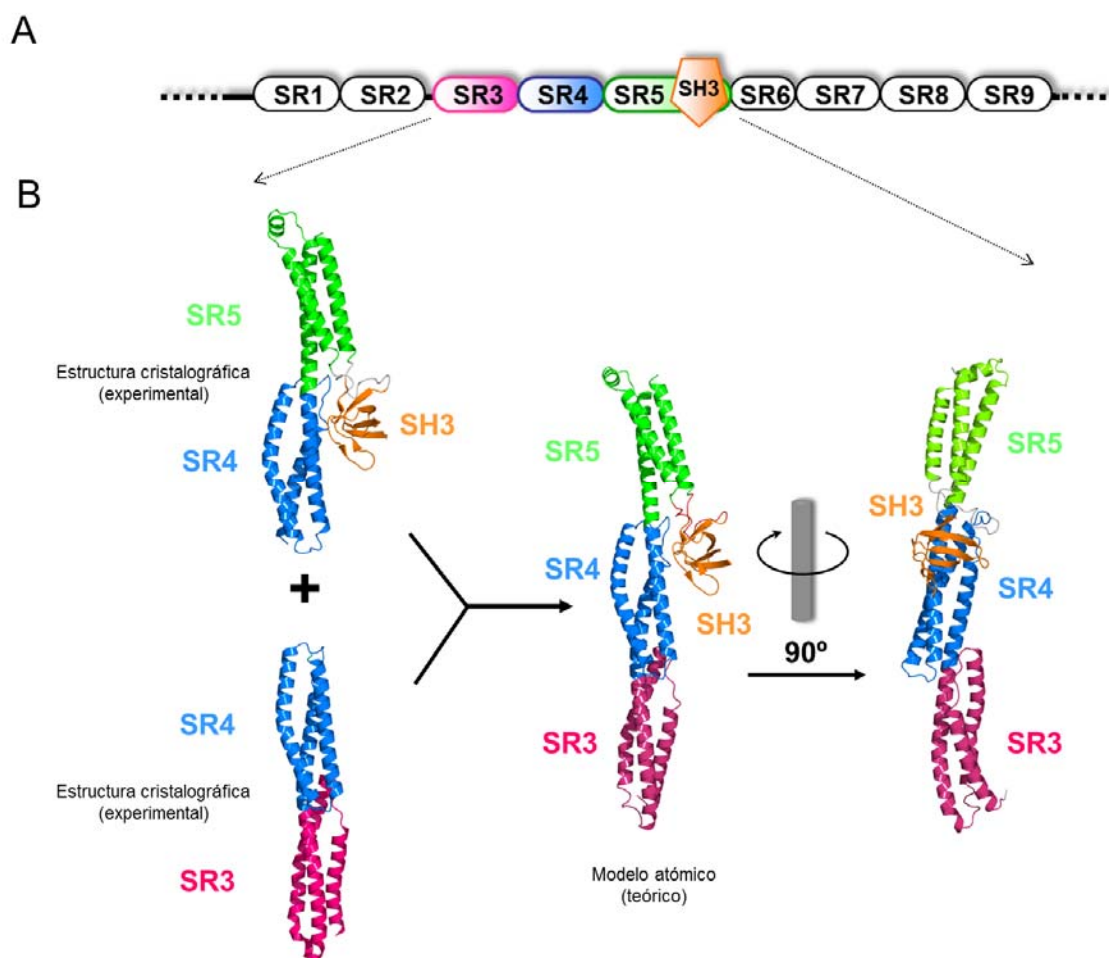


Figura R47.- Modelo atómico de la región SR3-SR5. (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina, la región para la cual se construyó el modelo atómico se corresponde con los subdominios SR3 (rosa), SR4 (azul), SH3 (naranja) y SR5 (verde). (B) Estructuras cristalográficas de los fragmentos SR3-SR4 y SR4-SR5 que se utilizaron para construir el modelo SR3-SR5.

El perfil de SAXS teórico calculado a partir del modelo SR3-SR5 es prácticamente idéntico al observado experimentalmente (Figura R45A). De forma similar la $P(r)$ calculada para el modelo es muy similar a la derivada de los datos de SAXS (Figura R45B). El R_g calculado para el modelo es 40.3 Å, que entra dentro del error experimental de los valores derivados experimentalmente (Tabla R14). La D_{max} del modelo es de 155 Å, si bien el 99.99% de las distancias ocurren a $D < 147$ Å, un valor muy similar al observado en la $P(r)$ obtenida de los datos de SAXS. En resumen, el modelo atómico SR3-SR5 reproduce correctamente los datos de dispersión experimental y los parámetros estructurales derivados de éstos.

Además, existe una excelente concordancia entre el modelo atómico SR3-SR5 y las estructuras a baja resolución calculadas a partir de los datos de SAXS (Figura R48). El cilindro que forma el SR3-SR5 se corresponde con los tres SRs de esta región y el dominio SH3 coincide con la protuberancia. El SR5 ocupa el brazo corto de la estructura cilíndrica, mientras que el brazo largo se corresponde con el SR3 y parte del SR4.

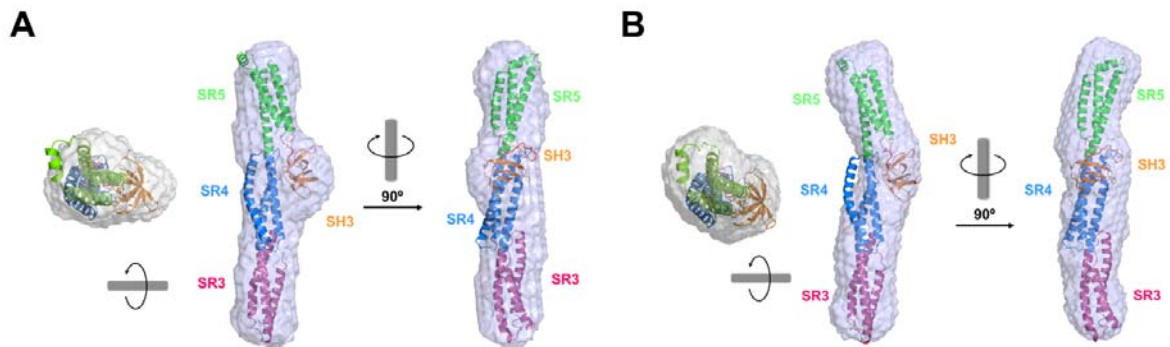


Figura R48.- Estructura de la región SR3-SR5 en solución y comparación con el modelo atómico. Tres vistas ortogonales de la superposición del modelo teórico del fragmento SR3-SR5 en las envueltas a baja resolución calculadas a partir de datos experimentales de SAXS con los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) (A) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000) (B).

En resumen, la región SR3-SR5 adopta en solución una estructura alargada en la que la disposición de los sub-dominios adyacentes es compatible con la observada en las estructuras cristalográficas.

3.2.- Caracterización estructural de la región SR3-SR6 en solución.

Para estudiar la estructura de la región SR3-SR6 (aminoácidos 543-1003) se midió el perfil de dispersión a tres concentraciones: 1.3, 2.6 y 10.4 mg/ml. El perfil de dispersión extrapolado a dilución infinita se muestra en la Figura R49A. Las muestras del SR3-SR6 eran homogéneas, monodispersas en solución y no se apreciaron síntomas de agregación entre las partículas. La masa molecular aparente del SR3-SR6 correspondiente al volumen excluido estimado a partir de los datos de SAXS es 54 ± 0.4 kDa, un valor muy similar al calculado a partir de su secuencia (53.2 kDa), lo que confirma que este fragmento de plectina es un monómero en solución.

Capítulo 4

La $P(r)$ del SR3-SR6 presenta un máximo a una distancia de 20 Å y una larga cola hasta una distancia máxima (D_{max}) de 170 Å (Figura R49B). La forma de esta $P(r)$ es comparable a la determinada para el SR3-SR5 (ver antes) y es característica de estructuras alargadas.

El R_g calculado a partir de la aproximación lineal de Guinier 46.7 ± 7.8 Å (Tabla R20, Figura R49C) es muy similar al R_g , 50.7 ± 2.7 Å, determinado en el cálculo de la $P(r)$ usando datos en un rango de vector de dispersión q entre 0.017 y 0.35 \AA^{-1} (Tabla R20). La representación de Kratky de los datos de SAXS muestra curva en forma de campana asimétrica que se aproxima a cero a valores medios y altos de q . Esta forma es característica de proteínas plegadas, lo que sugiere que el fragmento SR3-SR6 en solución tiene una estructura compacta sin regiones desordenadas (Figura R49D).

Tabla R20.- Parámetros estructurales de la región SR3-SR6.

	R_g^b	R_g^c	D_{max}	Volumen de Porod	Peso molecular
SAXS ^a	$46.7 \pm 7.8 \text{ \AA}$	$50.7 \pm 2.7 \text{ \AA}$	170 Å	89800 \AA^3	$54 \pm 0.4 \text{ kDa}$
Modelo	$49.6 \pm 0.6 \text{ \AA}$		$191 \pm 1.7 \text{ \AA}^d$		53.2 kDa

^a Parámetros estructurales determinados a partir de los datos experimentales de SAXS
^b Estimación a partir de la aproximación lineal de Guinier.
^c Estimación a partir de la $P(r)$.
^d Calculado con el programa HYDROPRO.

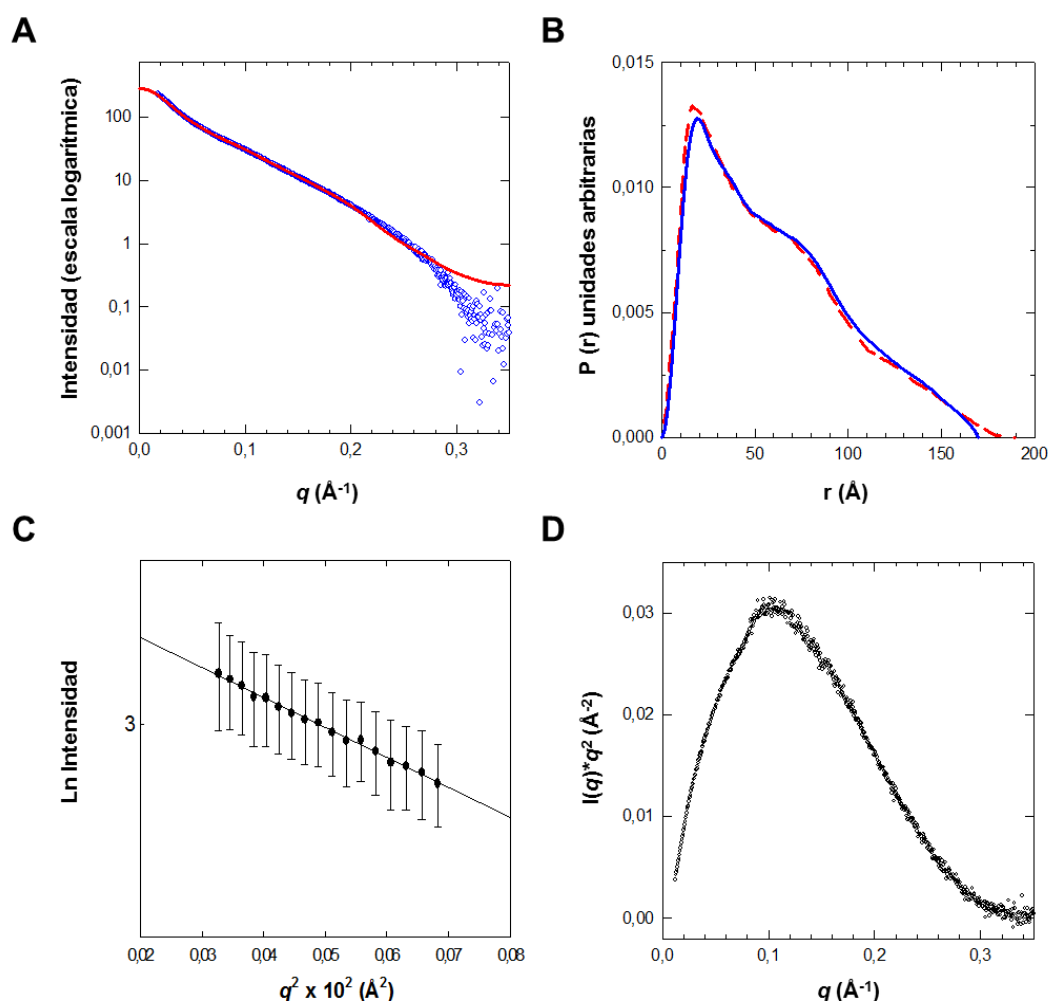


Figura R49.- Análisis mediante SAXS de la región SR3-SR6. (A) Perfil de dispersión experimental del fragmento SR3-SR6 para el rango de vector de 0.01 a 0.35 \AA^{-1} (círculos azules). La línea roja corresponde al perfil de dispersión calculado a partir del modelo atómico de esta región. (B) Función de distribución de distancias inter-atómicas, $P(r)$, calculada a partir de los datos experimentales (línea continua azul) y $P(r)$ calculada a partir de la estructura atómica (línea discontinua roja). (C) Gráfico de Guinier en el que se representan los datos experimentales en el rango $0.84 < qR_g < 1.22$ con sus barras de error. (D) Gráfico de Kratky calculado a partir de los datos de SAXS.

3.2.1.- Estructura de la región SR3-SR6 en solución a baja resolución.

Usando los datos experimentales de SAXS del fragmento SR3-SR6, se generaron modelos a baja resolución mediante métodos *ab initio*, usando los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000). Como en el caso anterior, cada programa generó 10 reconstrucciones independientes. Las estructuras obtenidas con cada programa son muy similares entre sí, siendo el valor promedio de NSD de los modelos calculados con DAMMIF y DALAI_GA, 0.62 ± 0.02 y 0.63 ± 0.02 respectivamente. A partir de cada grupo de 10 estructuras generadas

con DAMMIF o DALAI_GA se calculó una estructura promedio (Figura R50). Las dos estructuras promedio son muy similares entre sí, representado por un valor de NSD de 0.57 ± 0.02 . Estas estructuras revelan que la región SR3-SR6 tiene una forma de varilla alargada de ~ 170 Å de longitud y ~ 30 Å de diámetro, que presenta un abultamiento o discontinuidad en la parte central, la cual posiblemente corresponde al dominio SH3. La estructura de la región SR3-SR6 es muy similar a la determinada para la región SR3-SR5. Sin embargo, en la estructura del SR3-SR6 la protuberancia asignada al dominio SH3 divide la varilla en dos mitades o brazos de longitudes similares. Esto sugiere que el SR6 se localiza en el extremo del brazo corto del fragmento SR3-SR5 extendiendo la longitud total de la estructura.

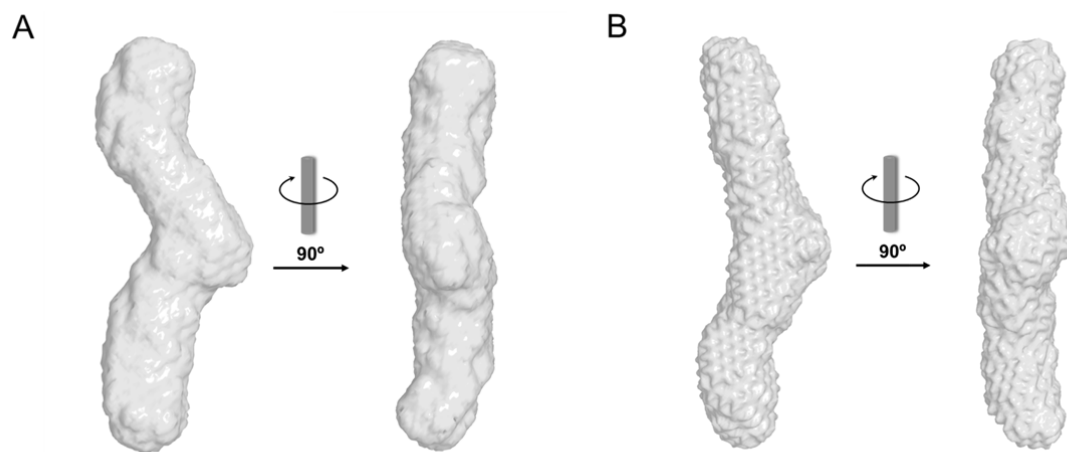


Figura R50.- Estructura a baja resolución de la región SR3-SR6 calculada a partir de los datos de SAXS. Envoltas de las estructuras promedio calculadas con los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) (A) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000) (B).

3.2.2.- Modelo atómico de la región SR3-SR6 y comparación con la estructura derivada de los datos de SAXS.

Los ensayos cristalográficos realizados con este fragmento no fueron fructíferos y no se obtuvieron cristales de esta región. Sin embargo, fue posible construir modelos atómicos de la región SR3-SR6 empleando las estructuras cristalográficas de los fragmentos SR3-SR4, SR4-SR5 y SR5-SR6- Δ SH3-A/B (Figura R51). La región SR5-SR6 muestra una moderada variabilidad conformacional debido a un movimiento de bisagra localizado en la región de unión SR5/SR6, (ver sección 2.3 de Resultados). Por lo tanto, para obtener una representación de la región SR3-SR6 que ilustre esta

variabilidad, se construyeron cuatro modelos atómicos empleando cada una de las cuatro estructuras cristalográficas disponibles de los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3-A y B.

En primer lugar, se construyó un modelo de la región SR3-SR5 tal y como se ha descrito anteriormente. A continuación, este modelo se combinó con cada una de las estructuras de SR5-SR6- Δ SH3-A o B. Para ello, se superpusieron las regiones estructuralmente conservadas del SR5 en ambas estructuras y se combinaron las posiciones de las regiones 543-767 y 804-907 del modelo SR3-SR5 (correspondientes al SR3, SR4, regiones del SR5 y al SH3) con las posiciones de las regiones 768-803 y 908-1000 de la estructura cristalográfica de SR5-SR6- Δ SH3-A o B (correspondientes a regiones del SR5 y al SR6). Los cuatro modelos tienen una forma alargada en la que los cuatro SRs se disponen de manera contigua y alineada con el eje longitudinal de la molécula, mientras que el dominio SH3 se sitúa en un lateral del modelo, dividiendo a éste, en dos regiones de similar longitud.

Los perfiles teóricos de SAXS calculados a partir de los modelos atómicos SR3-SR6 muestran un excelente ajuste con el perfil experimental ($\chi^2 = 0.13$) (Figura R49A). Los cuatro perfiles teóricos se superponen entre sí, lo que indica que los cuatro modelos son similares al nivel de resolución que se obtiene con esta técnica. Los valores del R_g calculados para los modelos son casi idénticos entre sí ($49.6 \pm 0.6 \text{ \AA}$) y entran dentro del error del R_g experimental, (Tabla R21). Las $P(r)$ teóricas de los cuatro modelos son prácticamente idénticas y reproducen la $P(r)$ determinada a partir de los datos de SAXS (Figura R49B). La D_{max} de los modelos es $191 \pm 1.7 \text{ \AA}$, si bien el 99.9% de las distancias inter-atómicas son menores de 175 \AA , que es próximo a la D_{max} determinada experimentalmente. Por tanto, a pesar de la variabilidad conformacional entre el SR5 y el SR6, los cuatro los modelos atómicos del SR3-SR6 reproducen satisfactoriamente los datos experimentales de SAXS de este fragmento. Las diferencias entre las estructuras atómicas son indistinguibles a la resolución de SAXS.

