

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA Departamento de
Microbiología II



ACTIVACIÓN CONFORMACIONAL INDUCIDA POR DNA
DE LA PROTEÍNA RepA: ESTUDIOS MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cristina Lucía Dávila Fajardo

Bajo la dirección de los doctores:
Rafael Giraldo Suárez, Pilar Lillo Villalobos

Madrid, 2010

• ISBN: 978-84-693-2380-9

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Dpto. Microbiología II

**Activación conformacional inducida por DNA de
la proteína iniciadora de la replicación RepA:
Estudios mediante espectroscopia de
fluorescencia**

Tesis Doctoral

Cristina Lucía Dávila Fajardo

Madrid 2006

**Memoria presentada por Cristina Lucía Dávila Fajardo para
optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad
Complutense de Madrid.**

**Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigaciones
Biológicas (CIB-CSIC) bajo la dirección del
Dr. Rafael Giraldo Suárez y la Dra. Pilar Lillo Villalobos.**

***A mis padres,
Jose Augusto y Lucía***

Ítaca te ha dado el bello viaje,
no tiene ya nada más que darte.
Y si la encuentras pobre,
sabio como ahora eres gracias a tantas experiencias,
sabrás entender lo que significan las Ítacas

Kavafis

Agradecimientos

El final de una etapa marca el inicio de una nueva. Esta última en mi vida, el periodo de Tesis Doctoral, está llegando a su fin. En estas líneas quiero agradecer a todas aquellas personas que, de una manera u otra, pintaron conmigo de colores un cuadro que inicialmente estaba por pintar.

En primer lugar a mis directores de Tesis, Rafa y Pilar. En estos años he aprendido mucho de vosotros. Me enseñasteis a pintar con los colores de la fuerza y el tesón, y siempre supisteis darme ánimos y buscar salidas cuando la situación se tornaba oscura.

A Elena y Ramón, siempre os recordaré por tener un espíritu optimista y juvenil. Frases como: “Cristina, eso está por debajo de tus posibilidades”, o “Triunfarás”, me animaron muchísimo en los momentos en los que ni siquiera yo confiaba en que algo saldría. Elena, gracias por acogerme en tu laboratorio, en el antiguo CIB y en el nuevo, y por demostrarme siempre tu interés y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio, a los que ya se fueron: Marc, Ana, Belén, Sandra, con los que compartí tan buenos momentos en los primeros años de Tesis, y a los que ya estaban o han ido llegando; los del 347: Alicia (¡¡gracias por ayudarme con el formato de esta Tesis!!), María, Fátima y Ana Serrano, por encontrar palabras de apoyo que demostraron siempre muy buen compañerismo. Y a los del 345: a mi amigo Juan, por haberme dado su amistad que tanto aprecio, a Eli, por la fuerza que transmites, y a Ana María, por esa sonrisa que contagia tanta alegría.

A todas las personas del CIB que he tenido el gusto de conocer en estos años; los becarios de Germán: Pilar y Jose Manuel, los becarios de Flora, a Isabel y Cristina, por cuidar del labo mejor que nosotros mismos. A los servicios generales del CIB: Alicia del MALDI, Carlos de la ultra, al servicio técnico, compras, almacén, centralita, biblioteca..., porque nos atendéis siempre a todos con una sonrisa y hacéis que el centro sea mucho más agradable.

A mis compañeras de piso: Manoli, Silvia y Laura, por el apoyo que siempre me disteis y por crear un buen ambiente de convivencia.

A mis amigas doctoras de Granada: Olga, Cristina, Espe, Patri, Susana, y a sus respectivos, porque a pesar de la distancia nuestra amistad ha ido creciendo y por compartir conmigo los buenos y los malos momentos en la realización de una Tesis Doctoral.

A mis hermanos, Jose Augusto y Raquel, por darme siempre vuestro apoyo. Porque no tengo dudas a quién tengo que llamar cuando más lo necesito. ¡¡¡Os he echado mucho de menos aquí en Madrid!!.

Y por supuesto, a mis padres, Jose Augusto y Lucía, ¡¡¡para mí los mejores padres!!!. Mi vocabulario es muy escaso como para expresar lo enormemente agradecida y orgullosa que estoy de vosotros. Habéis puesto en mi cuadro todos los colores del arco iris, los que estaban y los que faltaban, y conseguisteis que todo tuviera sentido. Gracias por haberme dado vuestro apoyo incondicional en esta aventura que fue venirme a Madrid hace cuatro años. Gracias por darme los mejores regalos que un ser humano pude recibir: la Vida y una hermosa familia con la que compartirla. Por todo esto, esta Tesis está dedicada a vosotros.

Indice

1. Introducción	1
1.1 Sistema biológico objeto de estudio	3
1.1.1 Plásmidos	3
1.1.2 Proteínas iniciadoras de la replicación (Rep). Mecanismos de activación	5
1.1.3 El plásmido pPS10 y su proteína de replicación (RepA)	7
1.1.4 Estructura cristalina del dominio N-terminal de RepA	9
1.1.5 Transformación estructural de dRepA en monómeros	11
1.1.6 Efecto alostérico de la unión de la secuencia del iterón en la conformación y en el estado de asociación de RepA	15
1.2 Introducción a los métodos de fluorescencia	17
1.2.1 Fluorescencia intrínseca del triptófano	18
1.2.2 Despolarización de fluorescencia por rotación browniana en disolución. Dinámica local y global	20
1.2.3 Definición de anisotropía de fluorescencia	20
1.2.4 Emisión de fluorescencia polarizada. Concepto de fotoselección	21
1.2.5 Despolarización de fluorescencia	22
1.2.6 Procesos de transferencia de energía no radiativa (FRET)	24
1.2.6.1 Efecto de la transferencia de energía en la anisotropía de fluorescencia	25
2. Objetivos	27
3. Materiales y métodos	31
3.1 Materiales	33
3.1.1 Estirpes bacterianas	33
3.1.2 Plásmidos	33
3.1.3 Oligonucleótidos	34
3.1.4 Productos químicos y otros materiales	35
3.1.5 Enzimas para Biología Molecular	35

3.2 Métodos	35
3.2.1 Cultivos bacterianos	35
3.2.1.1 Conservación en células procariotas	36
3.2.2 Métodos relativos al DNA	36
3.2.2.1 Transformación con DNA plasmídico	36
3.2.2.2 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico	36
3.2.2.3 Marcaje de los fragmentos de DNA y cálculo de concentraciones	37
3.2.2.4 Electroforesis del DNA	38
3.2.2.5 PCR y mutagénesis dirigida	38
3.2.2.6 Construcción del plásmido pRG-recA-NHis-RepA-R93C	39
3.2.2.7 Secuenciación del DNA	39
3.2.3 Métodos relativos a las proteínas	39
3.2.3.1 Sobreproducción y purificación de las proteínas His6-RepA-WT y sus versiones mutadas	39
3.2.3.2 Determinación de la concentración de proteínas	39
3.2.3.3 Electroforesis de proteínas	40
3.2.3.4 Marcaje de proteínas con IAEDANS	40
3.2.4 Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible	41
3.2.5 Ultracentrifugación analítica	41
3.2.5.1 Equilibrio de sedimentación	42
3.2.6 Dicroísmo circular (CD)	42
3.2.6.1 Adquisición de espectros y análisis	43
3.2.6.2 Ensayos de desnaturalización térmica	43
3.2.7 Cromatografía de exclusión en gel (FPLC)	43
3.2.8 Espectroscopia de fluorescencia	44
3.2.8.1 En estado estacionario	44
a- Espectros de emisión y excitación	45
b- Cálculo de rendimientos cuánticos de fluorescencia	47
c- Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario	48

3.2.8.2	Con resolución temporal de picosegundos	51
a-	Medida experimental de tiempos de vida media y anisotropía de fluorescencia	52
b-	Análisis numérico de los decaimientos de fluorescencia	53
3.2.8.3	Procesos de transferencia de energía no radiativa (FRET)	55
4.	Resultados	57
A.	Características de la proteína RepA-WT: Fluorescencia intrínseca y estudios de interacción con las secuencias del operador y del iterón	59
4.1	Espectro de absorción	59
4.2	Espectros de emisión y excitación	60
4.3	Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario y fluorescencia en tiempo real de la proteína RepA-WT	61
4.4	Estudio de la unión de la proteína RepA-WT a secuencias de DNA (IR y 1DR)	62
4.4.1	Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario	62
4.4.2	Decaimientos de anisotropía de fluorescencia	64
4.4.3	Espectros de emisión de fluorescencia	66
4.4.4	Decaimientos de intensidad de fluorescencia	67
B.	Estudios de interacción de RepA-WT con las secuencias IR y 1DR	68
4.5	Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario	69
4.6	Tiempos de vida media de fluorescencia	72
4.7	Estudios de la interacción entre un mutante monomérico (RepA-R93C) y 1DR	74
4.7.1	Expresión del mutante RepA-R93C	74
4.7.2	Determinación del estado de asociación de RepA-R93C	75
4.7.3	Valoración de la interacción de la proteína RepA-R93C con 1DR	77