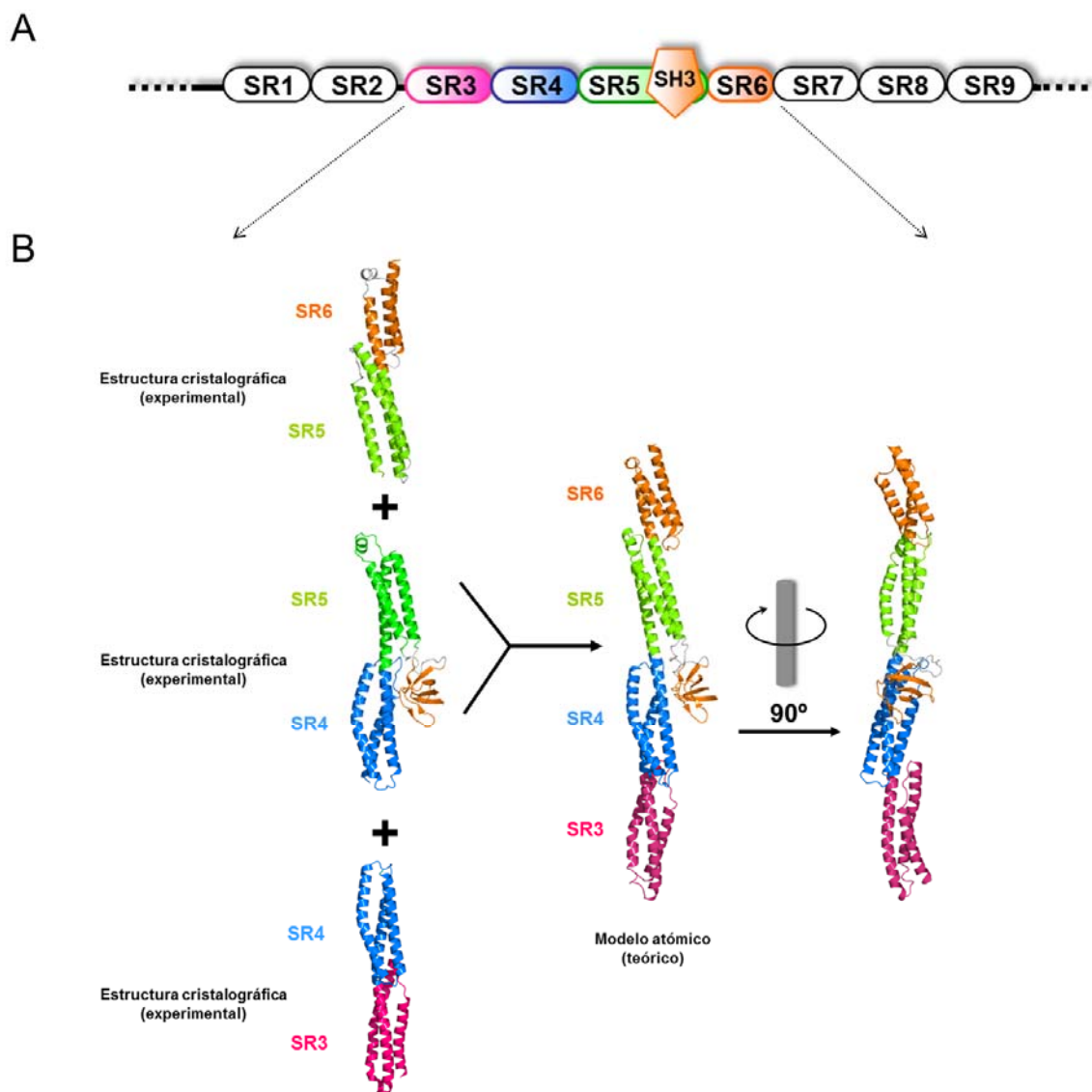


Figura R51.- Modelo atómico de la región SR3-SR6. (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina. La región para la cual se construyeron los modelos atómicos se corresponde con los sub-dominios SR3 (rosa), SR4 (azul), SH3 (naranja), SR5 (verde) y SR6 (naranja). (B) Estructuras cristalográficas de los fragmentos SR3-SR4, SR4-SR5 y SR5-SR6- Δ SH3-A/B que se utilizaron para construir los cuatro modelos del SR3-SR6.

Además, la superposición de los modelos construidos sobre las estructuras a baja resolución muestra un excelente ajuste, (Figura R52). Los cuatro SRs ocupan la estructura central del cilindro mientras que el dominio SH3 se corresponde con la protuberancia que sobresale en el lateral.

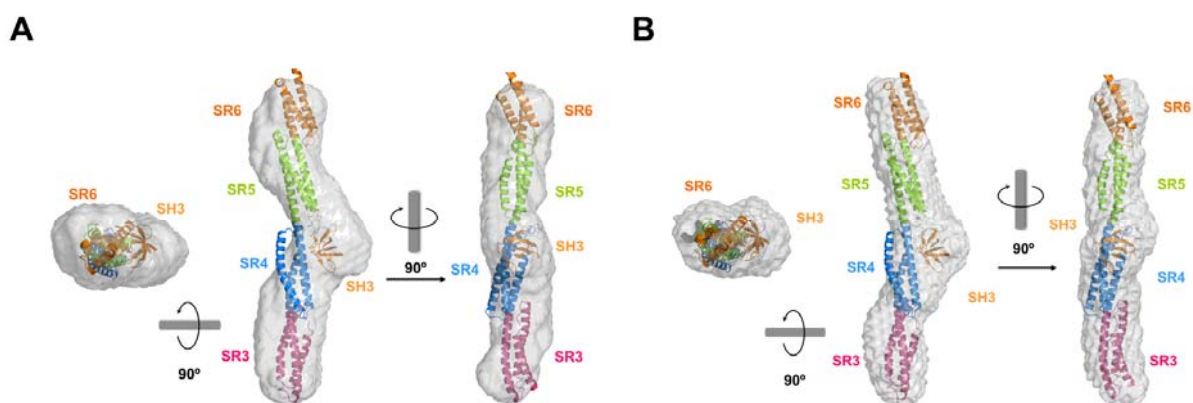


Figura R52.- Estructura de la región SR3-SR6 en solución y comparación con el modelo atómico. Tres vistas ortogonales de la superposición del modelo teórico del fragmento SR3-SR6 en las envueltas a baja resolución calculadas a partir de datos experimentales de SAXS con los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) (A) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000) (B).

En resumen, los modelos atómicos construidos a partir de estructuras cristalográficas, representan adecuadamente la estructura del SR3-SR6 en solución.

3.3.- Caracterización estructural de la región SR7-SR9 en solución.

Con el fin de estudiar la estructura en solución de la región C-terminal del dominio plakina, se analizó la región SR7-SR9 (residuos 1004-1372) mediante SAXS, para lo cual se midió el perfil de dispersión a tres concentraciones diferentes: 3.4, 6.8 y 13.6 mg/ml. Las muestras eran homogéneas, monodispersas y no se observó agregación entre las partículas en el rango de concentraciones analizadas. El perfil de dispersión experimental del fragmento SR7-SR9 extrapolado a dilución infinita se muestra en la Figura R53A. El R_g de esta molécula calculado a partir del análisis de Guinier es $39.4 \pm 3.6 \text{ \AA}$ (Tabla R21, Figura R53C), siendo un valor muy similar al determinado a partir de la $P(r)$, $43.0 \pm 2.9 \text{ \AA}$. La $P(r)$ se determinó usando datos en un rango del vector de dispersión entre 0.017 y 0.3 \AA^{-1} y presenta un máximo en torno a una distancia de 20 \AA y una larga cola hasta una distancia máxima (D_{max}) de 151 \AA (Figura R53B). La forma de esta $P(r)$ es similar a la determinada para los fragmentos SR3-SR5 y SR3-SR6 y es característica de moléculas alargadas. La masa molecular aparente de SR7-SR9 derivada del volumen excluido estimado a partir de los datos de SAXS es $41.9 \pm 0.3 \text{ kDa}$, un valor casi idéntico al de la masa molecular teórica calculado a partir de su secuencia (41.7 kDa), lo que confirma que este fragmento es un monómero en solución.

Capítulo 4

En la Figura R53D se representan los datos de SAXS mediante el gráfico de Kratky. Esta gráfica tiene una forma de campana invertida y asimétrica que tiende a cero a valores de q cercanos a 0.3 \AA^{-1} . Esta forma es propia de proteínas que tienen un correcto plegamiento, lo que indica que el SR7-SR9 en solución muestra una estructura compacta sin la presencia de regiones desordenadas.

Tabla R21.- Parámetros estructurales de la región SR7-SR9.

	R_g^b	R_g^c	Dmax	Volumen de Porod	Peso molecular
SAXS ^a	$39.4 \pm 3.6 \text{ \AA}$	$43.0 \pm 2.9 \text{ \AA}$	151 \AA	69529 \AA^3	$41.9 \pm 0.3 \text{ kDa}$
Estructura cristalográfica	42.2 \AA^d		161 \AA^d		41.7 kDa

^a Parámetros estructurales determinados a partir de los datos experimentales de SAXS
^b Estimación a partir de la aproximación lineal de Guinier
^c Estimación a partir de la $P(r)$
^d Calculado con el programa HYDROPRO.

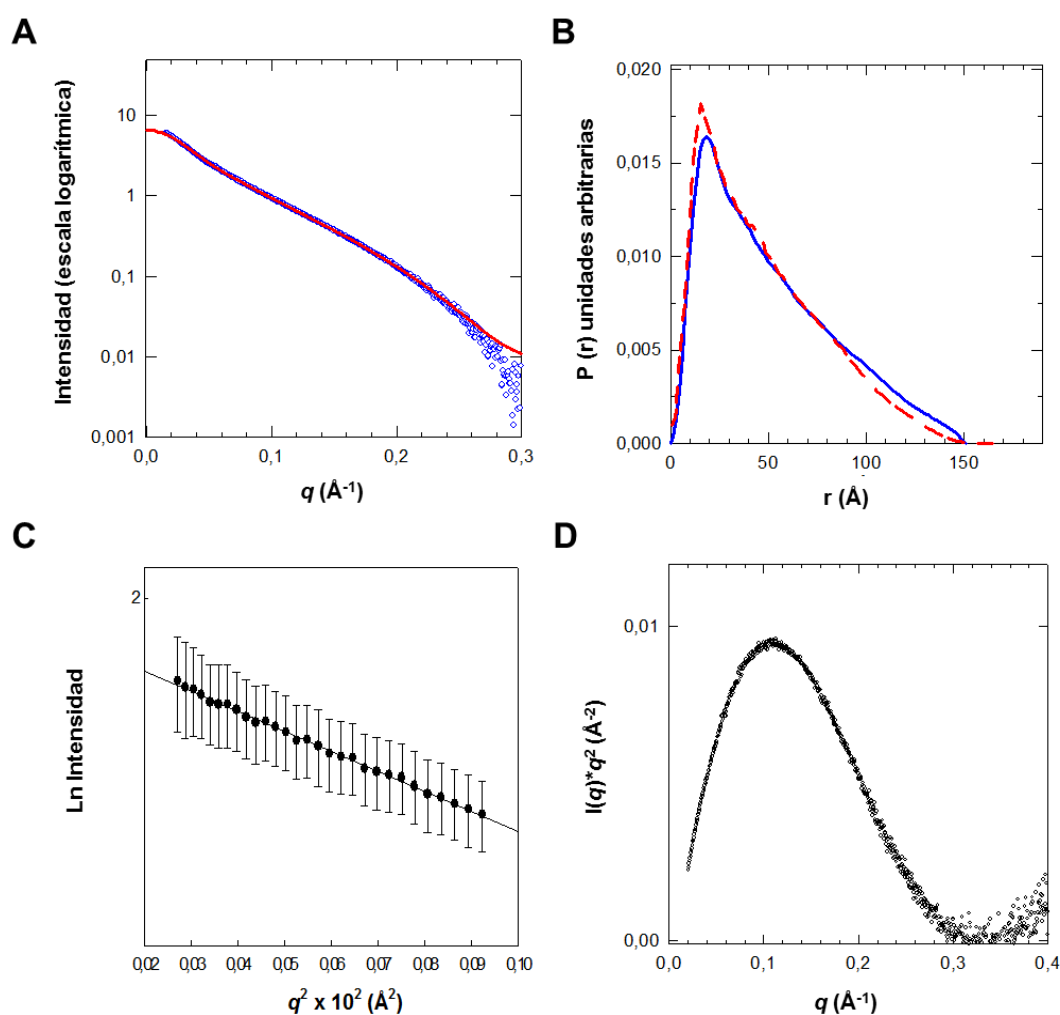


Figura R53.- Análisis mediante SAXS de la región SR7-SR9. (A) Perfil de dispersión experimental del fragmento SR7-SR9 para el rango de vector de dispersión de 0.01 a 0.30 Å⁻¹ (círculos azules). La línea roja corresponde al perfil de dispersión calculado a partir de la estructura cristalográfica de esta región. (B) Función de distribución de distancias inter-atómicas, $P(r)$, calculada a partir de los datos experimentales (línea continua azul) y $P(r)$ calculada a partir de la estructura cristalográfica (línea discontinua roja). (C) Gráfico de Guinier en el que se representan los datos experimentales en el rango $0.65 < qR_g < 1.20$ con sus barras de error. (D) Gráfico de Kratky calculado a partir de los datos de SAXS.

3.3.1.- Estructura de la región SR7-SR9 en solución a baja resolución.

A partir de los perfiles unidimensionales de SAXS de este fragmento, se construyeron modelos a baja resolución mediante métodos *ab initio* utilizando los programas de modelado DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000). Las 10 reconstrucciones independientes que generó cada programa son muy similares entre sí. El valor promedio de NSD de los modelos calculados con DAMMIF y DALAI_GA es 0.55 ± 0.02 y 0.56 ± 0.01 respectivamente. Los modelos promedio finales de cada programa son muy parecidos, representados por un valor

de NSD de 0.52 ± 0.01 . Por tanto, estos dos programas de modelado generan estructuras estables y muy similares entre sí.

La estructura a baja resolución de la región SR7-SR9 en solución revela una forma de cilindro alargado, con unas dimensiones de $\sim 151 \text{ \AA}$ de longitud y $\sim 30 \text{ \AA}$ de diámetro (Figura R54). Esta envuelta no muestra discontinuidades ni abultamientos y su forma alargada sugiere una disposición contigua y alineada de los tres SRs que la forman.

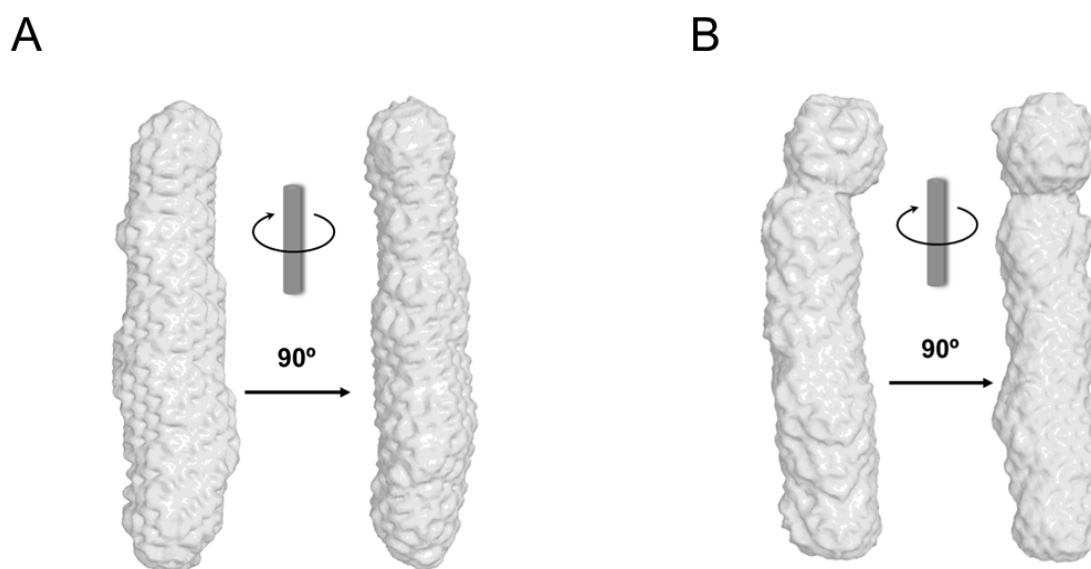


Figura R54.- Estructura a baja resolución de la región SR7-SR9 calculada a partir de los datos de SAXS. Envueltas de las estructuras promedio calculadas con los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) (A) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000) (B).

3.3.2.- Comparación de la estructura cristalográfica y la estructura derivada de los datos de SAXS de la región SR7-SR9.

El perfil teórico de SAXS calculado a partir de la estructura cristalográfica del fragmento SR7-SR9 es prácticamente idéntico al observado experimentalmente, mostrando un excelente ajuste ($\chi^2 = 0.12$) en el rango de vector de dispersión de 0.01 a 0.30 \AA^{-1} (Figura R53A). Así mismo la $P(r)$ teórica muestra una forma similar a la estimada a partir de los datos de SAXS (Figura 54B) y el valor del R_g calculado a partir de la estructura cristalográfica, 42.2 \AA , entra dentro del error experimental del R_g estimado a partir de los datos de SAXS (Tabla R21). El valor de la D_{max} de la estructura cristalográfica es 161 \AA , sin embargo, el 99.9 % de las distancias ocurren a $D < 146 \text{ \AA}$, un valor muy próximo al derivado a partir de los datos experimentales.

Por tanto, los parámetros estructurales del SR7-SR9 calculados a partir de la estructura cristalográfica coinciden con los estimados a partir del análisis mediante SAXS de esta proteína en solución.

Además, la superposición de la estructura cristalográfica del SR7-SR9 sobre las estructuras a baja resolución muestra una gran similitud entre ambas (Figura R55). Los tres sub-dominios de la estructura cristalográfica ocupan la envuelta obtenida a partir de los datos de SAXS.

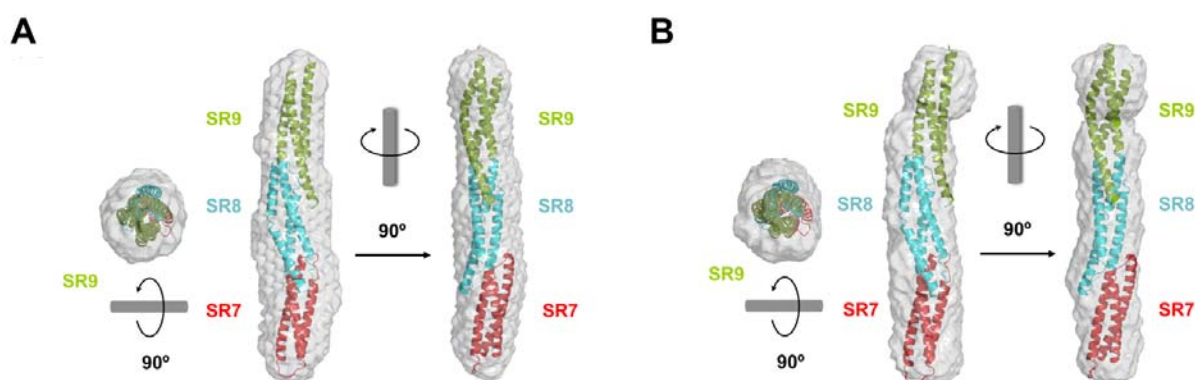


Figura R55.- Estructura de la región SR7-SR9 en solución y comparación con la estructura cristalográfica. Tres vistas ortogonales de la superposición de la estructura cristalográfica del SR7-SR9 en las enveltas a baja resolución calculadas a partir de datos experimentales de SAXS con los programas DAMMIF (A) y DALAI_GA (B).

En resumen, existe una excelente concordancia entre la estructura cristalográfica y la estructura en solución de esta región, la cual se asemeja a una varilla rígida.

3.4.- Caracterización estructural de la región SR6-SR9 en solución.

Con el fin de analizar la disposición del SR6 con respecto a la región C-terminal se analizó el fragmento SR6-SR9 mediante SAXS. Se midió el perfil de dispersión del fragmento SR6-SR9-B (residuos 614-1372) a tres concentraciones, 1.9, 3.9 y 7.8 mg/ml, y se extrapoló a dilución infinita (Figura R56A). La $P(r)$ de este fragmento se determinó usando datos experimentales en un rango de vector de dispersión q entre 0.014 y 0.30 \AA^{-1} . Esta $P(r)$ muestra un máximo a una distancia de $\sim 30 \text{\AA}$ y una larga cola extendida hasta una distancia máxima (D_{max}) de 195 \AA (Figura R56B). De nuevo, la forma de esta $P(r)$ indica que esta molécula es alargada.

Capítulo 4

El R_g del SR6-SR9-B estimado a partir de la $P(r)$ es $56.5 \pm 5.9 \text{ \AA}$, mientras que el calculado a partir de la aproximación lineal de Guinier es $49.3 \pm 7.9 \text{ \AA}$ (Figura R56C, Tabla R22). Posiblemente, estas diferencias entre los valores sean debidas al rango de vector de dispersión que cada aproximación utiliza para derivar el valor del R_g . Por un lado, en la aproximación por Guinier se utilizan los datos experimentales de muy bajo ángulo ($q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$). En este caso, a alta concentración se observa un ligero aumento de la intensidad en regiones de muy bajo ángulo (Figura R57). A pesar de que el gráfico de Guinier sigue siendo lineal para esta región (Figura R57), se observa una ligera desviación en la pendiente de la recta, lo que parece indicar la presencia de fuerzas atractivas entre las moléculas, por lo que es probable que el valor del R_g obtenido por esta aproximación no sea del todo preciso. Por otro lado, en la estimación del R_g a partir de $P(r)$, se utiliza todo el rango de vector de dispersión q . En este caso, el efecto de la interacción entre las partículas tiene menor influencia, por lo que el R_g calculado a partir de la $P(r)$ estaría menos afectado por una ligera agregación y su valor sería más preciso.

La masa molecular aparente del SR6-SR9-B correspondiente al volumen excluido calculado a partir de los datos de SAXS es $63.9 \pm 4.1 \text{ kDa}$, que es ligeramente superior al valor calculado a partir de la secuencia de aminoácidos, que es 55.2 kDa . A pesar de esta ligera discrepancia, estos datos indican que este fragmento es mayoritariamente un monómero en solución.

La representación de los datos de SAXS mediante el gráfico de Kratky, (Figura R56D) muestra una curva con forma de parábola asimétrica, que se aproxima a cero a valores medios y altos de q . La forma de este gráfico indica que el fragmento SR6-SR9-B tiene una estructura compacta en solución, sin la presencia de regiones desordenadas.

Tabla R22.- Parámetros estructurales de la región SR6-SR9-B.

	Rg ^b	Rg ^c	Dmax	Volumen de Porod	Peso molecular
SAXS ^a	49.3 ± 7.9 Å	56.5 ± 5.9 Å	195 Å	60000 Å ³	63.9 ± 4.1 kDa
Modelo	55.1 Å ^d		214 Å ^d		55.2 kDa

^a Parámetros estructurales determinados a partir de los datos experimentales de SAXS
^b Estimación a partir de la aproximación lineal de Guinier.
^c Estimación a partir de la P(r)
^d Calculado con el programa HYDROPRO.

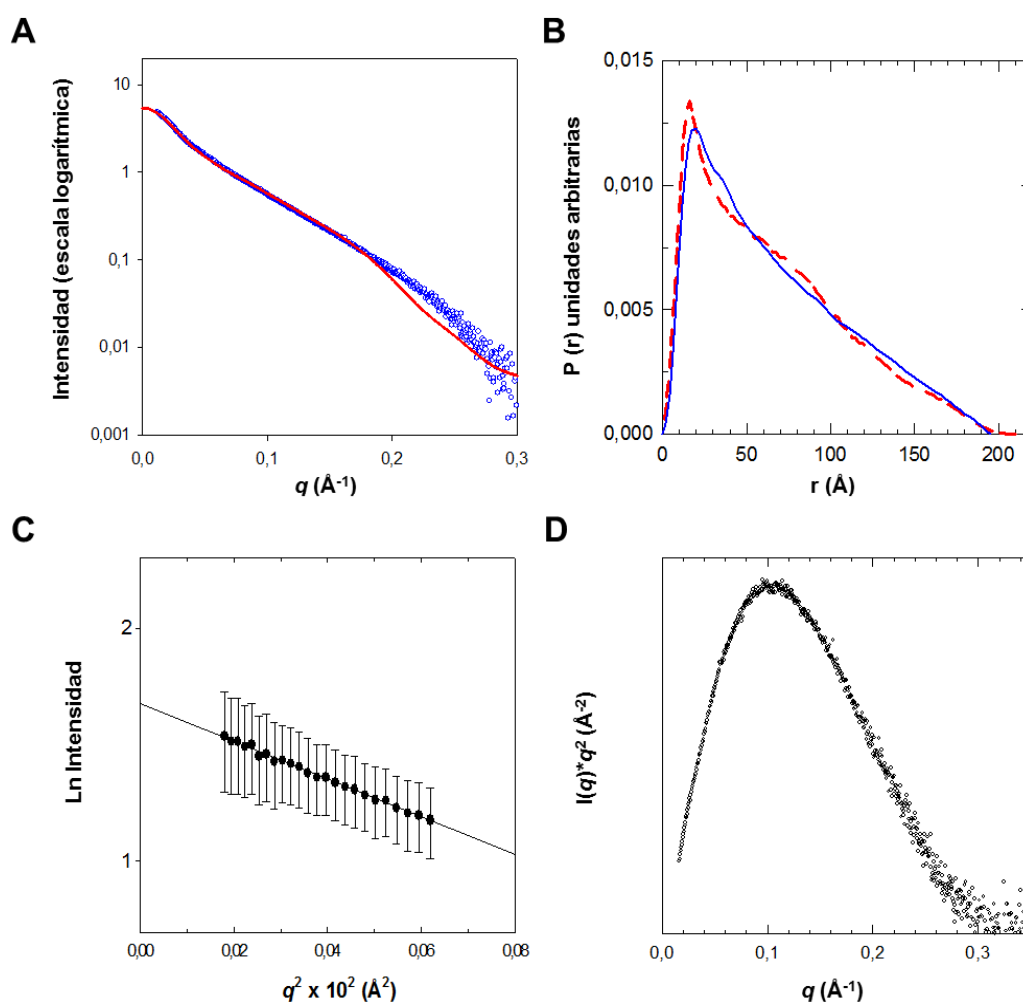


Figura R56.- Análisis mediante SAXS de la región SR6-SR9-B. (A) Perfil de dispersión experimental del fragmento SR6-SR9-B para el rango de vector de 0.014 a 0.30 Å⁻¹ (círculos azules). La línea roja corresponde al perfil de dispersión calculado a partir del modelo atómico de esta región. (B) Función de distribución de distancias inter-atómicas (P(r)) calculada a partir de los datos experimentales (línea azul continua) y P(r) calculada a partir de la estructura atómica (línea discontinua roja). (C) Gráfico de Guinier en el cual se representan los datos experimentales en el rango 0.66 < qRg < 1.23 con sus barras de error. (D) Gráfico de Kratky calculado a partir de los datos de SAXS.

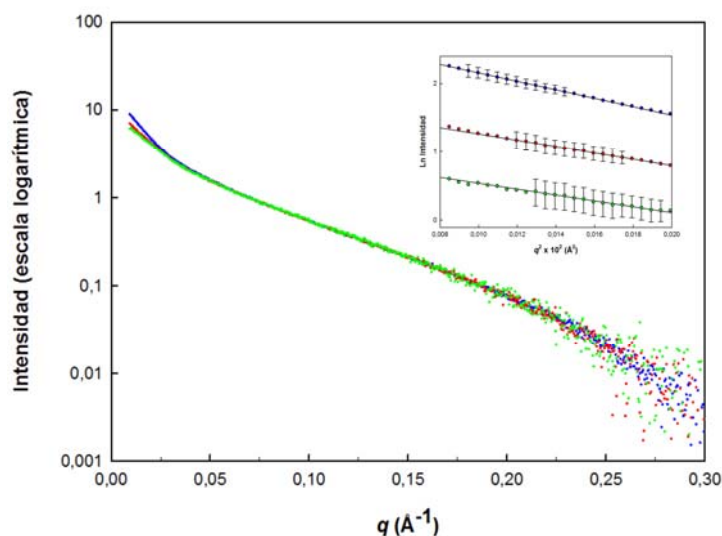


Figura R57.- Curvas de dispersión de rayos-x a bajo ángulo del fragmento SR6-SR9-B. Representación de las curvas de dispersión del fragmento SR6-SR9-B a tres concentraciones diferentes: a 7.8 (azul), 3.9 (rojo) y 20 mg/ml (verde) tras ser escaladas por la concentración. En el interior de la gráfica, se representan los datos de dispersión a bajo ángulo mediante un gráfico de Guinier para cada una de las curvas, en un rango de q de 0.008 a 0.02 Å. Se observa ligeras desviaciones en la pendiente de la curva de mayor concentración (azul) en comparación con las otras de menor concentración

3.4.1.- Estructura de la región SR6-SR9-B en solución a baja resolución.

Los datos experimentales de SAXS del fragmento SR6-SR9-B se emplearon para construir modelos a baja resolución mediante métodos *ab initio*, utilizando los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000). Se generaron 10 reconstrucciones independientes con cada programa. El valor promedio de NSD de los modelos calculados con DAMMIF y DALAI_GA es 0.69 ± 0.14 y 0.65 ± 0.07 respectivamente, lo que significa que cada programa genera reconstrucciones estables y estructuras similares. Las estructuras promedio de DAMMIF y DALAI_GA también son muy similares entre si, representado por un valor de NSD de 0.68 ± 0.05 . La estructura a baja resolución del SR6-SR9-B revela una forma de cilindro alargado con unas dimensiones de ~ 195 Å de longitud y ~ 30 Å de diámetro y muestra una cierta ondulación o serpenteo a lo largo del eje longitudinal de la estructura (Figura R58). La estructura de la región SR6-SR9 es 45 Å más larga que la estructura del SR7-SR9. Esta diferencia posiblemente se debe a la contribución del SR6 que se localizaría en uno de los extremos extendiendo la longitud total de la estructura.

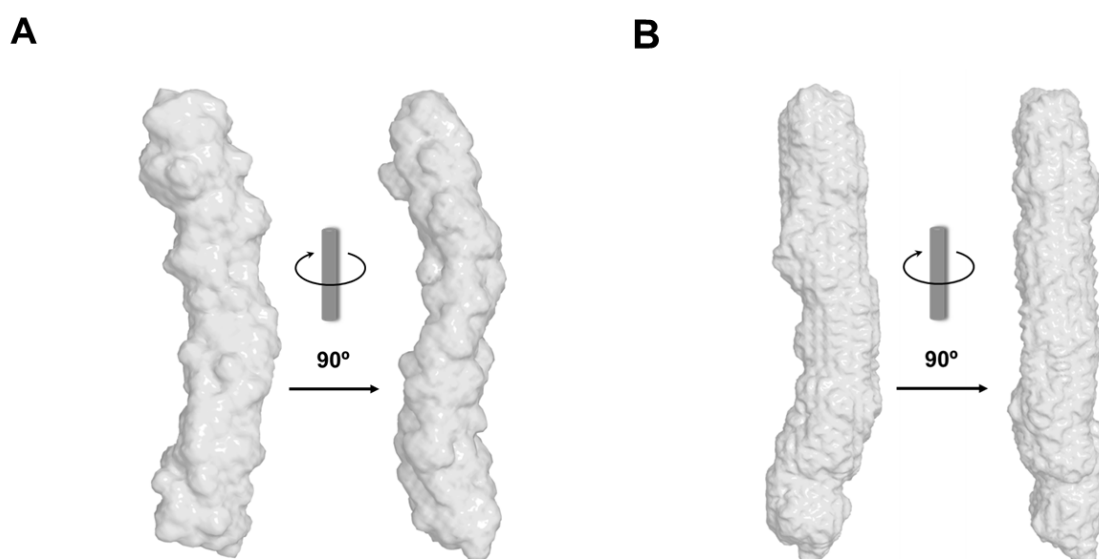


Figura R58.- Estructura a baja resolución de la región SR6-SR9-B calculada a partir de los datos de SAXS. Envueltas de las estructuras promediadas calculadas con los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) (A) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000) (B).

3.4.2.- Modelo atómico de la región SR6-SR9-B y comparación con la estructura derivada de los datos de SAXS.

El fragmento SR6-SR9-B se sometió a ensayos de cristalización, sin embargo no se obtuvieron cristales de este fragmento. A pesar de ello, se disponía de la estructura cristalográfica de varios fragmentos que componían esta región. Se construyó un modelo atómico del SR6-SR9-B a partir de la estructura cristalográfica del SR7-SR9 (aminoácidos 1004-1372), del SR7-SR8 (aminoácidos 1004-1233) y del SR6 (914-999) procedente de una de las estructuras cristalográficas de la región SR5-SR6. (Figura R59). Se desconoce la estructura de la región de cuatro aminoácidos (1000-1003) que une el SR6 al SR7. En base a la organización de otros pares de SRs del dominio plakina, es razonable pensar que estos dos sub-dominios también se unen a través de una α -hélice continua. Por esta razón, estos cuatro residuos se modelaron como una α -hélice ideal de poli-Ala que une la hélice C del SR6 y la hélice A del SR7. En resumen, este modelo consiste en cuatro SRs dispuestos de manera contigua en tándem, alineados con el eje longitudinal de la molécula, formando una estructura alargada.

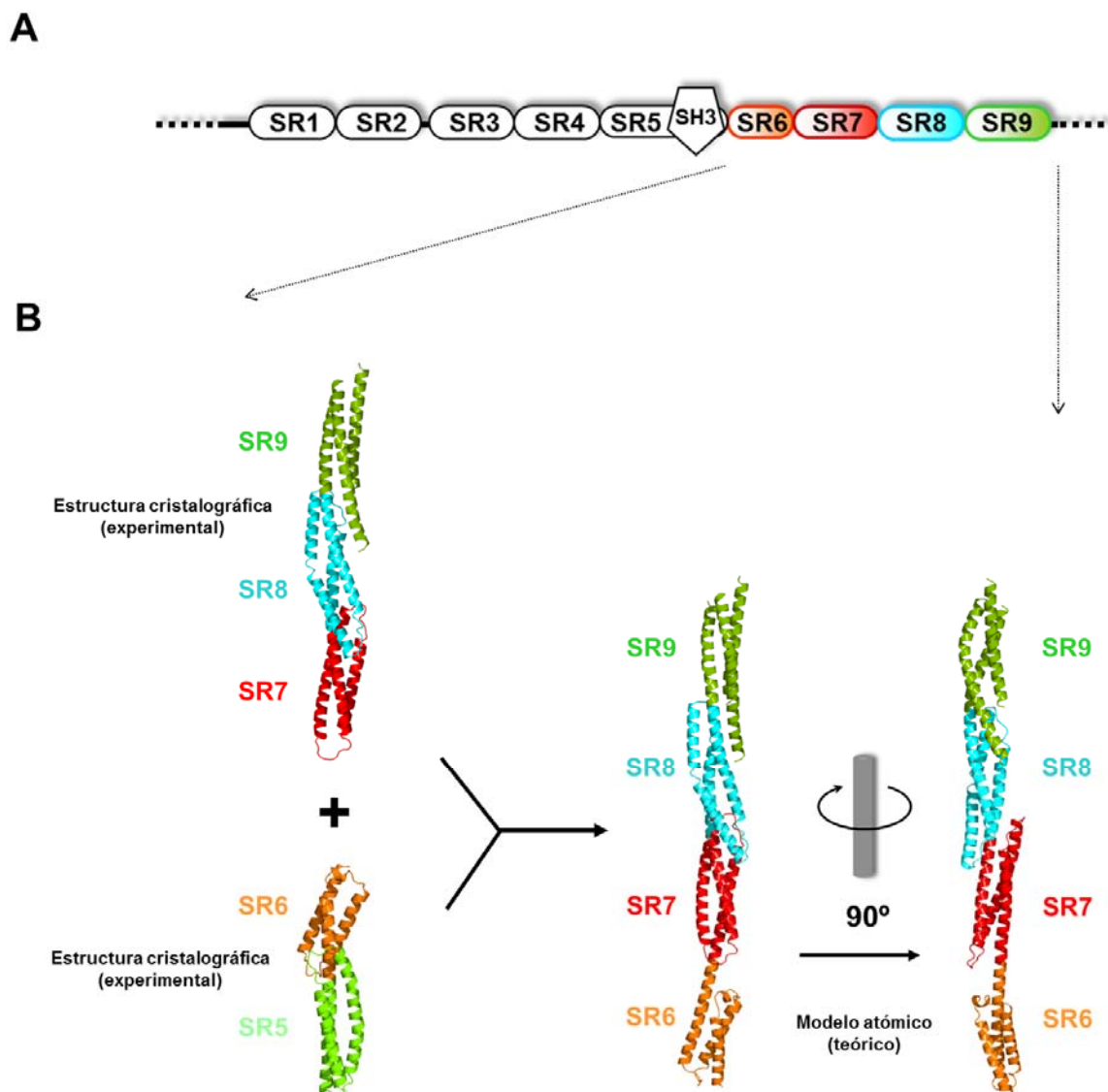


Figura R59.- Modelo atómico del fragmento SR6-SR9-B. (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina, la región para la cual se construyó el modelo atómico se corresponde con los sub-dominios SR6 (naranja), SR7 (rojo), SH8 (azul) y SR9 (verde). (B) Estructuras cristalográficas de los fragmentos SR5-SR6- Δ SH3 y SR7-SR9 que se utilizaron para construir el modelo SR6-SR9-B.

A partir de este modelo, se calculó el perfil de dispersión teórico, el cuál se ajusta al perfil experimental (Figura R56A). La $P(r)$ teórica reproduce la $P(r)$ experimental y presenta una distancia máxima (D_{max}) de 214 Å y un valor del radio de giro (R_g) de 55.1 Å. Además, la superposición del modelo atómico sobre la envuelta a baja resolución derivada a partir de los datos de SAXS muestra un buen ajuste entre ambas estructuras. (Figura R60). Únicamente pequeñas regiones de los extremos

de la molécula sobresalen de la envuelta de la estructura derivada de los datos de SAXS.

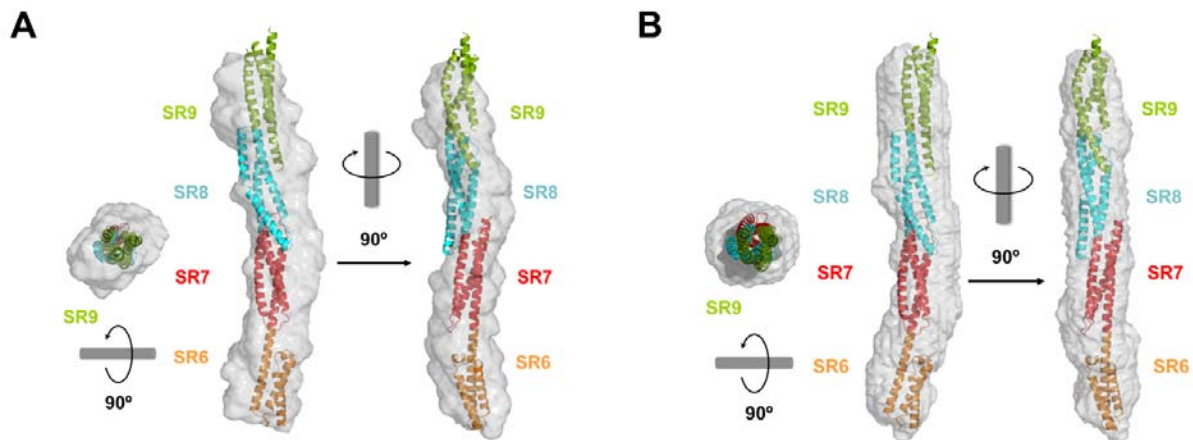


Figura R60.- Estructura de la región SR6-SR9-B en solución y comparación con el modelo atómico. Tres vistas ortogonales de la superposición del modelo teórico del fragmento SR6-SR9-B en las envoltas a baja resolución calculadas a partir de datos experimentales de SAXS con los programas DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) y DALAI_GA (Chacon et al, 2000).