C.Efecto de concentraciones elevadas de proteínas no relacionadas en la afinidad de RepA-WT por 1DR	79
4.8 Estudios mediante anisotropía de fluorescencia en estado estacionario	79
4.9 Tiempos de vida media de fluorescencia	82
D.Cambios conformacionales en RepA-WT estudiados mediante FRET	84
4.10 Transferencia de energía no radiativa entre residuos aromáticos de RepA-WT	85
4.10.1 Espectros de emisión	85
4.10.2 Estudios de FRET entre aromáticos a través de la anisotropía	88
4.11 Transferencia de energía no radiativa entre el Trp94 y el residuo C160 marcado covalentemente con IAEDANS de la proteína RepA-WT	90
4.11.1 Diseño de mutantes	90
4.11.2 Obtención y purificación de los mutantes de cisterna C160 y K124	93
4.11.3 Estudio de la estructura de RepA-C160	94
4.11.3.1 Estructura secundaria: espectros de CD y desnaturalización térmica	94
4.11.3.2 Estudios de estructura terciaria: emisión y anisotropía	97
4.11.3.3 Estado de asociación	98
4.11.4 Caracterización espectroscópica del marcaje fluorescente con IAEDANS	99
4.11.4.1 Marcaje de la proteína RepA-C160	99
4.11.4.2 Determinación del R0	100
4.11.5 Cálculo de la eficiencia de transferencia de energía y (R)	101
5. Discusión	107
A. Estudios de la fluorescencia intrínseca del Trp94 de RepA-	109

WT	
B. Bases moleculares de la interacción de RepA-WT con IR y 1DR	109
C. Efecto de la adición de agentes aglomerantes en la afinidad de RepA-WT por 1DR	114
D. Procesos de FRET	116
5.1 Entre aromáticos de RepA-WT	116
5.2 Entre el Trp94 y el IAEDANS	116
6. Conclusiones	121
7. Bibliografía	125

Indice de figuras

- Figura 1** Esquema del replicón básico del plásmido pPS10
- Figura 2** Estructura del dominio WH1 del dímero de RepA
- Figura 3** Comparación del dominio WH1 del dímero de RepA (dRepA) con el monómero de RepE (mRepE)
- Figura 4** Núcleo hidrofóbico del dominio N-terminal de RepA, en forma dimérica (dRepA₁₋₁₂₉) y monomérica (mRepA, dcha)
- Figura 5** Espectros de CD en el ultravioleta lejano de RepA-WT sólo y formando complejos con IR y 1DR
- Figura 6** Estructura del triptófano
- Figura 7** Fluorescencia polarizada emitida por una población fotoseleccionada de fluoróforos
- Figura 8** Relación existente entre la eficiencia de la transferencia de energía y la distancia
- Figura 9** Sonda bifuncional Cy3
- Figura 10** Sonda fluorescente IAEDANS
- Figura 11** Esquema simplificado del fluorímetro SLM 8000D
- Figura 12** Diagrama esquemático de la medida experimental de la anisotropía de fluorescencia
- Figura 13** Esquema óptico de la medida experimental del factor G
- Figura 14** Diagrama esquemático de un sistema de medida de fluorescencia resuelta en el tiempo
- Figura 15** Espectro de absorción de la proteína RepA-WT
- Figura 16** Espectros de excitación y emisión de la proteína RepA-WT
- Figura 17** Variación de la anisotropía en EE de muestras de RepA-WT con IR (A) y 1DR (B) a λ_{exc295} y λ_{em345} nm respectivamente
- Figura 18** Espectros de emisión de fluorescencia de RepA-WT libre y en presencia de los distintos DNAs
- Figura 19** Gel de las secuencias IR, 1DR y NE de una y doble cadena
- Figura 20** Medidas de anisotropía de fluorescencia en EE en el estudio de la interacción de los DNAs-Cy3 con la proteína RepA-WT

- Figura 21** Perfil de elución en FPLC de la proteína RepA-R93C
- Figura 22** Espectro de absorción del mutante RepA-R93C
- Figura 23** Medidas de anisotropía de fluorescencia en EE de los DNAs-Cy3 con la proteína RepA-WT y RepA-R93C
- Figura 24** Medidas de anisotropía de fluorescencia en EE de los DNAs-Cy3 con RepA-WT en condiciones de aglomeración macromolecular inducida por BSA y OA
- Figura 25** Espectros de fluorescencia para RepA-WT sólo (A) y unida a la secuencia del iterón (B)
- Figura 26** Espectro de anisotropía de excitación para la proteína RepA-WT sólo y unida a las secuencias IR y 1DR
- Figura 27** Modelado de la estructura de la proteína RepA-WT
- Figura 28** Geles de inducción a gran escala de las proteínas mutantes RepA-C160 y RepA-K124C
- Figura 29** Cromatograma Ni-IMAC correspondiente a la purificación de la proteína RepA-160C
- Figura 30** Espectros de CD en el UV lejano de las proteínas RepA-WT y RepA-R93C
- Figura 31** Espectros de desnaturalización térmica de RepA-WT y C160
- Figura 32** Espectros de emisión de las proteínas RepA-WT y R93C
- Figura 33** Representación de los espectros de emisión del Trp94 de la proteína C160 y del espectro de absorción del IAEDANS
- Figura 34** Espectros de emisión de fluorescencia de RepA -IAEDANS a la concentración de 1 μ M y con las secuencias IR y 1DR
- Figura 35** Espectros de emisión de fluorescencia de IAEDANS con RepA-WR sólo y en presencia de las secuencias IR y 1DR
- Figura 36** Espectros de excitación de RepA- IAEDANS sola y con las secuencias IR y 1DR

Indice de tablas

Tabla 1	Plásmido empleados en esta Tesis
Tabla 2	Oligonucleótidos
Tabla 3	λ_{exc} y λ_{em} en los distintos espectros
Tabla 4	Parámetros de fluorescencia obtenidos en EE y en resolución temporal
Tabla 5	Parámetros de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de las muestras RepA-WT+DNAs
Tabla 6	Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y $\langle \tau \rangle$ de RepA-WT unida a los distintos DNAs
Tabla 7	Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y $\langle \tau \rangle$ de los DNAs-Cy3 libres y con RepA-WT
Tabla 8	Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y $\langle \tau \rangle$ de las muestras en condiciones aglomeradas
Tabla 9	Distancias Förster (R_0) para que se produzcan fenómenos FRET entre aromáticos de proteínas
Tabla 10	Distancias según nuestro modelado entre el Trp94 y cada uno de los residuos mutados, en el estado dimérico y monomérico
Tabla 11	Parámetros espectroscópicos empleados en la obtención del valor de R_0

Abreviaturas

Amp	Ampicilina
Aprox.	Aproximadamente
β ME	B-mercaptoetanol
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
Cm	Cloramfenicol
C-terminal	Carboxilo terminal
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Sal disódica del ácido etiléndiamino
Fig.	Figura
FPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
His	Histidina
Kn	Kanamicina
M	Molar
Min.	Minutos
nm	Nanometros
n°	Número
OA	Ovoalbúmina
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
Tet	Tetraciclina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild type</i> (tipo silvestre)

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema biológico objeto de estudio

1.1.1 Plásmidos

En la mayoría de las células procariotas podemos encontrar junto con el cromosoma bacteriano uno o varios elementos genéticos extracromosómicos, llamados plásmidos, que presentan replicación autónoma y controlada. No suelen ser esenciales para la viabilidad de las bacterias, pero su presencia hace que éstas obtengan ventajas en determinadas condiciones o ambientes, como son la resistencia a antibióticos, a metales pesados, o la utilización de determinados metabolitos. En su mayoría, los plásmidos se encuentran en forma de DNA circular covalentemente cerrado y adoptan una estructura superenrollada. El control de la replicación se realiza por mecanismos que modulan la frecuencia de inicio de la replicación de tal forma que, como promedio, cada plásmido se copia una vez por ciclo celular, manteniéndose un número constante de copias por célula.