3.5.- Caracterización estructural de la región SR3-SR9 en solución.

Por último se analizó la estructura en solución de la región SR3-SR9, que abarca todos los fragmentos descritos anteriormente. Para ello se midió el perfil de SAXS del fragmento 543-1372 a cuatro concentraciones diferentes: 1.1, 2.1, 4.3 y 8.6 mg/ml. Las muestras eran monodispersas, homogéneas y no se observó agregación en el rango de concentraciones analizadas. El perfil de dispersión experimental del fragmento SR3-SR9 se calculó por extrapolación a dilución infinita (Figura R61A). El R_g estimado a partir del análisis de Guinier es $94.2 \pm 20 \text{ \AA}$ (Tabla R23, Figura R61C), un valor que entra dentro del error experimental del R_g determinado a partir de la $P(r)$, $97 \pm 19 \text{ \AA}$. La $P(r)$ determinada usando datos en un rango de dispersión q entre 0.02 y 0.3 \AA^{-1} presenta un máximo en torno a una distancia de 20 \AA y una larga cola extendida hasta una distancia máxima (D_{max}) de 335 \AA (Figura R61B). Tal y como se ha observado en el análisis de otros fragmentos del dominio plakina, esta forma de la $P(r)$ es característica de moléculas alargadas.

La masa molecular aparente de SR3-SR9 es 92 kDa , un valor muy próximo al calculado a partir de su secuencia (97.5 kDa), lo que confirma el estado monomérico de este fragmento en solución. La representación de los datos de dispersión experimental mediante el gráfico de Kratky (Figura R61D), muestra una curva

asimétrica que tiende a cero a valores de q cercanos a 0.3; esta forma es característica de proteínas correctamente plegadas, lo que significa que el fragmento SR3-SR9 tiene una estructura compacta en solución sin regiones significativamente desordenadas.

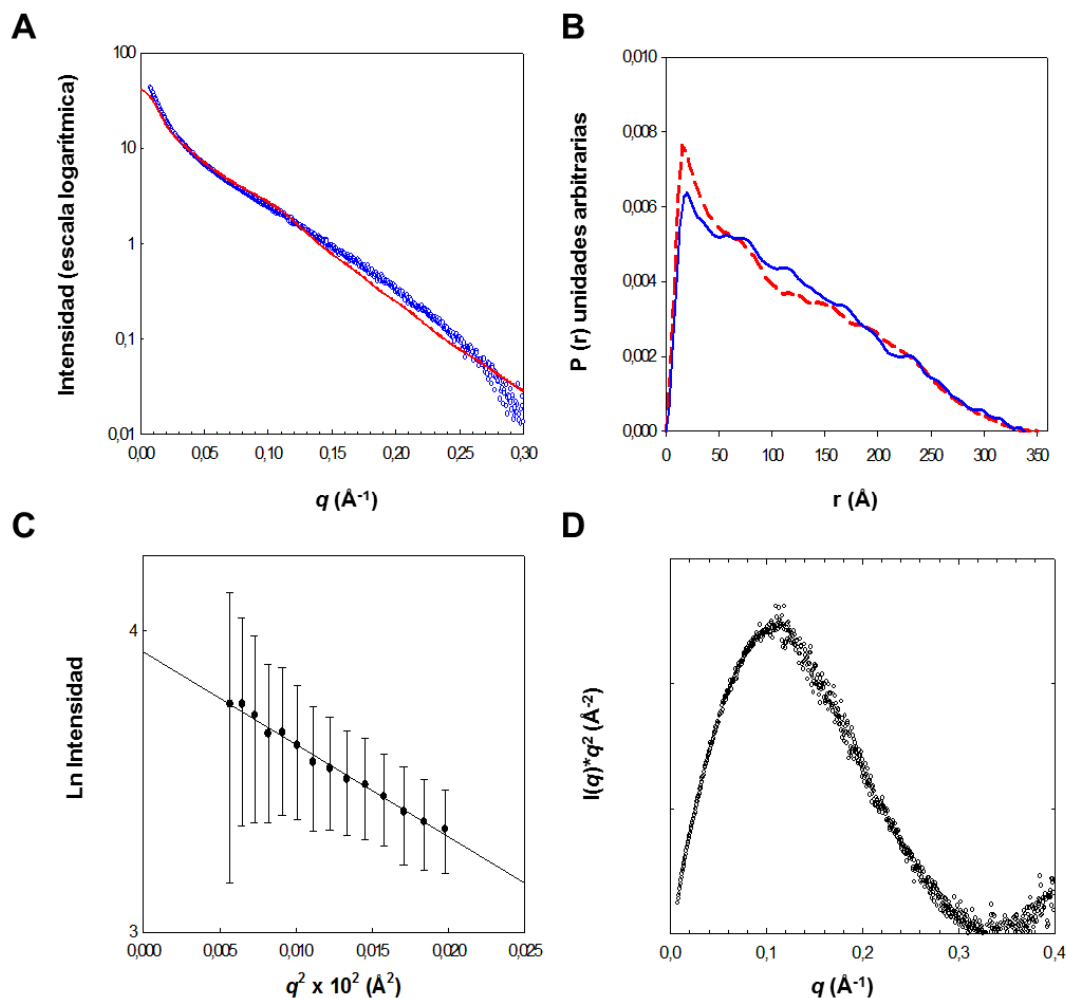


Figura R61.- Análisis mediante SAXS de la región SR3-SR9. (A) Perfil de dispersión experimental del fragmento SR3-SR9 para el rango de vector de 0.01 a 0.30 Å⁻¹ (círculos azules). La línea roja corresponde al perfil de dispersión calculado a partir de uno de los modelos atómicos. (B) Función de distribución de distancias inter-atómicas, $P(r)$, calculada a partir de los datos experimentales (línea discontinua azul) y a partir del modelo (línea roja discontinua). (C) Gráfico de Guinier en el que se representan los datos experimentales en el rango $0.7 < qR_g < 1.3$ con sus barras de error. (D) Gráfico de Kratky calculado a partir de los datos experimentales de SAXS.

Tabla R23.- Parámetros estructurales de la región SR3-SR9.

	Rg ^b	Rg ^c	Dmax	Volumen de Porod	Peso molecular
SAXS ^a	94.2 ± 20 Å	97 ± 19 Å	335 Å	142000 Å ³	92 ± N.D kDa
Modelo	93.2 ± 1.3Å ^d		343 ±2 Å		97.5 kDa

^a Parámetros estructurales determinados a partir de los datos experimentales de SAXS
^b Estimación a partir de la aproximación lineal de Guinier
^c Estimación a partir de la P(r)
^d Calculado con el programa HYDROPRO.

N.D. No determinado

3.5.1.- Estructura de la región SR3-SR9 en solución a baja resolución.

Los programas de modelado DALAI_GA y DAMMIF no generaron modelos estables del fragmento SR3-SR9 a partir de los datos experimentales de SAXS. Los modelos obtenidos no presentaban continuidad, mostraban huecos en su interior del modelo y eran muy diferentes entre sí.

Se combinó el modelado por métodos *ab initio* con un modelado de cuerpos rígidos utilizando las estructuras cristalográficas o modelos atómicos de los fragmentos que componen esta región: SR3-SR6; SR6-SR9 y SR7-SR9, junto con los perfiles de dispersión experimental de estos fragmentos. El programa BUNCH (Petoukhov & Svergun, 2005), utiliza estas estructuras como cuerpos rígidos y reconstruye los conectores que no se observan y construye un modelo con una conformación que mejor se ajuste a los datos experimentales. Sin embargo, en este caso, los resultados tampoco fueron satisfactorios, ya que en los modelos generados no situaban el extremo N-terminal de la región SR7-SR9 a continuación del extremo C-terminal de la región SR3-SR6. Además, ni el perfil teórico calculado para estos modelos se ajustaba al experimental, ni los parámetros teóricos y experimentales eran parecidos.

3.5.2.- Modelo atómico de la región SR3-SR9 y ajuste a los parámetros estructurales

Se construyeron modelos atómicos de la región SR3-SR9 a partir de las estructuras cristalográficas de los fragmentos SR3-SR4, SR4-SR5, SR5-SR6-ΔSH3-A/B y SR7-SR9. Las estructuras se ensamblaron tal y como se ha descrito para los modelos de

las regiones SR3-SR6 y SR6-SR9 (Figura R62). Se generaron cuatro modelos correspondientes a las cuatro conformaciones de la región SR5-SR6.

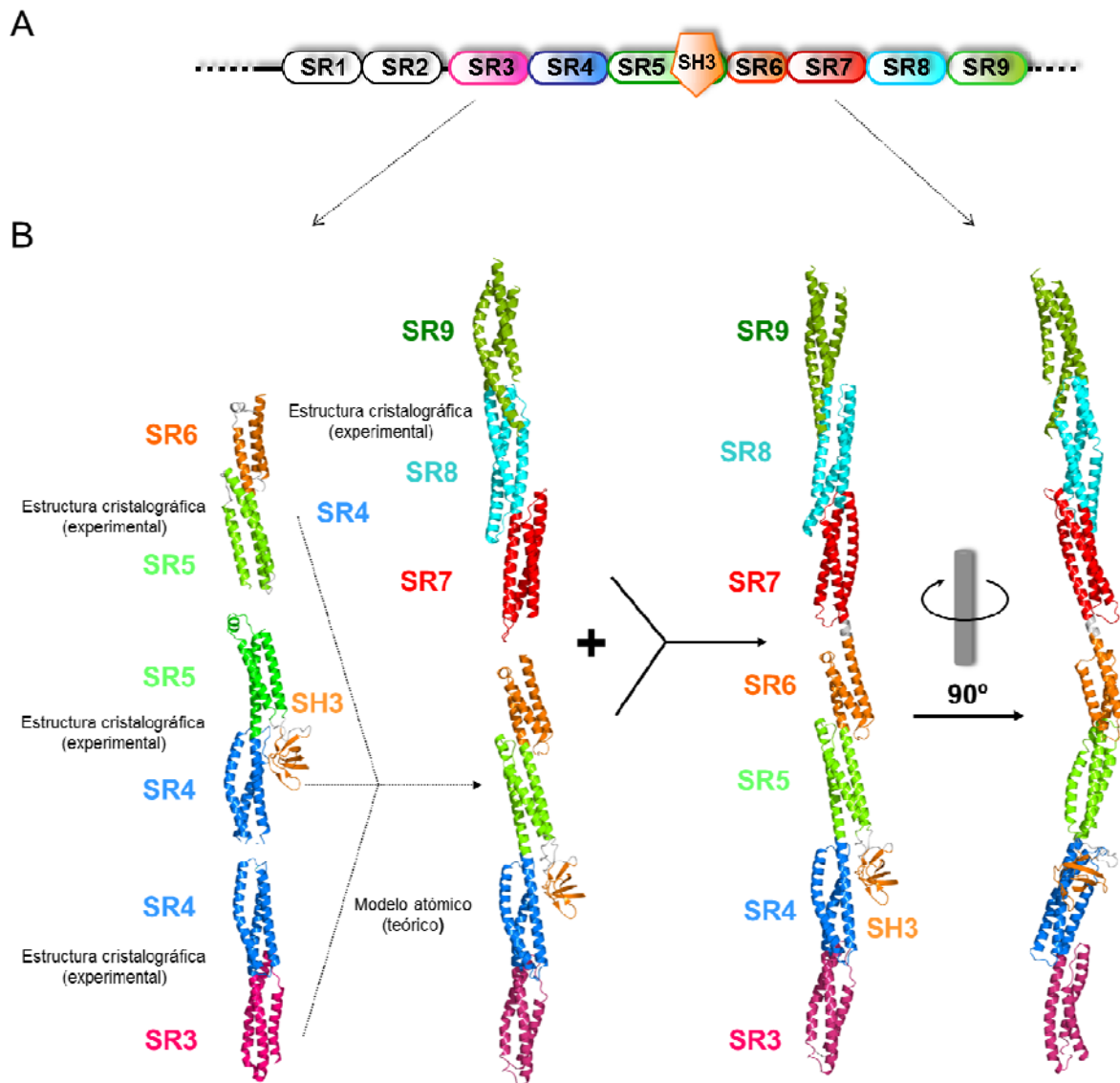


Figura R62.- Modelo atómico de la región SR3-SR9. (A) Representación esquemática del dominio plakina de plectina. La región para la cual se construyeron los modelos atómicos se corresponde con los sub-dominios SR3 (rosa), SR4 (azul), SH3 (naranja), SR5 (verde), SR6 (naranja), SR7 (rojo), SR8 (azul) y SR9 (verde). (B) Estructuras cristalográficas de los fragmentos SR3-SR4, SR4-SR5 y SR5-SR6- Δ SH3-A/B y SR7-SR9 que se utilizaron para construir los cuatro modelos del SR3-SR9.

Los modelos revelan una estructura extendida con ligeras ondulaciones. La comparación por superposición de los cuatro modelos, revela que las variaciones en la conformación del SR5 y SR6 dan lugar a variaciones de hasta 60 Å en la posición del extremo C-terminal del SR9 (Figura R63).

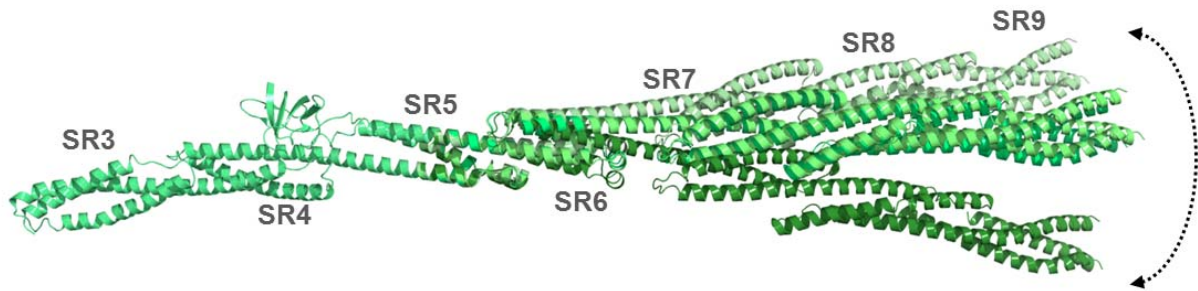


Figura R63.- Superposición de los cuatro modelos atómicos de la región SR3-SR9.- (A). Los cuatro modelos de la región SR3-SR9 se superponen en la posición de los C α de la cadena principal. Se observa una variabilidad conformacional en la región C-terminal de la molécula. El desplazamiento o variabilidad está representado por flechas discontinuas. Los cuatro modelos están representados en diferentes tonalidades de color verde.

El ajuste de estos perfiles teóricos de SAXS al perfil experimental ($\chi^2 = 0.3$) muestra moderadas desviaciones a muy bajo q y en la región de q 0.15-0.30 \AA^{-1} (Figura R61A). Las $P(r)$ calculadas a partir de los modelos son muy similares entre si y se caracterizan por un pico en torno a una distancia de 20 \AA y una larga cola que se extiende hasta una D_{max} de 343 ± 3 \AA (Figura R61B). Las $P(r)$ teóricas muestran una forma similar a la $P(r)$ experimental (Figura R61B). A pesar de que los modelos no reproducen completamente los datos experimentales de SAXS de este fragmento, los parámetros experimentales (forma de la $P(r)$, $D_{\text{máx}}$, R_g) indican que la región SR3-SR9 tiene una estructura alargada, con unas dimensiones muy similares a las calculadas para los modelos. Es posible que las pequeñas discrepancias observadas entre los modelos teóricos y los datos experimentales se deban a la existencia de flexibilidad en uno o varios puntos de la molécula.

4.- ANALISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DEL DOMINIO PLAKINA DE PLECTINA EN LA INTERACCIÓN CON LA INTEGRINA $\alpha 6\beta 4$.

Con el fin de determinar la contribución del dominio plakina a la interacción de plectina con la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$, se ha analizado la afinidad de una serie de fragmentos de plectina por fragmentos de $\beta 4$. La interacción entre las dos proteínas se ha caracterizado mediante un ensayo de fluorescencia que se había utilizado previamente para caracterizar la interacción primaria entre el ABD de plectina y primer par de dominios FnIII (FnIII-1,2) de la subunidad de integrina $\beta 4$ (de

Pereda et al, 2009a). En este método se utilizan fragmentos de plectina en los que se introduce la sustitución G162C, que se marcan específicamente en el grupo sulfhidrilo con la sonda fluorescente 1,5-I-AEDANS. El residuo G162C está ubicado en la hélice G del sub-dominio CH1 del ABD de plectina, cerca de la superficie de interacción con $\beta 4$, si bien este residuo no participa directamente en la superficie de unión. La sonda no interfiere en la interacción de plectina con $\beta 4$, sin embargo, su entorno cambia al unirse $\beta 4$, produciendo un aumento de la fluorescencia que permite seguir la formación del complejo.

4.1.- Fragmentos de plectina empleados en la caracterización de la interacción con la integrina $\beta 4$.

Se generó una colección de cuatro fragmentos de plectina que contienen el ABD y regiones crecientes del dominio plakina: ABD-SR1, ABD-SR2, ABD-SR3 y ABD-SR4 (Figura R64, Tabla R24). Además, se empleó también el ABD aislado, que corresponde al sitio primario de unión a $\beta 4$ (Geerts et al, 1999). Estos fragmentos se clonaron en el vector pETEV15b, de forma similar a como se crearon el resto de las construcciones de plectina. Una vez clonados en este vector, todas las Cys presentes (C420, C620, C738, C739, C740) se sustituyeron por Ala y G162 se sustituyó por una Cys mediante mutagénesis dirigida.

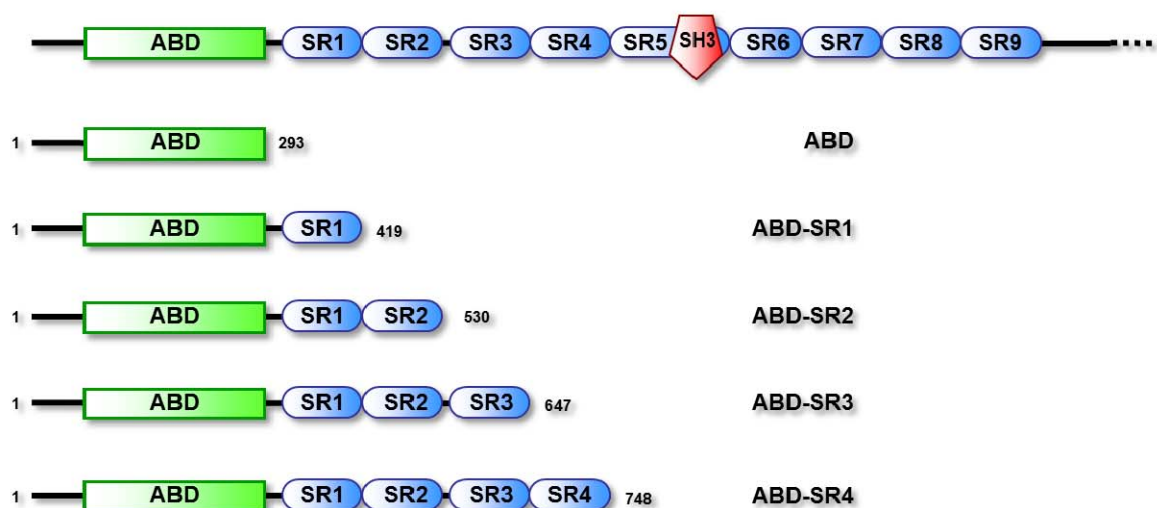


Figura R64.- Colección de fragmentos recombinantes de plectina empleados en el estudio de la interacción con la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$.

Tabla R24.- Parámetros de los fragmentos de plectina utilizados para el análisis de la interacción con la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$.