Tres son los mecanismos de replicación de plásmidos de DNA circulares, denominados de desplazamiento de banda, de círculo rodante y de replicación *theta* (del Solar, G. y col., 1998). A pesar del gran interés de los dos primeros, describiremos a continuación la replicación tipo *theta* debido a que el plásmido que nos ocupa copia su material genético a través de este mecanismo y a ser éste el característico de los cromosomas de cualquier organismo.

La replicación *theta*, que transcurre a través de intermediarios de doble cadena cuyo aspecto en micrografías electrónicas se asemeja a dicha letra griega, empieza en el origen (*ori*), que es la mínima región requerida *in cis* para la replicación autónoma del plásmido, y puede ser uni o bidireccional. En general, los plásmidos que replican por este mecanismo, codifican su propia proteína iniciadora denominada Rep. El reconocimiento del origen y la organización del complejo inicial corresponde a estos iniciadores Rep y salvo las excepciones del plásmido R1 (Giraldo, R. y Diaz, R., 1992) y el fago λ (Dodson, M. y col., 1985)

en las que los iniciadores se unen a secuencias inversamente repetidas en los replicones, en el resto de los casos ocurre a través de la unión a secuencias específicas del origen organizadas en repeticiones directas o iterones. El número y el espaciado entre estas secuencias son característicos de cada plásmido. Los iterones del origen suelen disponerse de modo que entre ellos haya una distancia correspondiente a un múltiplo de vuelta de hélice del DNA (10.5pb). La ocupación progresiva de dichas secuencias por la proteína iniciadora conduce a la disposición adyacente de una serie de iniciadores en la misma cara del DNA. Esta organización facilita interacciones proteína-proteína, que conllevan modificaciones topológicas en el DNA (Bramhill, D. y Kornberg, A., 1988b). En los plásmidos P1, F, R6K y pPS10, la proteína iniciadora induce curvatura en el origen tras la unión a los iterones (Kawasaki, Y. y col., 1996; Mukherjee, S. y col., 1985 Díaz-López y cols., en preparación; Mukhopadhyay, G. y Chatteraj, D.K., 1993). La acumulación de curvatura producida por la presencia de varios iterones en fase (Komori, H. y col., 1999); (Krüger, R. y col., 2004), (Díaz-López, y cols, en preparación), favorece interacciones entre las proteínas iniciadoras dando lugar a la formación del complejo nucleoproteico en el origen. Tras la unión de la proteína Rep a sus secuencias específicas en el origen, se produce la apertura de la hebra en una región adyacente rica en A+T. DnaA, la proteína iniciadora de la replicación cromosómica bacteriana, participa en este proceso uniéndose a una o más cajas *dnaA* presentes en estos orígenes plasmídicos (Bramhill, D. y Kornberg, A., 1988a). RepA y DnaA atraen hacia el origen a DnaB (helicasa) que procede a la extensión de la burbuja de replicación separando las hebras del DNA. A estas últimas se unen a tetrámeros de la proteína SSB (proteína de unión a cadena sencilla), estabilizándolas impidiendo la formación de nuevo de la doble hélice. La elongación mediante la síntesis de la nueva cadena por la acción de la DNA polimerasa III, a partir de mRNA cebador sintetizado por DnaG (primasa), completa la primera etapa de inicio de replicación.

1.1.2 Proteínas iniciadoras de la replicación (Rep). Mecanismos de activación

Las proteínas de replicación plasmídicas se encuentran en estado dímérico en solución (García de Viedma, D. y col., 1995);(García de Viedma, D. y col., 1996); (Ingmer, H. y col., 1995), (Ishiai, M. y col., 1994), (DasGupta, a. y col., 1993). Dado que la unión de proteínas a los iterones implica formas monoméricas (con la posible excepción del plásmido R6K), se hace necesaria la transición a monómeros para garantizar la actividad de las proteínas Rep. Esto queda demostrado en replicones como F y pPSC101, en los que la unión a las secuencias repetidas del origen y el inicio de la replicación implica a la forma monomérica de la proteína iniciadora, mientras que los dímeros actúan como represores transcripcionales (Abhyankar, M. y col., 2003);(Ishiai, M. y col., 1994), (Manen, D. y col., 1992)) uniéndose a la secuencia inversamente repetida del operador. En R6K, la situación es compleja, pues los dímeros de la proteína iniciadora π , comparten con los monómeros la capacidad de unirse a los iterones del origen (Urh, M. y col., 1998);(Wu, J. y col., 1997)) probablemente actuando como reguladores de la replicación ((Filutowicz, M. y col., 1986);(Masson, L. y Ray, D.S., 1986); (Germino, J. y Bastia, D., 1983).

En el plásmido P1, los monómeros de la proteína RepA inician la replicación (Wickner, S. y col., 1991). Sin embargo, dado que el promotor del gen *repA* se encuentra incluido en las secuencias directamente repetidas del origen de replicación de P1, la forma monomérica de la proteína actúa a la vez como iniciadora y represora (Chattoraj, D.K. y col., 1985).

Tradicionalmente, la Bioquímica ha estudiado las propiedades de macromoléculas en soluciones diluidas debido tanto a limitaciones en la cantidad de proteína disponible, como a problemas de agregación, que se agravan a concentraciones mayores. Se han revisado un número de sistemas experimentales que apoyan la idea de que la aglomeración inducida por elevada concentración de moléculas

inertes (proteínas, dextranos,...) (“macromolecular crowding”) promueve la asociación entre macromoléculas (Minton, A.P., 2000); (Zimmerman, S.B. y Minton, A.P., 1993). Este fenómeno parece deberse fundamentalmente a la exclusión del volumen disponible en una disolución debido a la ocupación del mismo por el polímero añadido. Se sabe que el comportamiento de una proteína en disolución es diferente a su comportamiento en condiciones de aglomeración macromolecular que tiene una influencia en reacciones y procesos fisiológicamente relevantes, entre los que se incluyen el plegamiento de proteínas y la formación y estabilidad de complejos proteína-proteína o proteína-DNA (Rivas, G. y col., 2004);(van den Berg, B. y col., 1999). Podríamos pues pensar que las interacciones de afinidad reducida RepA-DNA (1DR) deberían estar favorecidas en presencia de aditivos aglomerantes.

Las chaperonas moleculares remodelan el estado de asociación y la estructura de las proteínas Rep de algunos plásmidos haciéndolas competentes como iniciadoras de la replicación. Las chaperonas participan en la replicación del plásmido P1 contribuyendo a la disociación del dímero (Wickner, S. y col., 1994),(Wickner, S. y col., 1992) y/o a la activación de la forma monomérica (Dibbens, J.A. y col., 1997); (Chattoraj, D.K. y col., 1996);(DasGupta, a. y col., 1993). La disociación de dímeros en monómeros activos se ve favorecida por la acción de DnaK, DnaJ y GrpE en presencia de ATP (Sozhamannan, S. y Chattoraj, D.K., 1993); (Wickner, S. y col., 1992) y por ClpA ((Wickner, S. y col., 1994). La chaperona ClpA participa también en la regulación de los niveles de proteína iniciadora RepA de P1 (Hoskins, J.R. y col., 2000a);(Hoskins, J.R. y col., 2000b) ya que se requiere para la degradación proteolítica de los monómeros por la proteasa ClpP (Ishikawa, T. y col., 2001); (Hoskins, J.R. y col., 2000a). De manera semejante, la conversión del dímero de la proteína RepE del plásmido F en su forma monomérica activa en replicación, requiere la acción de las chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE (Kawasaki, Y. y col., 1990). El paso de dímeros a monómeros en la proteína TrfA del plásmido RK2 está promovido por ClpX

(Konieczny, I. y Helinski, D.R., 1997). La replicación *in vitro* e *in vivo* del plásmido R1 requiere DnaK (Giraldo-Suarez, R. y col., 1993). Sin embargo, en el caso del plásmido pPS10 se ha demostrado que es la unión al propio iterón la que dispara la disociación de su proteína Rep (Díaz-Lopez, T. y col., 2003), proponiendo la alternativa de las chaperonas como agentes protectores que evitan la agregación de formas intermediarias de transición.

1.1.3 El plásmido pPS10 y su proteína de replicación (RepA)

pPS10 es un plásmido aislado originalmente de *Pseudomonas syringae pv. savastanoi* presente en un tumor de rama de olivo (Nieto, C. y col., 1992). Su rango de huésped queda limitado a Pseudomonadáceas como *P.syringae* y *P.putida* y *P.aeruginosa* (aproximadamente 15-18 copias por genoma) teniendo un establecimiento defectivo en *E.coli* dependiente de temperatura (Giraldo, R. y Díaz, R., 1992).

La secuencia del replicón de pPS10 (fig.1) consta de 1267pb. Del análisis de la misma (Nieto, C. y col., 1992) se deducen características comunes a otros replicones específicos de bacterias Gram-negativas (Bramhill, D. y Kornberg, A., 1988b), entre ellas la presencia de un gen (*repA*) que codifica una proteína Rep (RepA) y la existencia en el origen de replicación de:

- Una región rica en G+C de unas 100pb de longitud y una región rica en A+T de unos 70pb, en dónde se produciría la apertura de la doble hélice inducida por RepA (Nieto, C. y col., 1992).

- A continuación, se localizan cuatro repeticiones de 22 pb idénticas y directas denominadas iterones (5'GGGTTTAAAGGGGACAGATTCA), similares, aunque con variaciones, a los presentes en otros plásmidos iniciados por proteínas Rep. En general, para un origen plasmídico dado, las secuencias de diferentes iterones no son idénticas, aunque se ajustan a un consenso y presentan un espaciado variable. Los cuatro iterones del plásmido pPS10 son, sin embargo,

idénticos y contiguos. (Nieto, C. y col., 1992); revisado en (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004).

-Una caja dnaA (5'ATATCCACA) que sugiere la participación de la proteína iniciadora cromosómica DnaA en la replicación de pPS10. Difiere en el primer par de bases del consenso (en negrita) para *E.coli*, y aunque no es esencial, hace eficiente la replicación (Giraldo, R., 1991).

El gen *repA* se encuentra precedido por un promotor cuya región -35 queda rodeada por una secuencia inversamente repetida de 8pb (en negrita):

(5'**GGACAGGG**CATTGACTTGT**CCCTGTCC**). Cada una de estas secuencias comparte homología con 6pb conservados en el extremo 3' de cada iterón (**GGACAG**). (ver más abajo).

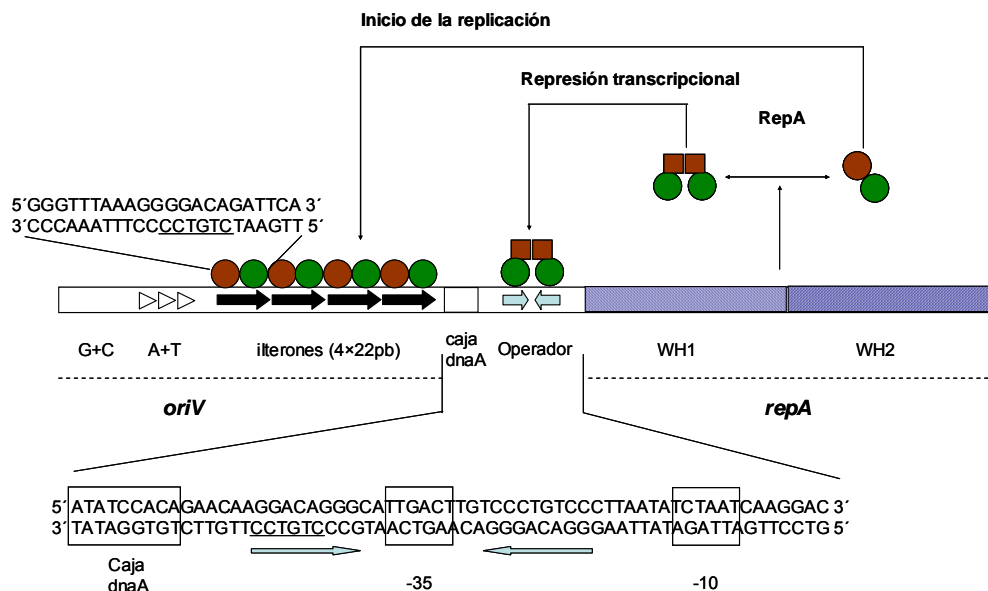


Figura 1. Esquema del replicón básico del plásmido pPS10

El producto del gen *repA*, es la proteína iniciadora del replicón pPS10, RepA (26.7 kDa). Experimentos de “footprinting” demostraron que las secuencias inversamente repetidas actuaban como un operador para los dímeros de RepA regulando su propia síntesis (García de Viedma, D. y col., 1995), mientras que los

monómeros de RepA se unían cooperativamente a los iterones para iniciar así la replicación del DNA (García de Viedma, D. y col., 1996).

El análisis basado en la predicción de estructura secundaria mostró la existencia de un motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión al DNA localizado en el extremo C-terminal (Nieto, C. y col., 1992), responsable de la unión de RepA al operador y a los iterones a través de la secuencia **GGACAG** presente en ambos fragmentos de DNA (García de Viedma, D. y col., 1995). Los elementos de estructura secundaria se encuentran agrupados en dos dominios *Winged-Helix* (WH) (Gajiwala, K., S. y Burley, S.K., 2000) (WH1: residuos 1-132 y WH2: 133-230) que incluyen los motivos HTH (Giraldo, R. y col., 1998); (Komori, H. y col., 1999). En los dímeros, el dominio WH2 se une al operador a través del surco mayor, mientras que los dominios WH1 de cada protómero interactúan entre sí formando la superficie de dimerización de la proteína. El cambio conformacional que experimenta la proteína para pasar de dímero a monómero se resuelve mediante la reestructuración del dominio WH1, capacitándolo para unirse al extremo 5' del iterón, mientras que el WH2 se une al extremo 3' del mismo (Giraldo, R. y col., 1998).

1.1.4 Estructura cristalina del dominio N-terminal de RepA

La estructura del dominio dimérico N-terminal (residuos 1-132) de la proteína RepA (dRepA) (fig.2) fue resuelta a 2.75 Å de resolución en el otoño de 2002. ((Giraldo, R. y col., 2003)). Ambos protómeros son prácticamente idénticos y están constituidos de cinco α -hélices y cinco hebras- β . Las hélices α están organizadas en dos haces contiguos de tres hélices (α_1 - α_2 - α_5 y α_2 - α_3 - α_4), compartiendo ambos la hélice α_2 . La hélice terminal (α_5) se empaqueta entre las hélices α_1 y α_2 . Las hebras β se encuentran agrupadas en dos láminas- β antiparalelas (β_1 - β_5 - β_4 y β_2 - β_3). Las hélices α_2 - α_4 más la primera β -lámina constituyen un dominio WH canónico (Gajiwala, K., S. y Burley, S.K., 2000); (Giraldo, R., 2003).

En la estructura de dRepA, caben ser destacadas la superficie de dimerización y un núcleo hidrofóbico. Las hebras β 1- β 5- β 4 de un protómero y las β 2- β 3 del otro se estructuran a su vez formando una β -lámina antiparalela que constituye la superficie de dimerización. Los múltiples residuos hidrofóbicos que se localizan en α 1 y α 2 contribuyen a la estabilización de la conformación de cada protómero en el dRepA de dos maneras: estableciendo interacciones con α 5 y, junto con el Trp94, formando un núcleo hidrofóbico que mantiene a α 5 entre las hélices α 1 y α 2.