Fragmento	Límites de secuencia ^a	Nº de aminoácidos ^b	Peso molecular teórico ^c (Daltons)
ABD	1-293	297	33.459
ABD-SR1	1-419	423	48.665
ABD-SR2	1-530	534	61.228
ABD-SR3	1-647	651	74.515
ABD-SR4	1-748	752	86.257

^a La numeración corresponde a la variante 1C de plectina.
^b Las proteínas contienen en su extremo amino la secuencia adicional GSHM.
^c Los valores se han calculado a partir de su secuencia de aminoácidos. Todas las Cys presentes en estos fragmentos se mutaron a Ala y se introdujo la sustitución G162C.

De los cinco fragmentos: ABD; ABD-SR2 y ABD-SR4 se expresan como proteínas solubles en *E.coli*, se purificaron mediante cromatografía de afinidad y se marcaron con la sonda 1,5-I-AEDANS. En cambio, los fragmentos ABD-SR1 y ABD-SR3 se expresan como proteínas insolubles, por lo que no se emplearon en los estudios de la interacción con $\beta 4$.

4.2.- Fragmentos de la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$ empleados en la caracterización de la interacción con plectina.

La región citoplasmática de la integrina $\beta 4$ contiene cinco dominios globulares: un dominio Calx- β y cuatro dominios de fibronectina de tipo III (FnIII-1,4) que se organizan en pares, separados por una región que se denomina “segmento conector” (SC). Además, tras el FnIII-4 se extiende una cola C-terminal (CCT) de ~ 85 aminoácidos.

Para el análisis de la interacción con plectina, se empleó por un lado el fragmento 1126-1355 que contiene el primer par de dominios de FnIII (FnIII-1,2) y la región N-terminal del SC (FnIII-1,2-SC). Este fragmento se había empleado para la caracterización estructural y funcional de la interacción con el ABD de plectina (de Pereda et al, 2009a). Además se generaron cuatro nuevos fragmentos de la región citoplasmática de $\beta 4$ (Figura R65, Tabla R25). El primero de estos fragmentos contiene el FnIII-1,2, el SC y el segundo par de dominios de FnIII (FnIII-3,4). Otros dos de los fragmentos, FnIII-1,4-CCT-A (aminoácidos 1126-1710) y FnIII-1,4-CCT-B (aminoácidos 1126-1731), contienen además parte de la cola C-terminal. Por último, el fragmento FnIII-1,4-CCT-C incluye la cola C-terminal íntegra.

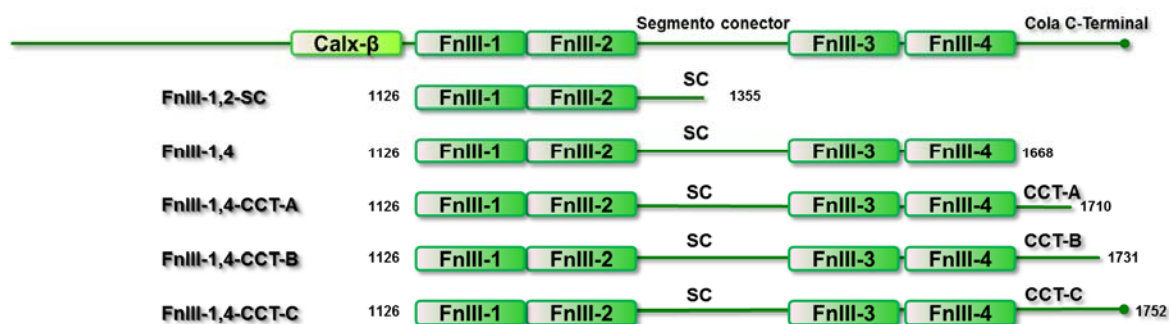


Figura R65.- Colección de fragmentos de la integrina $\beta 4$. En la parte superior se muestra de forma esquemática la estructura de la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$. El fragmento FnIII-1,2-SC (aminoácidos 1126-1355) corresponde al sitio primario de unión a plectina.

Tabla R25.- Parámetros de los fragmentos de la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$ utilizados para el ensayo de interacción con plectina.

Fragmento	Límites de secuencia	Nº de aminoácidos ^a	Peso molecular teórico ^b (Daltons)
FnIII-1,2-SC	1126-1355	234	26.037
FnIII-1,4	1126-1668	547	60.105
FnIII-1,4-CCT-A	1126-1710	589	64.518
FnIII-1,4-CCT-B	1126-1731	610	66.750
FnIII-1,4-CCT-C	1126-1752	631	69.120

^a Las proteínas contienen en su extremo amino la secuencia adicional GSHM.
^b Los valores se han calculado a partir de la secuencia de aminoácidos.

Los fragmentos FnIII-1,2-SC; FnIII-1,4; FnIII-1,4-CCT-A y FnIII-1,4-CCT-B se expresan solubles en *E.coli*. En cambio, el fragmento FnIII-1,4-CCT-C que se expresa insoluble, por lo que se purificó en condiciones desnaturizantes y posteriormente se replegó.

4.3.-Análisis de la interacción de plectina con $\beta 4$.

La constante de disociación de la interacción entre el ABD de plectina (aminoácidos 1-293) y la región FnIII-1,4 (aminoácidos 1126-1668) de $\beta 4$, $K_d = 25 \pm 3 \mu M$, es muy similar a la descrita entre el ABD y el FnIII-1,2-SC (aminoácidos 1126-1355), $K_d = 31 \pm 1 \mu M$ (Tabla R26) (de Pereda et al, 2009a). Estos datos sugieren que el ABD de plectina interacciona exclusivamente con el sitio primario de $\beta 4$ y que el segundo par de dominios FnIII de $\beta 4$ no contribuye a la interacción con esta región de plectina.

Con el fin de determinar si otras regiones de plectina interaccionan con el sitio primario en $\beta 4$, se analizó la interacción de la región FnIII-1,2-SC de $\beta 4$ con los fragmentos de plectina ABD-SR2 (1-530) y ABD-SR4 (1-748). Los valores de la K_d determinada con estos dos fragmentos, $23 \pm 3 \mu\text{M}$ y $22 \pm 2 \mu\text{M}$, son muy similares a los observados con el ABD aislado. Por lo tanto el sitio primario de unión en $\beta 4$ interacciona exclusivamente con el ABD de plectina. En resumen, las regiones de plectina y $\beta 4$ implicadas en el sitio primario de unión no interaccionan con regiones adicionales.

Tabla R26.- Afinidad de fragmentos de plectina 1C por fragmentos de la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$.

	K_d (μM)		
	ABD 1-293	ABD-SR2 1-530	ABD-SR4 1-748
FnIII-1,2-SC 1126-1355	31 ± 4	23 ± 3	22 ± 1
FnIII-1,4 1126-1668	25 ± 3	35 ± 5	33 ± 5
FnIII-1,4-CCT-A 1126-1710	N.D	N.D	30 ± 3
FnIII-1,4-CCT-B 1126-1731	N.D	N.D	45 ± 5
FnIII-1,4-CCT-C 1126-1752	N.D	N.D	N.D

N.D.- No determinado

Seguidamente se analizó si otras regiones de plectina y $\beta 4$, adicionales a las implicadas en el sitio primario, contribuyen a la interacción. Para ello, se examinó la interacción de los fragmentos de plectina ABD-SR2 (1-530) y ABD-SR4 (1-748) con los fragmentos de $\beta 4$ que incluyen el SC completo, los dominios FnIII-3,4 y en su caso regiones crecientes de la cola C-terminal (CCT). Los valores de la K_d de la interacción del fragmento FnIII-1,4 de $\beta 4$ con los fragmentos ABD-SR2 y ABD-SR4, $35 \pm 5 \mu\text{M}$ y $33 \pm 5 \mu\text{M}$ respectivamente, son muy similares al observado en la interacción con el ABD aislado. Por lo tanto, los cuatro primeros SRs del dominio plakina no contribuyen a la interacción con el segmento conector ni con los dominios FnIII-3,4 de $\beta 4$.

Capítulo 4

Para estudiar la contribución de la cola C-terminal de $\beta 4$ en la interacción con plectina, se analizó la afinidad del fragmento de plectina de mayor tamaño (ABD-SR4) por fragmentos de $\beta 4$, que además de los 4 dominios FnIII contienen parte de la cola C-terminal: FnIII-1,4-CCT-A (1126-1710) y FnIII-1,4-CCT-B (1126-1731). Las K_d observadas para los fragmentos FnIII-1,4-CCT-A y FnIII-1,4-CCT-B son $30 \pm 3 \mu\text{M}$ y $45 \pm 5 \mu\text{M}$ respectivamente; estos valores son similares a los observados para los fragmentos que carecen de la cola C-terminal. Esto indica que la región 1669-1731 de la cola C-terminal no contribuye a la interacción con $\beta 4$. El fragmento FnIII-1,4-CCT-C de $\beta 4$ (1126-1752), que contiene la cola C-terminal íntegra, no mostró afinidad detectable por $\beta 4$. Es posible que el proceso de re-plegado realizado durante la purificación de este fragmento, de lugar a una proteína inactiva a pesar de ser soluble y aparentemente estable.

En conjunto, estos resultados indican que los cuatro primeros SRs del dominio plakina de plectina, no interaccionan con regiones de la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$ localizadas mas allá del sitio primario de interacción.

DISCUSIÓN

Hasta el comienzo de esta tesis, la única información estructural disponible de este dominio, se limitaba a la estructura cristalográfica del primer par de SRs (SR1-SR2) del dominio plakina de plectina (Sonnenberg et al, 2007) y la estructura del par SR3-SR4 del dominio plakina de BPAG1 (Jefferson et al, 2007).

1.- Estructura de la región central del dominio plakina.

La región central del dominio plakina está formada por cuatro sub-dominios o SRs (SR3-SR6). Modelos atómicos de esta región construidos a partir de las estructuras cristalográficas de los fragmentos SR3-SR4, SR4-SR5, SR5-SR6- Δ SH3, revelan una estructura con forma de varilla, con unas dimensiones de ~ 170 Å de longitud y ~ 20 - 25 Å de ancho. Esta estructura está en concordancia con datos experimentales de SAXS determinados para el fragmento SR3-SR6. Por lo tanto los modelos atómicos de la región SR3-SR6 proporcionan una representación fidedigna de la estructura de esta región en solución.

Además de los cuatro SRs, esta región incluye un dominio SH3, que aparece insertado entre las hélices B y C del SR5. La estructura del SR4 y el SR5 es muy similar en los fragmentos que incluyen el dominio SH3 (SR4-SR5), como en aquellos que no contienen este dominio (SR3-SR4 y SR5-SR6- Δ SH3). Por lo tanto, el dominio SH3 no es necesario para la integridad y estabilidad de los SR individuales.

Tras la publicación de nuestros resultados sobre la estructura de la región SR3-SR5 de plectin, un estudio realizado por *Choi* ha revelado la estructura cristalográfica de la región SR3-SR6 de desmoplakina (Choi & Weis, 2011). A nivel de los sub-dominios que forman esta región, la estructura de los SRs y del SH3 de desmoplakina es muy similar a la de plectina (Tabla D1). Además de la similitud estructural de cada SR individual, la organización de los sub-dominios en la región SR3-SR6 desmoplakina es muy similar a la observada en plectina (Figura D1, D2). En resumen, la conservación de la estructura observada entre plectina y desmoplakina en la región SR3-SR6 sugiere que la estructura del dominio plakina de plectina, elucidada en este trabajo, sirve de referencia para las estructuras de esta región en otros miembros de la familia.

Tabla D1. Comparación individual de SRs y SH3 de plectina y desmoplakina.

	SR3	SR4	SR5	SH3	SR6
rmsd	1.6 Å	1.2 Å	1.3 Å	1.6 Å	1.0 Å
Num de C α superpuestos	91/100 (91%)	105/106 (99%)	94/96 (98%)	68/71 (95%)	79/80 (99%)

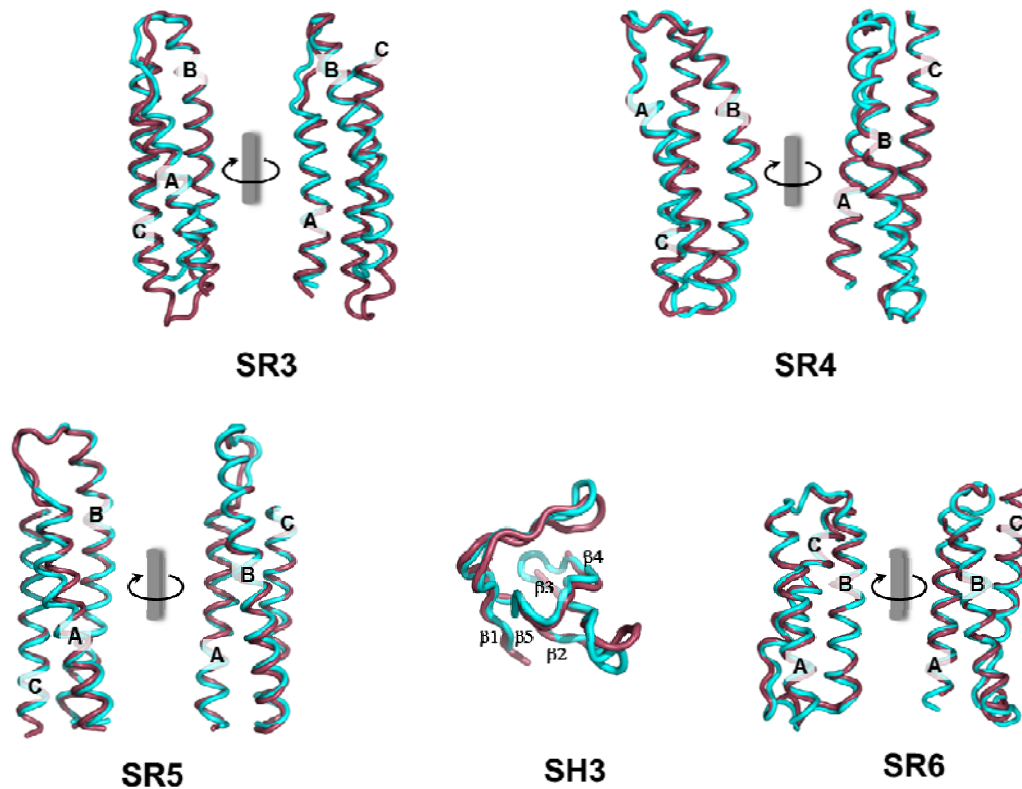


Figura D1.- Comparación de las estructuras individuales de los SRs en plectina y desmoplakina.- Dos vistas ortogonales de la superposición de las estructuras individuales del SR3, SR4, SR5, SR6 y el dominio SH3 de plectina (morado) y de desmoplakina (azul)(código PDB:3R6N). En plectina, se utilizó la estructura del SR4 y SR5 de los fragmentos SR4-SR5 y SR5-SR6- Δ SH3-A respectivamente.



Figura D2.- Comparación de la estructura de la región SR3-SR6 de plectina y desmoplakina.- Superposición de la estructura del SR3-SR6 de desmoplakina (verde)(código PDB:3R6N) y el modelo atómico de la región SR3-SR6 de plectina (rosa)

1.1.- El dominio SH3 de plectina.

1.1.1.- El pseudo-sitio de unión a ligando del SH3 de plectina está alterado.

La presencia de un dominio SH3 insertado en mitad de un grupo de SRs en el dominio plakina resulta de interés, ya que estos dominios a menudo median interacciones proteína-proteína. Los dominios SH3 generalmente reconocen ligandos ricos en Pro que contienen una secuencia PxxP y que forman una hélice de poli-Pro de tipo II. El posible sitio de unión a ligando del dominio SH3 de plectina muestra marcadas diferencias estructurales respecto al de los dominios SH3 canónicos. En el dominio SH3 de plectina, las posiciones equivalentes de los residuos que forman parte del sitio de unión a ligando ricos en PxxP en los dominios SH3 canónicos, están ocupados por otros residuos de cadena lateral más corta, lo que compromete el reconocimiento de este tipo de ligando. Por tanto, la estructura del dominio SH3 de plectina no es compatible con su unión a ligandos ricos en Pro. Estos aminoácidos presentes en el bolsillo de unión de plectina, están también presentes en otras plakinas de mamíferos y de invertebrados, lo que sugiere que ninguno de ellos reconoce ligandos con secuencias ricas en Pro, o al menos no lo hace de manera canónica. Hasta la fecha, no se ha identificado ningún ligando rico en Pro que interactúe con el dominio SH3 de plectina, ni con el de otras plakinas. Por tanto, en plakinas nos referimos a esta región como un pseudo-sitio de unión a poli-Pro.

Algunos dominios SH3 establecen interacciones proteína-proteína a través de mecanismos alternativos, incluyendo la unión a dominios con secuencias no ricas en Pro o a dominios globulares a través de contactos ternarios, y algunas de estas interacciones incluyen regiones del dominio SH3 diferentes de los bolsillos de unión a ligandos PxxP (Kaneko et al, 2008). Por tanto, es posible que el dominio SH3 de plectina pueda mediar o contribuir a la asociación con otras proteínas a través de mecanismos de unión en los que no intervengan regiones con secuencias PxxP.

La estructura cristalográfica del SR4-SR5 de plectina revela que el pseudo-sitio de unión a ligando del dominio SH3 está implicado en la interacción con el SR4, lo que sugiere que éste ha evolucionado para estabilizar este contacto intra-molecular. Los residuos que forman parte de la interacción entre el SH3 y el SR4 están también presentes en posiciones equivalentes en otras plakinas, lo que apunta a una posible

interacción similar en otras plakinas. La interacción SR4/SH3 en otras plakinas diferentes a plectina, se confirmó en la estructura cristalográfica de la región SR3-SR6 de desmoplakina. Por el contrario, existen diferencias entre plakinas y α -espectrinas, en lo que se refiere a los aminoácidos de α -espectrinas que ocupan posiciones equivalentes a los residuos que participan en la interacción SR4/SH3 en plectina. Las plakinas constituyen un grupo distinto dentro de la superfamilia de las espectrinas. El pseudo-sitio de unión del dominio SH3 y la superficie de interacción SR4/SH3 están extensamente conservados entre plakinas incluyendo las plakinas de nematodos e insectos, los cuales contienen un único gen plakina. Por tanto, el papel específico del SH3 de plakinas se adquirió muy pronto en el proceso de evolución, posterior a la separación de las espectrinas y plakinas; y la asociación SR4/SH3 se ha mantenido desde entonces, sugiriendo que pueda ser requerida para la arquitectura y función de las plakinas.

1.2.- La interfase SR4-SH3 incluye una agrupación de Cys, que sugiere un posible mecanismo Redox.

Una característica interesante de la superficie de interacción SR4/SH3, es la presencia de un grupo de tres cisteínas formado por C740, C840 y C882, que se disponen en el centro de la superficie de contacto. Además, C739 se localiza cerca de las tres Cys anteriores, en el borde de la interfase. C739 en el SR4 y C840 en el SH3 están a una distancia óptima para formar un puente disulfuro. Alternativamente, C840 podría también formar un puente disulfuro con la C740 del SR4. En ambos casos, estos puentes disulfuro unirían el SR4 al SH3.

Se desconoce la función de este conjunto de Cys. Sin embargo, se puede hipotetizar que en un ambiente reductor, como en las condiciones que se dan en el citosol, las Cys estarían reducidas, como se observa en la estructura cristalográfica. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, especies de oxígeno reactivo podrían inducir la formación de al menos un enlace disulfuro entre el SR4 y el SH3, lo que podría tener dos efectos. Por un lado, podría afectar a la afinidad de plectina por potenciales ligandos, debido a una disminución en la adaptabilidad conformacional de esta región. De manera similar, la oxidación de una Cys en el quinto dominio PRD, situado en la región C-terminal de plectina cerca del sitio de unión a filamentos

intermedios, reduce la afinidad por vimentina (Spurny et al, 2007). La forma reducida del quinto PRD tiene una conformación más relajada y por tanto, el sitio de unión a vimentina está más expuesto. En este caso, no solo las Cys del quinto PRD influyen en la afinidad de unión a vimentina, ya que las Cys del cuarto y sexto PRD parecen contribuir a esta unión.