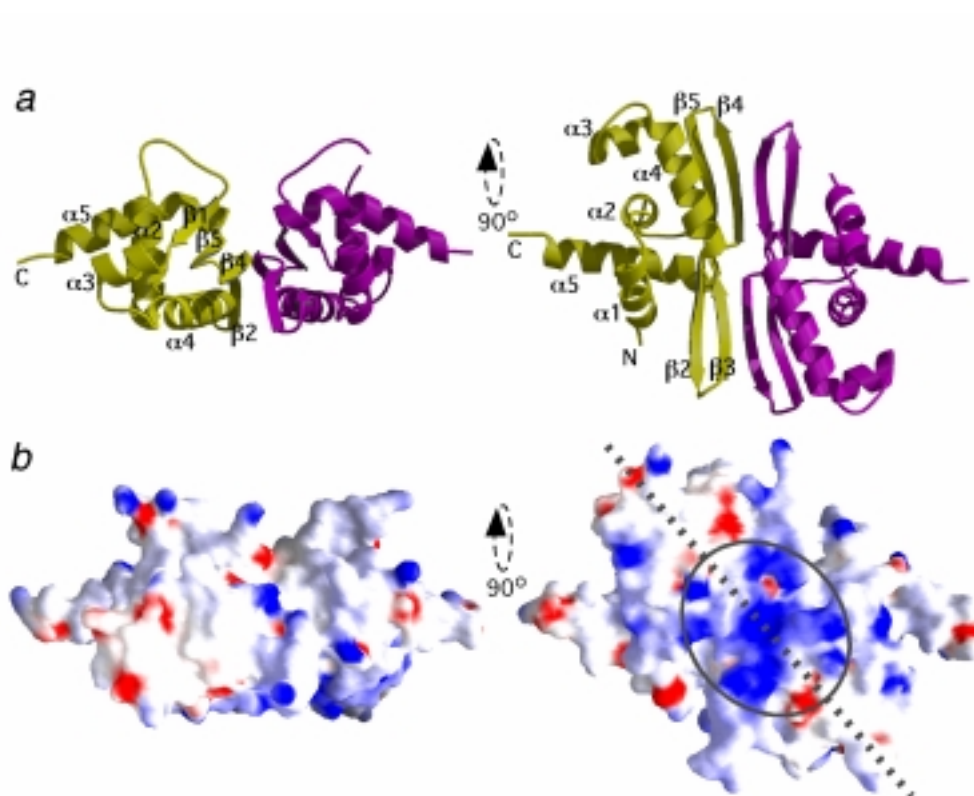


Figura 2. Estructura del dominio WH1 del dímero de RepA. a.- Dos vistas del dímero de RepA, cada uno de los protómeros que forma el dímero se señala con colores diferentes, uno en color morado y el otro en amarillo. b.- Representación del potencial electrostático de la superficie de la molécula. La línea de puntos representa el eje del DNA. El óvalo señala la región electropositiva modelada en contacto con el DNA en el espaciador entre las repeticiones invertidas. Figura tomada de Giraldo y cols. (2003).

1.1.5 Transformación estructural de dRepA en monómeros

Las bases estructurales de la activación de proteínas Rep pueden ser deducidas por comparación de las estructuras del dímero (dRepA) (Giraldo, R., 2003) y del monómero homólogo RepE54 (mRepE) (Komori, H. y col., 1999) dada las similitudes en secuencia (25% de identidad y 42% de conservación) y en elementos de estructura secundaria. Las semejanzas de ambas proteínas con otras proteínas iniciadoras plasmídicas en el nivel de su estructura primaria (Giraldo, R. y col., 2003); (Komori, H. y col., 1999); (del Solar, G. y col., 1998) y de su función (los dímeros actúan como represores y los monómeros activan replicación) permiten generalizar las conclusiones extraídas del estudio comparativo de sus estructuras.

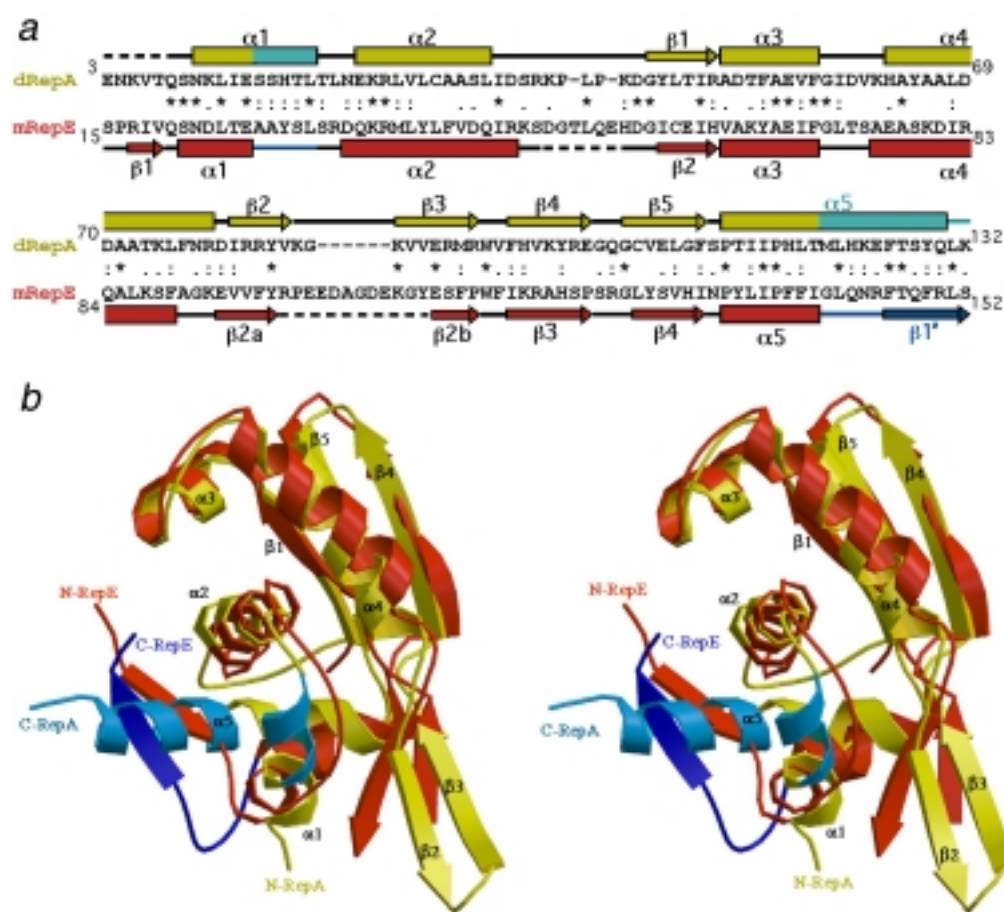


Figura 3. Comparación del dominio WH1 del dímero de RepA (dRepA) y del monómero de RepE (mRepE). a.- Alineamientos de secuencia de dRepA, en amarillo y mRepE, en rojo. Las regiones que corresponden a diferencias en la estructura secundaria se muestran en azul celeste para dRepA y en azul marino para mRepE. b.- Visión estereoscópica de las estructuras de ambos dominios superpuestos. En éstas se pueden observar claramente los cambios estructurales que tienen lugar en la transformación de los dímeros a monómeros activos en iniciación. Figura extraída de (Giraldo, R., 2003).

Las estructuras de dRepA (1 protómero) y mRepE pueden superponerse con una desviación de sus carbonos α (rmsd) de 1.56 Å (82 C α) como consecuencia de su semejanza en las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ y en la lámina $\beta 1$ - $\beta 5$ - $\beta 4$. Sin embargo, se aprecian diferencias evidentes en los elementos de estructura secundaria en los extremos N y C-terminales de ambas proteínas que confirman la existencia de un cambio conformacional que afecta principalmente al dominio WH1 (Giraldo, R. y col., 1998); (Giraldo, R., 2003); revisado en (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004):

1. La lámina $\beta 2a$ - $\beta 2b$ en mRepE está curvada unos 30° con respecto a su posición en dRepA ($\beta 2$ - $\beta 3$). Este movimiento parece ser suficiente para desestabilizar la lámina β -antiparalela en dRepA, responsable de la dimerización, y favorecer así su monomerización.
2. La pequeña lámina β -antiparalela que forman $\beta 1$ y $\beta 1'$ en mRepE y que contribuye al empaquetamiento de ambos dominios WH desaparece en dRepA. $\beta 1'$ se pliega a modo de una extensión de la hélice $\alpha 5$. Esta última se empaqueta entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en dRepA.

En la disociación de los dímeros, la conversión de 16 residuos pertenecientes a dos hélices ($\alpha 5$ y $\alpha 1$) en dos vueltas y una hebra β ($\beta 1'$) involucra al 7% de los residuos de la proteína RepA. Este valor es similar al estimado mediante experimentos de espectroscopia CD (Diaz-Lopez, T. y col., 2003).