En segundo lugar, el entrecruzamiento por puentes disulfuro podría reducir la flexibilidad de esta región del dominio plakina, aumentando así la estabilidad del dominio plakina.

Finalmente, C740 y C840 están altamente conservadas en la familia plakina, lo que sugiere que otras plakinas podrían estar sujetas también a una regulación Redox reversible. El papel de las plakinas durante el estrés oxidativo es aún desconocido, pero es posible que contribuyan al papel de protector celular contra el estrés que puedan sufrir las proteínas de los filamentos intermedios (Toivola et al, 2010).

1.3.- La similitud entre la interacción SR4/SH3 de plectina y el complejo ankirina- β -espectrina sugiere un posible modo preferente de interacción a través de SRs.

La región de plectina SR4-SR5 que incluye el dominio SH3 muestra llamativas similitudes con la estructura del complejo de la región SR13-SR14-SR15 de la β I-espectrina unido al dominio ZU5-ANK de ankirina (Ipsaro & Mondragon, 2010). La orientación del dominio ZU5-ANK, el SR14 y SR15 en el complejo se parece a la organización del dominio SH3 y los sub-dominios SR4 y SR5 de plectina, respectivamente.

La región SR3-SR5 de plectina y la región SR14-SR15 de β I-espectrina comparten una estructura terciaria muy similar, con una disposición de los SRs adyacentes muy similar. El dominio SH3 de desmoplakina y el dominio ZU5-ANK de β I-espectrina tienen estructuras terciaria muy diferentes. A pesar de ello, tras superponer el SR14 de β I-espectrina sobre el SR4 de plectina, el dominio ZU5-ANK y el dominio SH3 de plectina ocupan posiciones equivalentes (Figura D3). Además, el lazo B/C del SR15 de β I-espectrina coincide con la región de inserción del dominio SH3 en el mismo lazo del SR5 de plectina. Finalmente, el residuo R948 de ankirina ocupa la posición equivalente de V881 en el SH3 de plectina y su grupo guanidinio se inserta en un

bolsillo polar en el SR14 que se localiza en una posición equivalente a la cavidad hidrofóbica del SR4 de plectina, que acomoda la cadena lateral de V881.

Las similitudes entre el sitio de unión a ankirina en el fragmento SR14-SR15 de β I-espectrina y el sitio de interacción del SH3 en el SR4-SR5 de plectina, sugiere que esto podría revelar un área de interacción proteína-proteína (inter o intramolecular), que está también presente en otros conjuntos de SRs y que implican el lazo A/B, la hélice C de un SR y el lazo B/C del adyacente SR. Sin embargo, será necesario conocer la estructura de otros SRs unidos a ligandos para determinar si la estructura de plectina y la estructura de β I-espectrina / ankirina ilustran un modo de unión preferente o simplemente comparten una similitud estructural por casualidad.

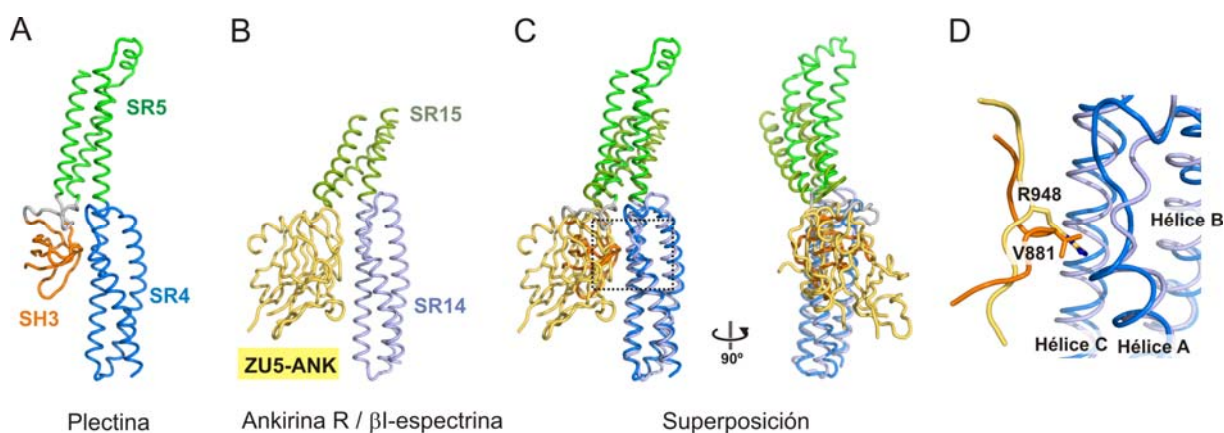


Figura D3.- Similar organización modular en el SR4-SR5 de plectina y el complejo formado por β I-espectrina y ankirina R. (A) Representación en cordones de la estructura SR4-SR5 de plectina con la inserción del dominio SH3, en la misma orientación que se muestra en el panel C. (B).- Estructura del dominio ZU5-ANK de la ankirina R unido a los subdominios SR14-SR15 de β I-espectrina (código PDB 3KBT). El subdominio SR13 está presente en la estructura cristalográfica del complejo pero no contacta con el dominio ZU5-ANK, por lo que se ha omitido en la figura. (C) Vistas ortogonales de las estructuras ankirina/ β I-espectrina y plectina después de la superposición del SR14 de β I-espectrina sobre el SR4 de plectina. (D) Vista aumentada de la interacción SH3/SR4 y ZU5-ANK/SR14 en plectina y en el complejo ankirina/ β I-espectrina respectivamente. La cadena lateral de V881 en el dominio SH3 de plectina y la de R948 en el dominio ZU5-ANK ocupan posiciones equivalentes. En esta figura, únicamente se muestra un segmento de la cadena principal alrededor de V881 y R948.

2.- Estructura de la región C-terminal del dominio plakina.

La región C-terminal del dominio plakina está formada por los sub-dominios SR7-SR9 que adoptan una estructura alargada con unas dimensiones de ~ 150 Å longitud y $\sim 20-25$ Å de ancho. Hasta este momento, la estructura cristalográfica de SR7-SR9 de plectina, es la única estructura conocida de esta región en plakinas. Los tres SRs de esta región se disponen de manera contigua y se unen entre sí a través de

conectores helicoidales similares a los que se observan en otros pares de SRs del dominio plakina. Una característica estructural de esta región, es el marcado solapamiento longitudinal de dos SRs adyacentes en la región de unión. Esto se debe a que las hélices B del SR8 y SR9, son más largas en su extremo C-terminal, que en otros SRs. En consecuencia, estas extensiones de las hélices B del SR8 y SR9 participan de los haces helicoidales del SR7 y SR8, respectivamente. Este solapamiento longitudinal contribuye a establecer interacciones entre SRs adyacentes en regiones adicionales a los contactos que tienen lugar a través de la hélice continua C-A. Esto parece resultar en una reducida variabilidad conformacional y por tanto en una limitada flexibilidad de esta región, en comparación con otras zonas del dominio plakina en las que no hay un solapamiento longitudinal entre SRs contiguos.

En los cristales del SR7-SR9 las dos moléculas presentes en la unidad asimétrica forman un dímero paralelo. La principal zona de contacto entre los protómeros del dímero se establece a nivel de las hélices C de los SR9, las cuales forman interacciones de super-hélice. El análisis del fragmento SR7-SR9 mediante SAXS y cromatografía de exclusión molecular combinada con dispersión de luz estática, mostró que este fragmento es monomérico en solución. Estos resultados contrastan con la observación del dímero cristalográfico, lo que indica que la formación del dímero se produce durante el proceso de cristalización, por una disposición estable de las moléculas en el cristal. A pesar de que la región SR7-SR9 es insuficiente para dimerizar en solución, el dímero cristalográfico puede representar la estructura de dimérica de plectina en la molécula completa. El dominio central se extiende inmediatamente tras el SR9. Es previsible que la hélice C del SR9 se continúe con la estructura helicoidal del dominio central, el cual se cree que forma dímeros paralelos simétricos mediante contactos de super-hélice (*coiled-coil*). En resumen, el dímero cristalográfico de la región SR7-SR9 es compatible con dimerización mediada por el dominio central y sugiere que en la plectina completa se establecen contactos diméricos a lo largo de la región C-terminal del dominio plakina.

3.- Flexibilidad en la región SR3-SR9 del dominio plakina de plectina.

El conjunto de estructuras cristalográficas de fragmentos de plectina resueltas en este estudio, ha permitido proponer un modelo atómico tridimensional de la región SR3-SR9 del dominio plakina. Esta región adopta una estructura alargada con forma de varilla ligeramente curvada, con unas dimensiones aproximadas de 340 Å de longitud y 25 Å de ancho. Los parámetros estructurales, como forma y dimensiones, de la región SR3-SR9 en solución estimados a partir de datos experimentales mediante SAXS son muy próximos a los datos teóricos calculados a partir del modelo.

Las discrepancias encontradas entre los datos teóricos del modelo y los datos experimentales de este fragmento en solución, podrían deberse a la presencia de una moderada variabilidad conformacional. Esta heterogeneidad conformacional estaría causada por movimientos de bisagra o flexión observados entre SRs adyacentes. A lo largo del dominio plakina existen zonas que muestran una ligera o moderada variabilidad conformacional frente a otras regiones que parecen tener menor libertad de movimiento.

Las estructuras de SR3-SR4 revelan un movimiento de flexión de pequeña amplitud ($\sim 8^\circ$) con una bisagra localizada en la región de unión SR3/SR4. Las estructuras de la región SR5-SR6, muestran un movimiento entre el SR5 y el SR6 de mayor amplitud (17°), que resultan en diferencias de hasta de ~ 10 Å en la posición del extremo C-terminal del SR6. Es posible que estos movimientos también ocurran en otros pares de SRs, como por ejemplo la unión SR6/SR7, si bien no disponemos de evidencias experimentales de diferencias conformacionales en esa región. Por el contrario, otras regiones como SR7-SR9 parecen mostrar una limitada flexibilidad entre los sub-dominios, posiblemente debido al solapamiento longitudinal de los SRs adyacentes en la región de unión y a las interacciones intra-moleculares que tienen lugar entre los SRs en esta región, lo que limitaría la variabilidad conformacional. El dominio SH3 que está conectado al SR5 a través de un conector corto y rico en Pro y al SR4 a través de una gran superficie de interacción, por lo que posiblemente también disminuya el movimiento de bisagra entre el SR4 y SR5.

La flexibilidad entre algunos pares de SRs podría ser la causa por la que ninguno de los modelos construidos para esta región se ajuste totalmente a los datos experimentales de SAXS. Es probable que esta región no tenga una única estructura tridimensional válida, sino que en solución exista una mezcla de estructuras con dimensiones similares pero con diferencias conformacionales. Posiblemente, la variabilidad conformacional dentro del dominio plakina es aún mayor fuera de la región SR3-SR9, ya que el SR2 y SR3 están unidos por conector probablemente flexible de ~20 aminoácidos. Actualmente, se está analizando mediante microscopía electrónica la región SR3-SR9 y otros fragmentos de mayor tamaño como el dominio plakina completo (SR1-SR9) y la región N-terminal completa que incluye el ABD y el dominio plakina. Esperamos que el análisis mediante microscopía electrónica proporcione información más detallada sobre la estructura global del dominio plakina y el ABD adyacentes.

La flexibilidad entre SRs adyacentes es habitual en proteínas que contienen grupos de SRs y se han descrito en fragmentos de α y β -espectrinas (Grum et al, 1999; Kusunoki et al, 2004). Aún se desconoce la importancia de estos movimientos entre sub-dominios en plakinas, pero en otras proteínas estructurales que contienen SRs, como las espectrinas, la flexibilidad es importantes para contribuir a la deformabilidad y resistencia mecánica del citoesqueleto.

Por último, se puede hipotetizar que la interacción de otras proteínas con el dominio plakina pueda modificar las propiedades mecánicas de esta región en plectina u otras plakinas.

3.1.- Diferencias entre los dominios plakina de plectina y desmoplakina.

Recientemente, se ha determinado la estructura a baja resolución del dominio plakina de desmoplakina en solución mediante SAXS (Al-Jassar et al, 2011). Según los autores, la estructura de este dominio tiene una forma alargada pero doblada aproximadamente hacia la mitad de la molécula. Este giro o quiebro da lugar a una molécula con una forma de "L", definida por un brazo largo y un brazo corto que se

Capítulo 5

disponen entre sí de manera perpendicular. Esta estructura de desmoplakina muestra diferencias con la estructura del SR3-SR9 de plectina que proponemos.

Como ya se ha comentado anteriormente, la estructura cristalográfica de SR3-SR6 de desmoplakina muestra una gran similitud con la región equivalente plectina. El porcentaje de identidad de secuencia entre plectina y desmoplakina es del 31%, 48%, 31% y 49 % para el SR3, SR4, SR5 y SR6, respectivamente.

Se desconoce la estructura de la región SR7-SR9 de desmoplakina. El porcentaje de identidad de secuencia entre plectina y desmoplakina en esta región es 27% para los sub-dominios SR7 y SR8; y 38% para el SR9. En comparación con los sub-dominios de la región central, la conservación de secuencia en la región C-terminal sugiere que esta región de desmoplakina está formada por tres SRs similares a los presentes en plectina.

La principal diferencia entre las secuencias de plectina y desmoplakina en la región SR3-SR9 se localiza en la región de unión entre el SR6 y el SR7. En plectina, esta región consta de unos pocos aminoácidos, de los cuáles solo cuatro de ellos no se han observado en ninguna estructura cristalográfica (aminoácidos 1001-1004). Aunque no hay datos estructurales que confirmen la conformación helicoidal de esta región, el análisis mediante SAXS de la región SR6-SR9 sugieren que el conector SR6-SR7 es aparentemente rígido o muestra una reducida flexibilidad. En cambio en desmoplakina entre el SR6 y el SR7 se extiende una secuencia de ~30 residuos (Figura D4). Por tanto, en la región entre el SR6 y el SR7 de desmoplakina puede formar un conector flexible que permitiría que las regiones rígidas SR3-SR6 y SR7-SR9 se orienten con forma de L.

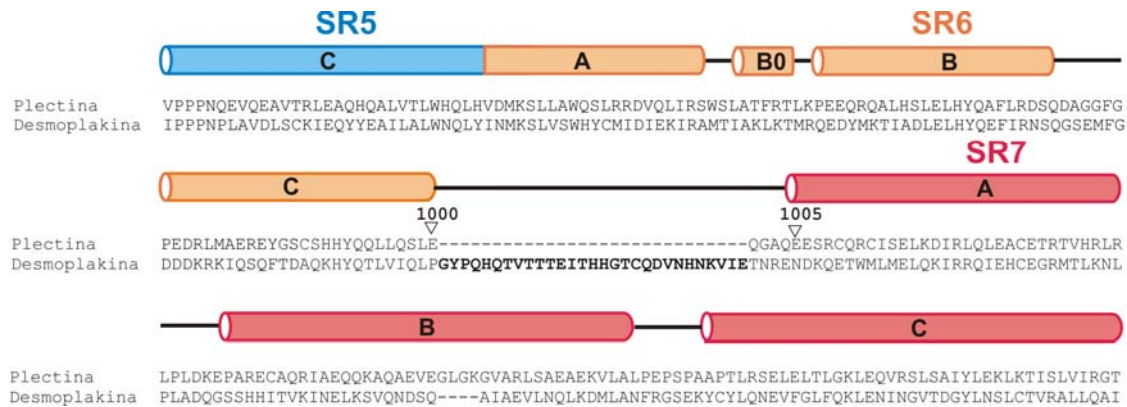


Figura D4.- Alineamiento de secuencia de Plectina y Desmoplakina en la región de unión SR6/SR7.- La secuencia de la región SR6-SR7 de plectina humana (Uniprot Q15149-2) se alineó con la secuencia de la región equivalente de desmoplakina (P15924). Los elementos de estructura secundaria de la estructura de plectina están representados sobre la secuencia. El último residuo del SR6 y el primero del SR7 que se observan en las estructuras cristalográficas están indicados sobre la secuencia con un triángulo invertido, correspondientes al aminoácido 1000 y 1005, respectivamente según la numeración de Uniprot. El SR6 y el SR7 de plectina se unen mediante un conector de corta longitud, mientras que los equivalentes SRs de desmoplakina se unen a través de un conector que contiene 30 aminoácidos adicionales (en negrita). Adicionalmente, se muestra la región de unión SR5/SR6 según la estructura cristalográfica de esta región de plectina, formada por la hélice C del SR5 y la hélice A del SR6.

4.- Implicaciones funcionales de la estructura del dominio plakina.

Por un lado, el dominio plakina tiene una función estructural actuando como espaciador, ya que contribuye a la separación de las regiones N y C-terminal de plectina que lleva a cabo el dominio central. Esta separación facilita el entrecruzamiento que realizan las plakinas, uniéndose al sistema de filamentos intermedios en la región C-terminal y a complejos de adhesión asociados a la membrana plasmática a través de los sitios de unión de la región N-terminal.

Por otro lado, el dominio plakina alberga sitios de interacción con otras proteínas. El dominio plakina de plectina se une a la región citoplasmática de la integrina $\beta 4$ y a la proteína transmembrana BP180 (Koster et al, 2004). Se desconocen las regiones específicas que median estas interacciones. Es posible, que los estos sitios de unión para algunos ligandos, incluyan tanto el dominio SH3 como uno o más SRs. En este sentido, es interesante destacar que en la superficie de la región central del dominio plakina (SR3-SR5) se define un surco formado por dos sub-dominios que podría ser relevante en la unión del dominio plakina a ligando. En esta región, las hélices A y B del SR3 se disponen en el mismo lado que el SR4 y que el dominio SH3, formando un bolsillo hidrofóbico con forma de C, en el que participan residuos de las hélices A

y C del SR4 y que está flanqueado por residuos polares y ácidos. Esta superficie podría ser un potencial sitio de interacción de plectina (Figura D5).

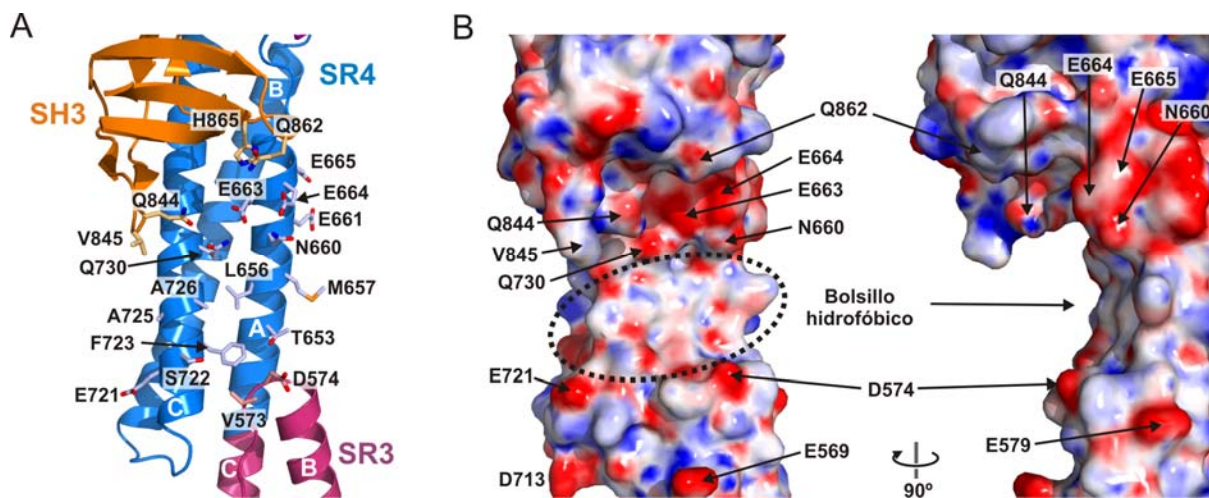


Figura D5.- El SR3, SR4 y el dominio SH3 definen una superficie cóncava entre los subdominios.(A) Representación de la estructura alrededor del SR4 flanqueado por el lazo A/B del SR3 y el dominio SH3. Esta región del SR4 contiene un bolsillo hidrofóbico (L656, M657, F723, A725 y A726) entre residuos ácidos y polares del SR3 (D574), del SR4 (N660, E663, E664, E721 y Q730) y el dominio SH3 (Q844 y Q862). Solo se muestran las cadenas laterales de los residuos implicados en esta superficie. (B) Representación de la superficie cóncava de esta región de la misma orientación que en (A) (panel de la izquierda) y rotado 90° (panel de la derecha). La superficie está coloreada según el potencial electrostático de la superficie a -18 K T/e (rojo) y +18 K T/e (azul), calculado con el programa APBS (Baker et al, 2001).