El modelado de monómeros de RepA (mRepA) sobre mRepE (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004) (fig.4) nos muestra cómo la hélice $\alpha 2$ se extiende en una vuelta de hélice al monomerizar. Se observa cómo en la transición de dRepA a mRepA disminuye el número de interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales del extremo N-terminal de la hélice $\alpha 5$ (residuos 113-120) y las que se extienden a lo largo de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$: 9 contactos en dRepA frente a 4 en mRepA. Además, las casi tres vueltas extras de

la hélice $\alpha 5$ en dRepA (residuos 121-130) establecen 10 interacciones hidrofóbicas con $\alpha 1$ y $\alpha 2$, las cuales se ven reducidas a 1 tras la transformación estructural de parte de $\alpha 5$ en $\beta 1'$, ya que esta hélice se aleja de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ para formar una lámina- β antiparalela junto con $\beta 1$ (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004).

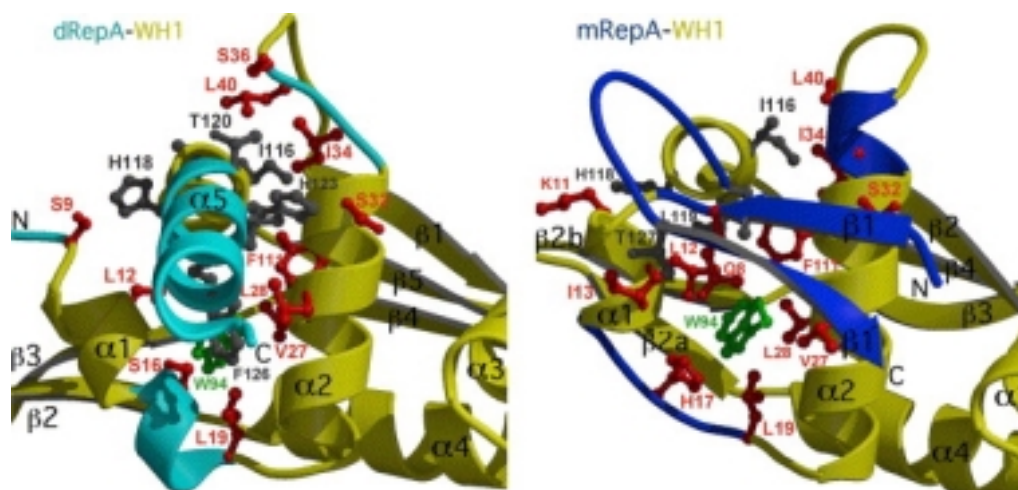


Figura 4. Núcleo hidrofóbico del dominio N-terminal de RepA, en forma dimérica (dRepA, izq.) y monomérica (mRepA, drcha). Los elementos de estructura secundaria que no varían ($\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ y $\beta 1$ - $\beta 5$ - $\beta 4$) se muestran con la misma orientación. La $\alpha 5$ C-terminal en el dímero (celeste) se transforma en una hélice $\alpha 5$ más corta más una $\beta 1'$ (azul oscuro), ambas estructuras se muestran con distintas orientaciones. Se muestran los residuos responsables de las interacciones hidrofóbicas entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (rojo) y $\alpha 5$ (gris). El Trp94 se muestra en color verde.

En general, el plegamiento de WH1 en mRepA resulta ser sustancialmente menos compacto que en dRepA, resultando en un incremento de 1011 \AA^3 en el volumen efectivo del dominio. (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004). Este hecho se correlaciona muy bien con la menor estabilidad térmica que WH1 presenta en mRepA en comparación con dRepA en los ensayos de espectroscopia CD (Giraldo, R. y col., 1998); (Diaz-Lopez, T. y col., 2003).

Además, dicho incremento en volumen está ligado a una mayor exposición de residuos al solvente, lo que explicaría la marcada tendencia de los monómeros a agregar en comparación con los dímeros.

En el servidor “Database of Molecular Movements” (<http://MolMovDB.mbb.yale.edu/molmovdb/>) está depositada una película (morph RepA 457740-15837) en la que se puede apreciar visualmente el cambio conformacional mencionado que experimenta el dominio WH1 de la proteína RepA (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004).

1.1.6 Efecto alostérico de la unión de la secuencia del iterón en la conformación y en el estado de asociación de RepA

Las secuencias del origen de replicación promueven la transición de los dímeros a monómeros (Diaz-Lopez, T. y col., 2003). La unión de RepA a la secuencia de un iterón induce tanto la disociación de la proteína (fig.5) como el cambio conformacional asociado. Los experimentos de dicroísmo circular (Diaz-Lopez, T. y col., 2003) indican que la unión de la proteína al iterón va acompañada de un aumento en el componente β -laminar a expensas del α -helicoidal, incremento que es consistente con el inferido de la comparación de las estructuras del dímero de RepA y del monómero de RepE (Giraldo, R. y col., 2003).

La monomerización y el cambio conformacional de RepA inducidos por el iterón son un ejemplo de efecto alostérico del DNA en una proteína (Lefstin, J.A. y Yamamoto, K.R., 1998). Se han observado otros casos de alosterismo que provocan cambios estructurales en proteínas de unión a DNA (Jen-Jacobson, L. y col., 2000; Spolar, R.S. y Record, M.T., Jr., 1994; Viadin, H. y Aggarwal, A.K., 2000), entre ellas proteínas iniciadoras de virus (Cruickshank, J. y col., 2000; Lima, L.M. y de Prat-Gay, G., 1997) y en el complejo iniciador eucariótico ORC con DNA de simple cadena (Lee, D.G. y col., 2000). Sin embargo, el cambio

conformacional y funcional observado en RepA de pPS10 es el más extenso descrito hasta la fecha en una proteína de unión al DNA y es específico de secuencia, ya que lo induce la del iterón pero no la del operador (Diaz-Lopez, T. y col., 2003).

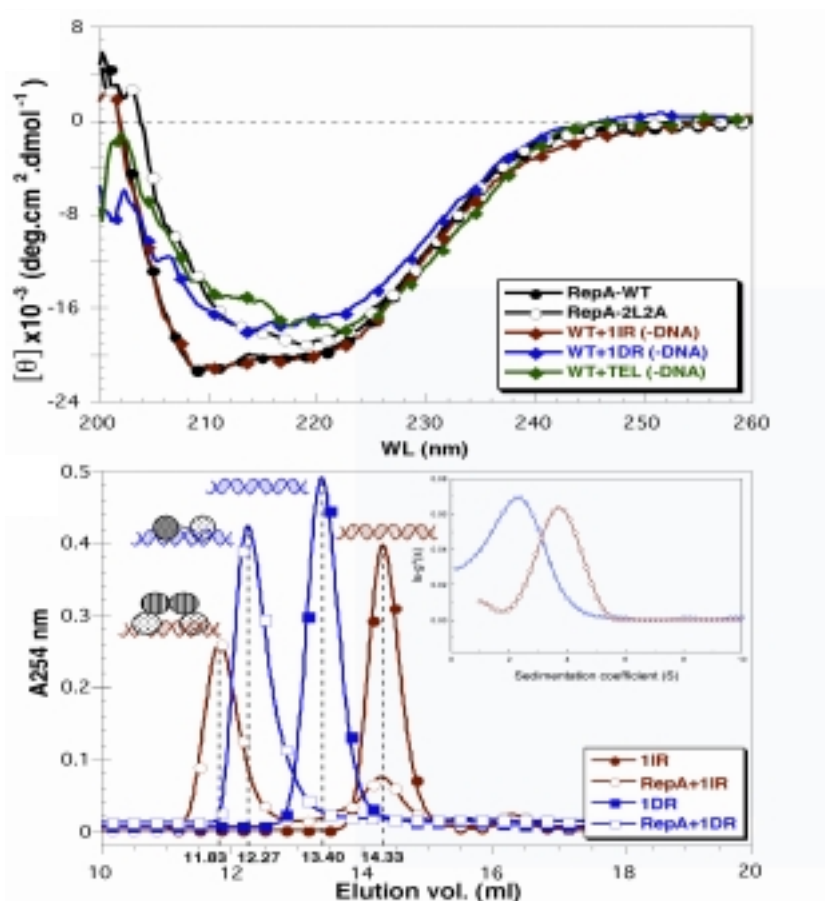


Figura 5. a.-Espectros de CD en el ultravioleta lejano de la proteína RepA-WT sólo y formando complejos con el operador y un iterón a concentraciones equimolares (5 μ M). b.- Perfiles de elución (FPLC) de las secuencias del operador y de un iterón y de sus complejos con cantidades equimolares de RepA-WT; el cuadro pequeño muestra la distribución de los coeficientes de sedimentación para los complejos que forma la proteína RepA-WT con las secuencias del operador y de un iterón. Adaptado de (Diaz-Lopez, T. y col., 2003).