4.1.- Contribución del dominio plakina a la unión a la integrina $\beta 4$.

Se ha descrito que la región N-terminal y la región central del dominio plakina participan en la interacción con otras proteínas de unión, contribuyendo a la interacción de plectina con la subunidad $\beta 4$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$ y con el dominio citoplasmático de BPAG2 en los hemidesmosomas. Los sitios específicos de interacción en el dominio plakina no han sido aún descritos. El análisis de la interacción entre plectina y la región citoplasmática de $\beta 4$ realizado en este trabajo, indica que la región SR1-SR4 del dominio plakina de plectina no contribuye a la interacción con la integrina $\beta 4$.

Nuestros resultados contrastan con un estudio previo realizado por Koster y colaboradores en el cual se muestra que la región correspondiente al segundo par de dominios de FnIII (FnIII-3,4) de $\beta 4$ (aminoácidos 1382-1667) interacciona con un fragmento de plectina que incluye el ABD y los 4 primeros SRs (aminoácidos 1-606), pero no interacciona con un fragmento que contiene únicamente el ABD y parte del SR1 (aminoácidos 1-339).

Plectina 1-606 también co-inmunoprecipita con una construcción de la región citoplasmática de $\beta 4$ con la mutación R1281W, la cual inhibe la unión con el ABD de plectina. Por otro lado, el fragmento 284-1154 de plectina, que contiene la región SR1-SR7, interacciona en experimentos de dos híbridos en levaduras con tres regiones de $\beta 4$: 1115-1436 (FnIII-1,2 y parte del SC), 1382-1667 (parte del SC y FnIII-3,4) y 1570-1752 (FnIII-4 y cola C-terminal).

En nuestro análisis de interacción entre $\beta 4$ y plectina hemos intentado utilizar un fragmento de $\beta 4$, aminoácidos 1126-1752, que contiene los cuatro dominios de FnIII y la cola C-terminal íntegra (FnIII-1,4-CTT-C). Esta región de $\beta 4$ contiene el sitio primario de unión al ABD de plectina, que corresponde al FnIII-1,2 y parte del SC; pero además incluye los sitios adicionales de unión al dominio plakina de plectina descritos por Koster y colaboradores. Sin embargo, no se ha detectado interacción entre la región 1126-1752 y ninguno de los fragmentos de plectina. Puesto que esta región de $\beta 4$ contiene el sitio de unión al ABD, es razonable que el proceso de replegado empleado durante la purificación de $\beta 4$ FnIII-1,4-CTT-C origine una proteína inactiva, aunque soluble y aparentemente estable. Otra posibilidad es que el fragmento $\beta 4$ FnIII-1,4-CTT-C adopta una conformación cerrada inactiva, estabilizada por interacciones intramoleculares entre el segmento conector (SC) y la cola C-terminal (Koster et al, 2003; Rezniczek et al, 1998; Schaapveld et al, 1998). Sin embargo, esta conformación cerrada, que no implica al sitio de unión primario a plectina, no justificaría la inhibición de la unión al ABD.

Los fragmentos de $\beta 4$ de mayor tamaño expresados solubles y purificados en condiciones nativas contienen la región FnIII-1,4 (incluyendo el SC) y fragmentos de la cola C-terminal. Empelando estos fragmentos de $\beta 4$ no hemos observado contribución de la región SR1-SR4 de plectina a la interacción con $\beta 4$. Puesto que no se ha podido analizar la interacción con el fragmento que contiene la cola C-terminal completa, no se puede descartar que la región final de esta cola (aminoácidos 1732-1752) sea esencial para la interacción con el segmento SR1-SR4 del dominio plakina de plectina. Recientemente, el grupo del Prof Sonnenberg, han

Capítulo 5

descrito que la T1736 en el extremo de la cola C-terminal de $\beta 4$ es importante para la interacción con el dominio plakina de plectina (comunicación personal).

Las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los de *Koster* también podrían deberse al diferente escenario bioquímico en el que se producen las interacciones. Se desconoce si la interacción entre el dominio plakina de plectina y $\beta 4$ requiere factores adicionales que no están presentes en nuestro análisis de la interacción *in vitro* empleando proteínas recombinantes; que podrían estar presentes en los ensayos de dos híbridos realizados en levadura o en los experimentos de co-inmunoprecipitación en extractos de células en mamífero en cultivo.

CONCLUSIONES

- 1) La región central SR3-SR6 del dominio plakina tiene una estructura alargada en la que los cuatro SRs están concatenados y alineados con el eje longitudinal.
- 2) El dominio SH3 está insertado en el lazo B/C del SR5, pero está desplazado hacia el SR4, con el que interacciona. La interfase SR4/SH3 está conservada en otros miembros de la familia plakina.
- 3) El pseudo-sitio de unión a ligando del dominio SH3 de plectina está alterado en comparación con el de dominios SH3 canónicos y está ocluido parcialmente por el SR4. Estas alteraciones están conservadas en la familia plakina, pero no en espectrinas. Por lo tanto la estructura del SH3 de plectina no es compatible con su unión a ligandos de poli-Pro, sino que está especializado en la interacción intramolecular.
- 4) Los tres SRs (SR7-SR9) de la región C-terminal del dominio plakina forman una estructura de varilla aparentemente rígida.
- 5) La región SR3-SR9 adopta en solución una estructura aparentemente alargada y semi-rígida de ~340 Å de longitud.
- 6) La orientación relativa de SRs adyacentes no está conservada a lo largo del dominio plakina de plectina.
- 7) Dentro del dominio plakina parecen existir puntos preferenciales de flexibilidad en determinadas zonas de unión de ciertos pares de SRs, como el SR5-SR6.
- 8) Los cuatro primeros SRs del dominio plakina no contribuyen directamente a la interacción *in vitro* de plectina con el segmento conector, el FnIII-3,4 y parte de la cola C-terminal de la región citoplasmática de la integrina β 4.

BIBLIOGRAFÍA

- Abercrombie M, Dunn GA (1975) Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp Cell Res* **92**: 57-62
- Abrahams JP, Leslie AG (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**: 30-42
- Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD (2005) The Phenix refinement framework. *CCP4 Newsl* **42**
- Al-Jassar C, Knowles T, Jeeves M, Kami K, Behr E, Bikker H, Overduin M, Chidgey M (2011) The nonlinear structure of the desmoplakin plakin domain and the effects of cardiomyopathy-linked mutations. *J Mol Biol* **411**: 1049-1061
- Alonso-García N, Ingles-Prieto A, Sonnenberg A, De Pereda JM (2009) Structure of the Calx-beta domain of the integrin beta4 subunit: insights into function and cation-independent stability. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**: 858-871
- Andra K, Kornacker I, Jorgl A, Zorer M, Spazierer D, Fuchs P, Fischer I, Wiche G (2003) Plectin-isoform-specific rescue of hemidesmosomal defects in plectin (-/-) keratinocytes. *J Invest Dermatol* **120**: 189-197
- Andra K, Lassmann H, Bittner R, Shorny S, Fassler R, Propst F, Wiche G (1997) Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev* **11**: 3143-3156.
- Andra K, Nikolic B, Stocher M, Drenckhahn D, Wiche G (1998) Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. *Genes Dev* **12**: 3442-3451.
- Angst BD, Nilles LA, Green KJ (1990) Desmoplakin II expression is not restricted to stratified epithelia. *J Cell Sci* **97 (Pt 2)**: 247-257
- Bachelder RE, Ribick MJ, Marchetti A, Falcioni R, Soddu S, Davis KR, Mercurio AM (1999) p53 inhibits alpha 6 beta 4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J Cell Biol* **147**: 1063-1072.
- Baines AJ (2003) Comprehensive analysis of all triple helical repeats in beta-spectrins reveals patterns of selective evolutionary conservation. *Cell Mol Biol Lett* **8**: 195-214
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10037-10041
- Banuelos S, Saraste M, Carugo KD (1998) Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. *Structure* **6**: 1419-1431.
- Bornslaeger EA, Godsel LM, Corcoran CM, Park JK, Hatzfeld M, Kowalczyk AP, Green KJ (2001) Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci* **114**: 727-738

Capítulo 7

- Borradori L, Sonnenberg A (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* **112**: 411-418
- Bosher JM, Hahn BS, Legouis R, Sookhareea S, Weimer RM, Gansmuller A, Chisholm AD, Rose AM, Bessereau JL, Labouesse M (2003) The *Caenorhabditis elegans* vab-10 spectraplakins isoforms protect the epidermis against internal and external forces. *J Cell Biol* **161**: 757-768
- Bramham J, Hodgkinson JL, Smith BO, Uhrin D, Barlow PN, Winder SJ (2002) Solution structure of the calponin CH domain and fitting to the 3D-helical reconstruction of F-actin:calponin. *Structure (Camb)* **10**: 249-258.
- Bricogne G, Vonrhein C, Flensburg C, Schiltz M, Paciorek W (2003) Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 2023-2030
- Brown A, Bernier G, Mathieu M, Rossant J, Kothary R (1995) The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet* **10**: 301-306
- Brunger AT (2007) Version 1.2 of the Crystallography and NMR System. *Nature Protocols* **2**: 2728-2733
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**: 905-921.
- Burgstaller G, Gregor M, Winter L, Wiche G (2010) Keeping the vimentin network under control: cell-matrix adhesion-associated plectin 1f affects cell shape and polarity of fibroblasts. *Mol Biol Cell* **21**: 3362-3375
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 463-518
- Canutescu AA, Shelenkov AA, Dunbrack RL, Jr. (2003) A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci* **12**: 2001-2014
- Carugo KD, Banuelos S, Saraste M (1997) Crystal structure of a calponin homology domain. *Nat Struct Biol* **4**: 175-179.
- Casares S, Ab E, Eshuis H, Lopez-Mayorga O, van Nuland NA, Conejero-Lara F (2007) The high-resolution NMR structure of the R21A Spc-SH3:P41 complex: understanding the determinants of binding affinity by comparison with Abl-SH3. *BMC Struct Biol* **7**: 22
- Castresana J, Saraste M (1995) Does Vav bind to F-actin through a CH domain? *FEBS Lett* **374**: 149-151
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**: 760-763.
- Cowtan K (1994) 'dm': An automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**: 34-38

- Chacon P, Diaz JF, Moran F, Andreu JM (2000) Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. *J Mol Biol* **299**: 1289-1302.
- Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe LT, Green KJ, Weis WI (2002) Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. *Nat Struct Biol* **9**: 612-620.
- Choi HJ, Weis WI (2011) Crystal structure of a rigid four-spectrin-repeat fragment of the human desmoplakin plakin domain. *J Mol Biol* **409**: 800-812
- Christiano AM, Uitto J (1996) Molecular diagnosis of inherited skin diseases: the paradigm of dystrophic epidermolysis bullosa. *Advances in dermatology* **11**: 199-213; discussion 214
- Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB, 3rd, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **35**: W375-383
- de Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J, Matsudaira P (1990) Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol* **111**: 1069-1079.
- de Pereda JM, Lillo MP, Sonnenberg A (2009a) Structural basis of the interaction between integrin alpha6beta4 and plectin at the hemidesmosomes. *Embo J* **28**: 1180-1190
- de Pereda JM, Ortega E, Alonso-Garcia N, Gomez-Hernandez M, Sonnenberg A (2009b) Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* **3**: 361-364
- de Pereda JM, Wiche G, Liddington RC (1999) Crystal structure of a tandem pair of fibronectin type III domains from the cytoplasmic tail of integrin alpha6beta4. *Embo J* **18**: 4087-4095.
- DeLaBarre B, Brunger AT (2006) Considerations for the refinement of low-resolution crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 923-932
- DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA*
- Diederichs K, Karplus PA (1997) Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol* **4**: 269-275
- Djinovic-Carugo K, Young P, Gautel M, Saraste M (1999) Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell* **98**: 537-546
- Eger A, Stockinger A, Wiche G, Foisner R (1997) Polarisation-dependent association of plectin with desmoplakin and the lateral submembrane skeleton in MDCK cells. *J Cell Sci* **110**: 1307-1316.
- Elliott CE, Becker B, Oehler S, Castanon MJ, Hauptmann R, Wiche G (1997) Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics* **42**: 115-125

Capítulo 7

- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126-2132
- Errante LD, Wiche G, Shaw G (1994) Distribution of plectin, an intermediate filament-associated protein, in the adult rat central nervous system. *Journal of neuroscience research* **37**: 515-528
- Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL (1994) Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* **266**: 1241-1247
- Foisner R, Leichtfried FE, Herrmann H, Small JV, Lawson D, Wiche G (1988) Cytoskeleton-associated plectin: in situ localization, in vitro reconstitution, and binding to immobilized intermediate filament proteins. *J Cell Biol* **106**: 723-733.
- Foisner R, Wiche G (1987) Structure and hydrodynamic properties of plectin molecules. *J Mol Biol* **198**: 515-531
- Franke D, Svergun DI (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of applied crystallography* **42**: 342-346
- Franke WW, Kapprell HP, Cowin P (1987) Immunolocalization of plakoglobin in endothelial junctions: identification as a special type of Zonulae adhaerentes. *Biol Cell* **59**: 205-218
- French S, Wilson K (1978) On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr* **A34**: 517-525
- Fuchs P, Spazierer D, Wiche G (2005) Plectin rodless isoform expression and its detection in mouse brain. *Cellular and molecular neurobiology* **25**: 1141-1150
- Fuchs P, Zorer M, Rezniczek GA, Spazierer D, Oehler S, Castanon MJ, Hauptmann R, Wiche G (1999) Unusual 5' transcript complexity of plectin isoforms: novel tissue-specific exons modulate actin binding activity. *Hum Mol Genet* **8**: 2461-2472.
- Fujiwara S, Kohno K, Iwamatsu A, Naito I, Shinkai H (1996) Identification of a 450-kDa human epidermal autoantigen as a new member of the plectin family. *J Invest Dermatol* **106**: 1125-1130
- Fujiwara S, Takeo N, Otani Y, Parry DA, Kunimatsu M, Lu R, Sasaki M, Matsuo N, Khaleduzzaman M, Yoshioka H (2001) Epiplakin, a novel member of the Plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen. Structure and tissue localization. *J Biol Chem* **276**: 13340-13347
- Gache Y, Chavanas S, Lacour JP, Wiche G, Owaribe K, Meneguzzi G, Ortonne JP (1996) Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *The Journal of clinical investigation* **97**: 2289-2298
- Gallicano GI, Kouklis P, Bauer C, Yin M, Vasioukhin V, Degenstein L, Fuchs E (1998) Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol* **143**: 2009-2022

- Gambaletta D, Marchetti A, Benedetti L, Mercurio AM, Sacchi A, Falcioni R (2000) Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* **275**: 10604-10610.
- Garcia-Alvarez B, Bobkov A, Sonnenberg A, de Pereda JM (2003) Structural and functional analysis of the actin binding domain of plectin suggests alternative mechanisms for binding to F-actin and to integrin alpha6beta4. *Structure* **11**: 615-625
- Garcia De La Torre J, Huertas ML, Carrasco B (2000) Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys J* **78**: 719-730
- Geerts D, Fontao L, Nievers MG, Schaapveld RQ, Purkis PE, Wheeler GN, Lane EB, Leigh IM, Sonnenberg A (1999) Binding of integrin alpha6beta4 to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J Cell Biol* **147**: 417-434.
- Geuijen CA, Sonnenberg A (2002) Dynamics of the alpha6beta4 integrin in keratinocytes. *Mol Biol Cell* **13**: 3845-3858
- Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA (1992) Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* **99**: 243-250
- Glatter O, Kratky O (1982) Small Angle X-ray Scattering. *Academic Press*
- Green KJ, Parry DA, Steinert PM, Virata ML, Wagner RM, Angst BD, Nilles LA (1990) Structure of the human desmoplakins. Implications for function in the desmosomal plaque. *J Biol Chem* **265**: 11406-11407
- Green KJ, Virata ML, Elgart GW, Stanley JR, Parry DA (1992) Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin: members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *Int J Biol Macromol* **14**: 145-153
- Grum VL, Li D, MacDonald RI, Mondragon A (1999) Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility. *Cell* **98**: 523-535
- Guinier A, Fournet G (1955) Small Angle Scattering of X-Ray. *New York, John Wiley & Sons Inc*
- Haran G, Haas E, Szpikowska BK, Mas MT (1992) Domain motions in phosphoglycerate kinase: determination of interdomain distance distributions by site-specific labeling and time-resolved fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11764-11768
- Harding MM (2006) Small revisions to predicted distances around metal sites in proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 678-682
- Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vizens U (2000) The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol* **149**: 209-222
- Hayward S, Berendsen HJ (1998) Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins* **30**: 144-154
- Hazes B, Dijkstra BW (1988) Model building of disulfide bonds in proteins with known three-dimensional structure. *Protein Eng* **2**: 119-125.

Capítulo 7

Hemmings L, Kuhlman PA, Critchley DR (1992) Analysis of the actin-binding domain of alpha-actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain. *J Cell Biol* **116**: 1369-1380.

Herrmann H, Wiche G (1987) Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J Biol Chem* **262**: 1320-1325.

Hieda Y, Nishizawa Y, Uematsu J, Owaribe K (1992) Identification of a new hemidesmosomal protein, HD1: a major, high molecular mass component of isolated hemidesmosomes. *J Cell Biol* **116**: 1497-1506.

Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H (2008) Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through beta-synemin, alpha-dystrobrevin and actin. *J Cell Sci* **121**: 2062-2074

Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AE, Sonnenberg A (1990) Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *Embo J* **9**: 765-770.

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687

Ipsaro JJ, Harper SL, Messick TE, Marmorstein R, Mondragon A, Speicher DW (2010) Crystal structure and functional interpretation of the erythrocyte spectrin tetramerization domain complex. *Blood* **115**: 4843-4852

Ipsaro JJ, Mondragon A (2010) Structural basis for spectrin recognition by ankyrin. *Blood* **115**: 4093-4101

Janda L, Damborsky J, Rezniczek GA, Wiche G (2001) Plectin repeats and modules: strategic cysteines and their presumed impact on cytolinker functions. *Bioessays* **23**: 1064-1069

Jefferson JJ, Ciatto C, Shapiro L, Liem RK (2007) Structural analysis of the plakin domain of bullous pemphigoid antigen1 (BPAG1) suggests that plakins are members of the spectrin superfamily. *J Mol Biol* **366**: 244-257

Jefferson JJ, Leung CL, Liem RK (2004) Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 542-553

Jones JC, Kurpakus MA, Cooper HM, Quaranta V (1991) A function for the integrin alpha 6 beta 4 in the hemidesmosome. *Cell regulation* **2**: 427-438

Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **26**: 795-800

Kaneko T, Li L, Li SS (2008) The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci* **13**: 4938-4952

Kantardjieff KA, Rupp B (2003) Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* **12**: 1865-1871

Karakesisoglou I, Yang Y, Fuchs E (2000) An epidermal plakin that integrates actin and microtubule networks at cellular junctions. *J Cell Biol* **149**: 195-208

- Ketema M, Wilhelmsen K, Kuikman I, Janssen H, Hodzic D, Sonnenberg A (2007) Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J Cell Sci* **120**: 3384-3394
- Kodama A, Karakesisoglou I, Wong E, Vaezi A, Fuchs E (2003) ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* **115**: 343-354
- Konarev PV, Petoukhov MV, Volkov VV, Svergun DI (2006) ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* **39**: 277-286
- Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ, Svergun DI (2003) PRIMUS - a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* **36**: 1277-1282
- Koss-Harnes D, Hoyheim B, Anton-Lamprecht I, Gjesti A, Jorgensen RS, Jahnsen FL, Olaisen B, Wiche G, Gedde-Dahl T, Jr. (2002) A site-specific plectin mutation causes dominant epidermolysis bullosa simplex Ogna: two identical de novo mutations. *J Invest Dermatol* **118**: 87-93.
- Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A (2003) Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci* **116**: 387-399
- Koster J, Kuikman I, Kreft M, Sonnenberg A (2001) Two different mutations in the cytoplasmic domain of the integrin beta 4 subunit in nonlethal forms of epidermolysis bullosa prevent interaction of beta 4 with plectin. *J Invest Dermatol* **117**: 1405-1411.
- Koster J, van Wilpe S, Kuikman I, Litjens SH, Sonnenberg A (2004) Role of binding of plectin to the integrin beta4 subunit in the assembly of hemidesmosomes. *Mol Biol Cell* **15**: 1211-1223
- Kouklis PD, Hutton E, Fuchs E (1994) Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J Cell Biol* **127**: 1049-1060
- Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Borgwardt JE, Palka HL, Dhaliwal AS, Corcoran CM, Denning MF, Green KJ (1997) The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol* **139**: 773-784
- Kozin M, Svergun D (2000) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of applied crystallography* **34**
- Kozin MB, Svergun DI (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of applied crystallography* **34**: 33-41
- Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**: 774-797
- Kusunoki H, MacDonald RI, Mondragon A (2004) Structural insights into the stability and flexibility of unusual erythroid spectrin repeats. *Structure* **12**: 645-656
- Kuwamoto S, Akiyama S, Fujisawa T (2004) Radiation damage to a protein solution, detected by synchrotron X-ray small-angle scattering: dose-related considerations and suppression by cryoprotectants. *J Synchrotron Radiat* **11**: 462-468

Capítulo 7

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lee GF, Burrows GG, Lebert MR, Dutton DP, Hazelbauer GL (1994) Deducing the organization of a transmembrane domain by disulfide cross-linking. The bacterial chemoreceptor Trg. *J Biol Chem* **269**: 29920-29927.

Lee S, Harris KL, Whittington PM, Kolodziej PA (2000) short stop is allelic to kakapo, and encodes rod-like cytoskeletal-associated proteins required for axon extension. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 1096-1108

Leslie AGW (1992) Joint CCP4 and ESF-EACMB *Newsletter on Protein Crystallography* **26**

Leung CL, Green KJ, Liem RK (2002) Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol* **12**: 37-45.

Leung CL, Sun D, Zheng M, Knowles DR, Liem RK (1999) Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J Cell Biol* **147**: 1275-1286

Leung CL, Zheng M, Prater SM, Liem RK (2001) The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* **154**: 691-697

Lim WA, Richards FM (1994) Critical residues in an SH3 domain from Sem-5 suggest a mechanism for proline-rich peptide recognition. *Nat Struct Biol* **1**: 221-225

Lim WA, Richards FM, Fox RO (1994) Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* **372**: 375-379

Lin CM, Chen HJ, Leung CL, Parry DA, Liem RK (2005) Microtubule actin crosslinking factor 1b: a novel plakin that localizes to the Golgi complex. *J Cell Sci* **118**: 3727-3738

Litjens SH, de Pereda JM, Sonnenberg A (2006) Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol* **16**: 376-383

Liu CG, Maercker C, Castanon MJ, Hauptmann R, Wiche G (1996) Human plectin: organization of the gene, sequence analysis, and chromosome localization (8q24). *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4278-4283

Mainiero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, Giancotti FG (1995) Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J* **14**: 4470-4481

Matthews BW (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**: 491-497

May AP, Ponting CP (1999) Integrin alpha- and beta 4-subunit-domain homologues in cyanobacterial proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 12-13.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**: 658-674

- McLean WH, Pulkkinen L, Smith FJ, Rugg EL, Lane EB, Bullrich F, Burgeson RE, Amano S, Hudson DL, Owaribe K, McGrath JA, McMillan JR, Eady RA, Leigh IM, Christiano AM, Uitto J (1996) Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev* **10**: 1724-1735.
- McMillan JR, McGrath JA, Tidman MJ, Eady RA (1998) Hemidesmosomes show abnormal association with the keratin filament network in junctional forms of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **110**: 132-137
- Murgia C, Blaikie P, Kim N, Dans M, Petrie HT, Giancotti FG (1998) Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *Embo J* **17**: 3940-3951.
- Musacchio A (2002) How SH3 domains recognize proline. *Adv Protein Chem* **61**: 211-268
- Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R, Saraste M (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* **359**: 851-855
- Nakano A, Pulkkinen L, Murrell D, Rico J, Lucky AW, Garzon M, Stevens CA, Robertson S, Pfendner E, Uitto J (2001) Epidermolysis bullosa with congenital pyloric atresia: novel mutations in the beta 4 integrin gene (ITGB4) and genotype/phenotype correlations. *Pediatr Res* **49**: 618-626.
- Newman J, Egan D, Walter TS, Meged R, Berry I, Ben Jelloul M, Sussman JL, Stuart DI, Perrakis A (2005) Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: the PACT/JCSG+ strategy. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**: 1426-1431
- Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH, de Melker AA, Delwel GO, Hulsman EH, Kuikman I, Sonnenberg A (1994) The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res* **211**: 360-367
- Niessen CM, Hulsman EH, Oomen LC, Kuikman I, Sonnenberg A (1997) A minimal region on the integrin beta4 subunit that is critical to its localization in hemidesmosomes regulates the distribution of HD1/plectin in COS-7 cells. *J Cell Sci* **110**: 1705-1716.
- Niessen CM, van der Raaij-Helmer MH, Hulsman EH, van der Neut R, Jonkman MF, Sonnenberg A (1996) Deficiency of the integrin beta 4 subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci* **109 (Pt 7)**: 1695-1706
- Nievers MG, Schaapveld RQ, Oomen LC, Fontao L, Geerts D, Sonnenberg A (1998) Ligand-independent role of the beta 4 integrin subunit in the formation of hemidesmosomes. *J Cell Sci* **111**: 1659-1672.
- Nikolic B, Mac Nulty E, Mir B, Wiche G (1996) Basic amino acid residue cluster within nuclear targeting sequence motif is essential for cytoplasmic plectin-vimentin network junctions. *J Cell Biol* **134**: 1455-1467.

Capítulo 7

O'Keefe EJ, Erickson HP, Bennett V (1989) Desmoplakin I and desmoplakin II. Purification and characterization. *J Biol Chem* **264**: 8310-8318

Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**: 2411-2423

Painter J, Merritt EA (2006) Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 439-450

Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, Lobanov VS, Myslik J, Graf E, Carver T, Asel E, Springer BA, Lane P, Salemme FR (2001) High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen* **6**: 429-440

Pape T, Schneider TR (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for phasing with SHELX programs. *J Appl Cryst* **37**: 843-844

Pascual J, Castresana J, Saraste M (1997a) Evolution of the spectrin repeat. *Bioessays* **19**: 811-817.

Pascual J, Pfuhl M, Rivas G, Pastore A, Saraste M (1996) The spectrin repeat folds into a three-helix bundle in solution. *FEBS Lett* **383**: 201-207.

Pascual J, Pfuhl M, Walther D, Saraste M, Nilges M (1997b) Solution structure of the spectrin repeat: a left-handed antiparallel triple-helical coiled-coil. *J Mol Biol* **273**: 740-751.

Perrakis A, Morris R, Lamzin VS (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* **6**: 458-463

Petoukhov MV, Svergun DI (2005) Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J* **89**: 1237-1250

Praaenikar J, Afonine PV, Guncar G, Adams PD, Turk D (2009) Averaged kick maps: less noise, more signal... and probably less bias. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**: 921-931

Praznikar J, Afonine PV, Guncar G, Adams PD, Turk D (2009) Averaged kick maps: less noise, more signal...and probably less bias. *Acta Crystallographica Section D* **65**: 921-931

Pulkkinen L, Kimonis VE, Xu Y, Spanou EN, McLean WH, Uitto J (1997) Homozygous alpha6 integrin mutation in junctional epidermolysis bullosa with congenital duodenal atresia. *Hum Mol Genet* **6**: 669-674

Pulkkinen L, Rouan F, Bruckner-Tuderman L, Wallerstein R, Garzon M, Brown T, Smith L, Carter W, Uitto J (1998) Novel ITGB4 mutations in lethal and nonlethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense versus nonsense. *Am J Hum Genet* **63**: 1376-1387.

Pulkkinen L, Smith FJ, Shimizu H, Murata S, Yaoita H, Hachisuka H, Nishikawa T, McLean WH, Uitto J (1996) Homozygous deletion mutations in the plectin gene (PLEC1) in patients with epidermolysis bullosa simplex associated with late-onset muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **5**: 1539-1546

Pytela R, Wiche G (1980) High molecular weight polypeptides (270,000-340,000) from cultured cells are related to hog brain microtubule-associated proteins but copurify with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 4808-4812.

- Read RJ, Schierbeek AJ (1988) A phased translation function. *Journal of applied crystallography* **21**: 490-495
- Reipert S, Steinbock F, Fischer I, Bittner RE, Zeold A, Wiche G (1999) Association of mitochondria with plectin and desmin intermediate filaments in striated muscle. *Exp Cell Res* **252**: 479-491
- Rezniczek GA, Abrahamsberg C, Fuchs P, Spazierer D, Wiche G (2003) Plectin 5'-transcript diversity: short alternative sequences determine stability of gene products, initiation of translation and subcellular localization of isoforms. *Hum Mol Genet* **12**: 3181-3194
- Rezniczek GA, de Pereda JM, Reipert S, Wiche G (1998) Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol* **141**: 209-225.
- Rezniczek GA, Konieczny P, Nikolic B, Reipert S, Schneller D, Abrahamsberg C, Davies KE, Winder SJ, Wiche G (2007) Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with beta-dystroglycan. *J Cell Biol* **176**: 965-977
- Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B (1983) Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol* **91**: 49-60.
- Roper K, Gregory SL, Brown NH (2002) The 'spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J Cell Sci* **115**: 4215-4225
- Ruhrberg C, Hajibagheri MA, Simon M, Dooley TP, Watt FM (1996a) Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *J Cell Biol* **134**: 715-729
- Ruhrberg C, Watt FM (1997) The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 392-397.
- Ruhrberg C, Williamson JA, Sheer D, Watt FM (1996b) Chromosomal localisation of the human envoplakin gene (EVPL) to the region of the tylosis oesophageal cancer gene (TOCG) on 17q25. *Genomics* **37**: 381-385
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Aparicio P, Martinez de Velasco AM, Niessen CM, Borradori L, Kuikman I, Hulsman EH, Fassler R, Owaribe K, Sonnenberg A (1997) The subcellular distribution of the high molecular mass protein, HD1, is determined by the cytoplasmic domain of the integrin beta 4 subunit. *J Cell Sci* **110** (Pt 2): 169-178
- Schaapveld RQ, Borradori L, Geerts D, van Leusden MR, Kuikman I, Nievers MG, Niessen CM, Steenbergen RD, Snijders PJ, Sonnenberg A (1998) Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol* **142**: 271-284.
- Schneider TR, Sheldrick GM (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1772-1779
- Schomaker V, Trueblood KN (1968) On the rigid-body motion of molecules in crystals. *Acta Cryst* **B24**: 63-76

Capítulo 7

Schroder GF, Levitt M, Brunger AT (2010) Super-resolution biomolecular crystallography with low-resolution data. *Nature* **464**: 1218-1222

Schroder R, Warlo I, Herrmann H, van der Ven PF, Klasen C, Blumcke I, Mundegar RR, Furst DO, Goebel HH, Magin TM (1999) Immunogold EM reveals a close association of plectin and the desmin cytoskeleton in human skeletal muscle. *Eur J Cell Biol* **78**: 288-295

Schwarz EM, Benzer S (1997) Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10249-10254

Schwarzenbacher R, Godzik A, Grzechnik SK, Jaroszewski L (2004) The importance of alignment accuracy for molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 1229-1236

Seifert GJ, Lawson D, Wiche G (1992) Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers. *Eur J Cell Biol* **59**: 138-147.

Sevcik J, Urbanikova L, Kost'an J, Janda L, Wiche G (2004) Actin-binding domain of mouse plectin. Crystal structure and binding to vimentin. *Eur J Biochem* **271**: 1873-1884

Sheldrick GM (2002) Macromolecular phasing with SHELXE. *Z Kristallogr* **217**: 644-650

Sheldrick GM, Schneider TR (1997) SHELXL: High Resolution Refinement. *Methods Enzymol* **277**: 319-343

Simon M, Green H (1984) Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. *Cell* **36**: 827-834

Smith EA, Fuchs E (1998) Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* **141**: 1229-1241

Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, Daams H, van der Raaij-Helmer LM, Falcioni R, Kennel SJ, Aplin JD, Baker J, Loizidou M, et al. (1991) Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol* **113**: 907-917

Sonnenberg A, Rojas AM, de Pereda JM (2007) The structure of a tandem pair of spectrin repeats of plectin reveals a modular organization of the plakin domain. *J Mol Biol* **368**: 1379-1391

Spazierer D, Fuchs P, Proll V, Janda L, Oehler S, Fischer I, Hauptmann R, Wiche G (2003) Epiplakin gene analysis in mouse reveals a single exon encoding a 725-kDa protein with expression restricted to epithelial tissues. *J Biol Chem* **278**: 31657-31666

Spinardi L, Ren YL, Sanders R, Giancotti FG (1993) The beta 4 subunit cytoplasmic domain mediates the interaction of alpha 6 beta 4 integrin with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *Mol Biol Cell* **4**: 871-884

Spurny R, Abdourahman K, Janda L, Runzler D, Kohler G, Castanon MJ, Wiche G (2007) Oxidation and nitrosylation of cysteines proximal to the intermediate filament (IF)-binding site of plectin: effects on structure and vimentin binding and involvement in IF collapse. *J Biol Chem* **282**: 8175-8187

Stabach PR, Simonovic I, Ranieri MA, Aboodi MS, Steitz TA, Simonovic M, Morrow JS (2009) The structure of the ankyrin-binding site of beta-spectrin reveals how tandem spectrin-repeats generate unique ligand-binding properties. *Blood* **113**: 5377-5384

Stanley JR (1993) Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. *Advances in immunology* **53**: 291-325

Stanley JR, Tanaka T, Mueller S, Klaus-Kovtun V, Roop D (1988) Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. *The Journal of clinical investigation* **82**: 1864-1870

Stappenbeck TS, Bornslaeger EA, Corcoran CM, Luu HH, Virata ML, Green KJ (1993) Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filament networks. *J Cell Biol* **123**: 691-705

Steinbock FA, Nikolic B, Coulombe PA, Fuchs E, Traub P, Wiche G (2000) Dose-dependent linkage, assembly inhibition and disassembly of vimentin and cytokeratin 5/14 filaments through plectin's intermediate filament-binding domain. *J Cell Sci* **113**: 483-491.

Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD (1999) A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem* **274**: 9881-9890

Stepp MA, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Elwell J, Gipson IK (1990) Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8970-8974

Sterk LM, Geuijen CA, Oomen LC, Calafat J, Janssen H, Sonnenberg A (2000) The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* **149**: 969-982

Stradal T, Kranewitter W, Winder SJ, Gimona M (1998) CH domains revisited. *FEBS Lett* **431**: 134-137.

Sun D, Leung CL, Liem RK (2001) Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J Cell Sci* **114**: 161-172

Suzuki S, Naitoh Y (1990) Amino acid sequence of a novel integrin beta 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *Embo J* **9**: 757-763.

Svergun D (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of applied crystallography* **25**: 495-503

Svergun D, Barberato C, Koch MHJ (1995) CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *Journal of applied crystallography* **28**: 768-773

Capítulo 7

Svitkina TM, Verkhovsky AB, Borisy GG (1996) Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **135**: 991-1007.

Takizawa Y, Shimizu H, Nishikawa T, Hatta N, Pulkkinen L, Uitto J (1997) Novel ITGB4 mutations in a patient with junctional epidermolysis bullosa-pyloric atresia syndrome and altered basement membrane zone immunofluorescence for the alpha6beta4 integrin. *J Invest Dermatol* **108**: 943-946

Tamura RN, Rozzo C, Starr L, Chambers J, Reichardt LF, Cooper HM, Quaranta V (1990) Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4. *J Cell Biol* **111**: 1593-1604.

Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB (2010) Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol* **20**: 79-91

Tong L, Rossmann MG (1997) Rotation function calculations with GLRF program. *Methods Enzymol* **276**: 594-611

Tsuruta D, Hopkinson SB, Jones JC (2003) Hemidesmosome protein dynamics in live epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **54**: 122-134

Uitto J, Pulkkinen L, Smith FJ, McLean WH (1996) Plectin and human genetic disorders of the skin and muscle. The paradigm of epidermolysis bullosa with muscular dystrophy. *Exp Dermatol* **5**: 237-246.

Vactor DV, Sink H, Fambrough D, Tsou R, Goodman CS (1993) Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* **73**: 1137-1153

Vagin A, Teplyakov A (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst* **30**: 1022-1025.

van der Flier A, Sonnenberg A (2001) Function and interactions of integrins. *Cell and tissue research* **305**: 285-298

Vidal F, Aberdam D, Miquel C, Christiano AM, Pulkkinen L, Uitto J, Ortonne JP, Meneguzzi G (1995) Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nat Genet* **10**: 229-234.

Virata ML, Wagner RM, Parry DA, Green KJ (1992) Molecular structure of the human desmoplakin I and II amino terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 544-548

Volkov VV, Svergun D (2003) Uniqueness of ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of applied crystallography* **36**: 860-864

Wiche G (1998a) Domain structure and transcript diversity of plectin. *The Biological bulletin* **194**: 381-382; discussion 383

Wiche G (1998b) Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* **111**: 2477-2486.

Wiche G, Baker MA (1982) Cytoplasmic network arrays demonstrated by immunolocalization using antibodies to a high molecular weight protein present in cytoskeletal preparations from cultured cells. *Exp Cell Res* **138**: 15-29

Wiche G, Becker B, Luber K, Weitzer G, Castanon MJ, Hauptmann R, Stratowa C, Stewart M (1991) Cloning and sequencing of rat plectin indicates a 466-kD polypeptide chain with a three-domain structure based on a central alpha-helical coiled coil. *J Cell Biol* **114**: 83-99

Wiche G, Krepler R, Artlieb U, Pytela R, Aberer W (1984) Identification of plectin in different human cell types and immunolocalization at epithelial basal cell surface membranes. *Exp Cell Res* **155**: 43-49

Wiche G, Krepler R, Artlieb U, Pytela R, Denk H (1983) Occurrence and immunolocalization of plectin in tissues. *J Cell Biol* **97**: 887-901

Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, Sonnenberg A (2005) Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol* **171**: 799-810

Wilhelmsen K, Litjens SH, Sonnenberg A (2006) Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **26**: 2877-2886

Winn MD, Isupov MN, Murshudov GN (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**: 122-133

Witcher LL, Collins R, Puttagunta S, Mechanic SE, Munson M, Gumbiner B, Cowin P (1996) Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *J Biol Chem* **271**: 10904-10909

Wriggers W, Milligan RA, McCammon JA (1999) Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J Struct Biol* **125**: 185-195

Yan Y, Winograd E, Viel A, Cronin T, Harrison SC, Branton D (1993) Crystal structure of the repetitive segments of spectrin. *Science* **262**: 2027-2030

Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* **2003**: RE8