1.2. Introducción a los métodos de fluorescencia

Las alteraciones conformacionales que experimenta la proteína RepA al reconocer las secuencias del operador y del iterón (Díaz-López, T. y col., 2003); (Giraldo, R. y Fernández-Tresguerres, M.E., 2004) requieren ser estudiadas por medio de técnicas estructurales que aporten información sobre aspectos dinámicos. Aunque en la actualidad está en curso el estudio de la transformación estructural mediante NMR, el tamaño relativamente grande de los complejos RepA-DNA y, sobre todo, su reducida solubilidad en el intervalo 0.1-1mM, dificultan notablemente la aplicación de dicha metodología de alta resolución. Sin embargo, la técnica de espectroscopia de fluorescencia es muy útil en estudios de dinámica conformacional de biomoléculas por su alta sensibilidad, su capacidad de respuesta a cambios tanto a nivel local, en el microentorno de la sonda fluorescente, como global, en tiempo real, y con resolución espacial (en el caso de la microscopía de fluorescencia).

En la naturaleza encontramos sustancias que presentan fluorescencia intrínseca como resultado de la presencia de grupos aromáticos en su estructura (triptófano, tirosina, fenilalanina, FMN, etc.). En algunos casos es posible unir a la molécula de interés, covalentemente o no, un fluoróforo extrínseco con el fin de dotar a la molécula de propiedades espectrales adecuadas para un experimento dado.

La fluorescencia es un caso particular de luminiscencia en la que la excitación óptica de un cromóforo y la emisión desde el mismo tienen lugar a través de estados electrónicos singletes.

En los experimentos de fluorescencia, los fluoróforos se comportan como un cronómetro molecular con el que podemos monitorizar sucesos microscópicos y submicroscópicos. El reloj esencialmente comienza a medir con la absorción de un fotón de luz y se detiene con la desactivación del estado excitado a través de la emisión de un fotón o cualquier proceso no radiativo. Según el tiempo que las

moléculas pasen en el estado excitado, tendrán oportunidad o no para interactuar con otras de su microentorno. Como consecuencia, únicamente se van a poder medir aquellos procesos que ocurran durante el tiempo de vida del estado excitado. Los tiempos de vida media de fluorescencia de los fluoróforos utilizados comúnmente suelen ser del orden de 0.5-20 ns. La escala de tiempos de la fluorescencia coincide con la zona de tiempos de muchos sucesos biológicos.

Los observables en un experimento de fluorescencia son la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y emisión dadas (fijas), los espectros de emisión y excitación, y la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo.

1.2.1 Fluorescencia intrínseca del triptófano

El triptófano es un aminoácido natural cuya cadena lateral contiene un grupo indol sustituido en posición C3:

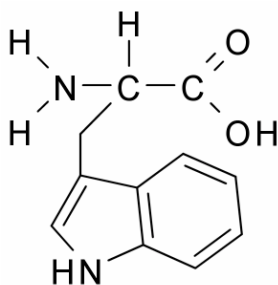


Figura 6. Estructura del Triptófano

Presenta un comportamiento fotofísico complejo, que aunque limita en muchos casos su utilización como sonda fluorescente en distintos sistemas biológicos, siempre representa un buen punto de partida en la caracterización de las proteínas nativas no marcadas.

El máximo de emisión del triptófano en medios acuosos está en torno a 350 nm y presenta una fuerte dependencia con la polaridad del medio y su microentorno, por lo que su espectro de emisión nos informa sobre la localización de este residuo en la proteína. La presencia de múltiples residuos de triptófano en una proteína complica la interpretación de los resultados ya que no siempre es fácil separar las contribuciones de cada uno de ellos al espectro de emisión.

Otra característica importante de la emisión del triptófano es su dependencia con la temperatura cuando se encuentra en disolventes polares. En disoluciones acuosas, el rendimiento cuántico de su análogo derivado, la N-triptofanoamida (NATA), es 0.14 (Szabo, A.G. y Rayner, D.M., 1980).

Como NATA en disolución acuosa presenta un único tiempo de vida media de fluorescencia, esperaríamos que proteínas como RepA, que contienen un único residuo de Trp, presentarían decaimientos de fluorescencia monoexponenciales. Sin embargo, la mayor parte de estas proteínas presentan decaimientos doble o triexponenciales (multiexponenciales) del tipo:

$$I(t) = (I_0) \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1.1)$$

Donde τ_i son los tiempos de vida media de fluorescencia y α_i los factores preexponenciales, que representan la contribución fraccional de la especie con tiempo de vida media τ_i al decaimiento de intensidad ($\sum \alpha_i = 1$). El origen de este comportamiento no está claro. Basándose en los resultados obtenidos para NATA y para una proteína como la azurina, en la que el único residuo de Trp (Trp48) está localizado en una región muy hidrofóbica, parece que cuando el único residuo de Trp de una proteína se encuentra en un único entorno de la proteína, debería presentar un único tiempo de vida media. Múltiples vidas

medias podrían indicar la coexistencia de diferentes conformaciones de la proteína.

1.2.2 Despolarización de fluorescencia por rotación browniana en disolución. Dinámica local y global

La despolarización de fluorescencia es una herramienta muy útil en la caracterización hidrodinámica de biomoléculas y en el estudio de la mayoría de las interacciones moleculares, como DNA-proteína, proteína-proteína o la unión de antígenos a anticuerpos. A diferencia de otras técnicas, no requiere la separación física de las especies unidas de las libres, permitiendo medir directamente la relación de ligando en ambos estados.

La teoría básica de despolarización de fluorescencia por rotación browniana en disolución fue desarrollada por (Perrin, F., 1926) y la utilización de sondas de polarización extrínsecas para la caracterización hidrodinámica de proteínas fue introducida por Weber (1952).

En este apartado se exponen de manera muy resumida las expresiones que relacionan el grado de polarización de fluorescencia y el tamaño, forma, rigidez/flexibilidad, tiempo de vida media del estado excitado del fluoróforo asociado a la molécula en estudio, así como la temperatura y la viscosidad del medio en el que se encuentran.

1.2.3 Definición de anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia de una solución excitada con luz polarizada linealmente se puede calcular mediante la siguiente expresión (Jablonski, A., 1957):

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1.2)$$

donde I_{\parallel} e I_{\perp} son las componentes de la emisión de fluorescencia en las direcciones paralela y perpendicular respectivamente a la dirección del plano de polarización de excitación. En esta expresión $I_{\parallel}+2I_{\perp}$ es proporcional a la intensidad total de fluorescencia.

1.2.4 Emisión de fluorescencia polarizada. Concepto de fotoselección

Las medidas de anisotropía están basadas en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Cuando una muestra se ilumina con luz polarizada, aquellas moléculas con momento dipolar de absorción alineado paralelamente al vector eléctrico de la luz polarizada de excitación tienen la mayor probabilidad de absorción. Esta probabilidad es proporcional al ángulo que forma el dipolo de absorción de la molécula con la dirección del vector del campo eléctrico de la luz de excitación. Las moléculas fotoseleccionadas están anisotrópicamente distribuidas y, por tanto, mientras se conserve dicha anisotropía, la emisión de fluorescencia de esta población estará polarizada.

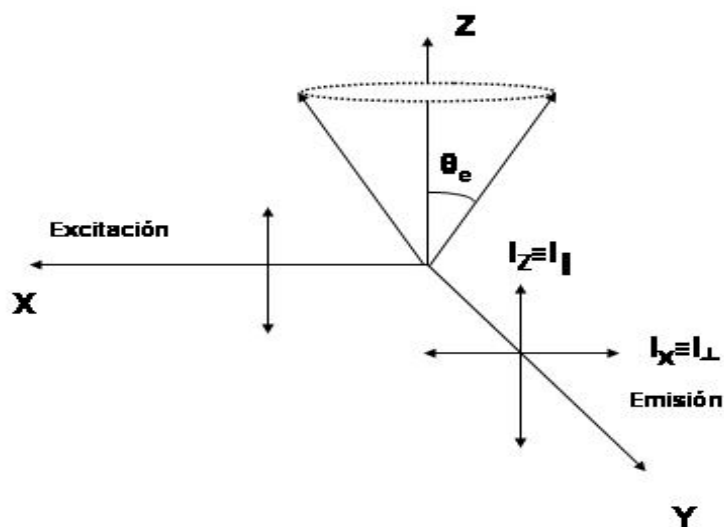


Figura 7. Fluorescencia polarizada emitida por una población fotoseleccionada de fluoróforos. θ_e es el ángulo que forman el momento de transición de la emisión y el eje Z del laboratorio.

1.2.5 Despolarización de fluorescencia

En general, cualquier fenómeno que contribuya a disminuir la orientación inicial del dipolo de emisión durante el tiempo de vida del estado excitado va a dar lugar a una despolarización de fluorescencia emitida. El curso temporal de la despolarización de fluorescencia depende de la interacción entre dos factores, el intervalo de tiempo transcurrido entre la excitación y la emisión (tiempo de vida media de fluorescencia, τ) y la velocidad de rotación de las moléculas fluorescentes (tiempo de correlación rotacional, ϕ). Si $\tau \ll \phi$, la intensidad de fluorescencia decae antes de que se produzca una disminución significativa de la anisotropía y no es posible obtener información dinámica.

Si $\tau \gg \phi$, se produce el efecto contrario y la emisión de fluorescencia estará totalmente despolarizada.

Las condiciones experimentales que permiten estudiar con más detalle la interacción entre ambos fenómenos (emisión de fluorescencia y rotación browniana), serán lógicamente aquellas para las que $\tau \sim \phi$. El límite se encuentra en $\phi < 10\tau$.

Para una proteína globular compacta con un fluoróforo (intrínseco o no) unido rígidamente a la misma, con un único tiempo de vida media de fluorescencia, las componentes de la intensidad de fluorescencia polarizada paralela y perpendicularmente se expresan en función de la disminución de anisotropía con el tiempo $r(t)$ según las expresiones siguientes:

$$I_{\parallel}(t) = (i_0)/3[1+2r(t)]\exp(-t/\tau) \quad (1.3)$$

$$I_{\perp}(t) = (i_0)/3[1-r(t)]\exp(-t/\tau) \quad (1.4)$$

Donde

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\phi) \quad (1.5)$$

$$I(t) = I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t) = i_0 \exp(-t/\tau) \quad (1.6)$$

En los casos en los que el residuo de Trp presenta movimientos internos del propio residuo y/o del segmento de la proteína al que se encuentra unido, el decaimiento de anisotropía vendrá afectado por ambos procesos de despolarización y se puede expresar como:

$$r(t) = r_0 [\beta_L \exp(-t/\phi_L) + \beta_G \exp(-t/\phi_G)] \quad (1.7)$$

donde β_L representa la contribución de los movimientos locales y en general de los procesos fotofísicos resultantes de la interacción con otros residuos vecinos, que dan lugar a una despolarización rápida, con un tiempo de correlación rotacional promedio representado por ϕ_L .

ϕ_G es el tiempo de correlación rotacional correspondiente al movimiento global de la proteína. Se puede relacionar con el volumen hidrodinámico de la esfera equivalente, V_H , a través de la relación de Stokes-Einstein:

$$\phi = \eta V / K T \quad (1.8)$$

donde η es la viscosidad de la disolución, T es la temperatura en grados Kelvin, K es la constante de Boltzman y V es el volumen hidrodinámico de la macromolécula.

El volumen hidrodinámico de una proteína en solución acuosa se puede expresar en función de su masa molecular M , del volumen específico parcial \bar{v} y del grado de hidratación h (Cantor, C. y Schimmel, P., 1980):

$$V = (M/N) (\bar{v} + h) \quad (1.9)$$

La hidratación de una proteína suele tomar valores entre 0.2 y 0.4 gramos de agua por gramo de proteína (Squire, P.G. y Himmel, M.E., 1979). N es el número de Avogadro

1.2.6 Procesos de Transferencia de energía resonante (FRET)

Interacción dependiente de la sexta distancia que se produce en el estado excitado y en la cual la emisión de un fluoróforo está acoplada a la excitación de otro.

La energía de excitación puede ser transferida por medio de un mecanismo no radiativo de acoplamiento dipolo-dipolo a un fluoróforo vecino. Se produce la promoción de un electrón del aceptor a un estado singlete de mayor energía mientras el electrón excitado del donador retorna al estado fundamental.

Los métodos FRET se utilizan para determinar distancias intra e intermoleculares de proteínas y en general complejos macromoleculares en el intervalo de 10-100Å. Aunque las distancias son menos precisas que las determinadas por cristalografía de rayos X o NMR, la técnica de FRET es útil para caracterizar cambios conformacionales en macromoléculas en disolución y en condiciones muy cercanas a las fisiológicas.

La eficiencia de transferencia de energía viene definida por:

$$E=1-F_{da}/F_d \quad (1.10)$$

donde F_{da} y F_d son las intensidades de fluorescencia del donador en presencia del aceptor y del donador sólo respectivamente.

La relación entre la eficiencia de transferencia y la distancia entre el donador y el aceptor (R) viene dada por la ecuación:

$$E= R_0^6/(R_0^6+R^6) \quad (1.11)$$

donde R_0 es la distancia Förster, que es la distancia a la que la eficiencia de transferencia de energía es del 50% o, expresado de otro modo, la distancia a la que el 50% de los donadores excitados son desactivados por FRET. La magnitud de R_0 es dependiente de las propiedades espectrales del donador y aceptor y, por tanto, es característica para cada pareja donador-aceptor y cada sistema biológico.

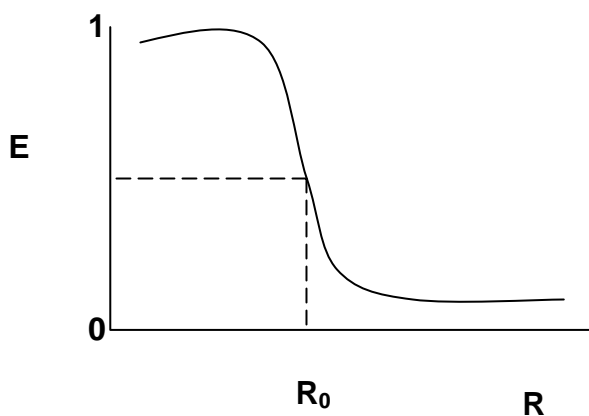


Figura 8. Relación existente entre la eficiencia de la transferencia de energía y la distancia.

1.2.6.1 Efecto de la transferencia de energía en la anisotropía de fluorescencia

La transferencia de energía entre fluoróforos con momentos dipolares orientados formando un determinado ángulo produce un desplazamiento angular adicional del momento de transición de emisión, que da lugar a una disminución de la anisotropía de fluorescencia.

2.-OBJETIVOS

- 1) La unión de la proteína iniciadora de la replicación del plásmido pPS10 (RepA) a las secuencias específicas del operador (IR) y de un iterón (1DR) había sido ya estudiadas en nuestro grupo por técnicas EMSA (Giraldo y cols., 1998).

Uno de los primeros objetivos en este trabajo radicaba en la caracterización espectroscópica del único residuo de triptófano (Trp⁹⁴) de RepA para explorar su potencialidad como sonda: i) en el estudio de la interacción de la proteína con las secuencias del operador y de un iterón en disolución y ii) donador en estudios de transferencia de energía en RepA.

- 2) El estudio de estas interacciones tanto en soluciones ideales como en condiciones de aglomeración macromolecular mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y en resolución temporal empleando una sonda fluorescente extrínseca.
- 3) La estructura del dímero de RepA comparada con la del monómero del iniciador homólogo RepE muestra que la disociación de los dímeros en monómeros lleva consigo un cambio estructural, que se materializa en un incremento en la estructura β -laminar a costa del componente α -helicoidal, compatible con los resultados espectroscópicos obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Díaz-López, 2003; Giraldo y cols., 2003). Asimismo dicho cambio conformacional resulta en una alteración de la compacidad entre los dos dominios de RepA (Giraldo 98; 2004). Por lo tanto, nos propusimos estudiar estos cambios estructurales mediante técnicas FRET que nos permitieran estimar distancias entre el Trp⁹⁴ intrínseco de la proteína RepA (donador) y otros residuos de la misma marcados covalentemente con una sonda fluorescente (aceptor), tanto en el estado dímérico como en el monomérico.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1.-Estirpes bacterianas

● ***E. coli JM109***. F', *traD36*, *pro A⁺B⁺*, *lac^I*, $\Delta(lacZ)M15I$ $\Delta(lac-proAB)$, *glnV4*, *e14-*, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi* *bsdR17*. (Yanisch-Perron, C. y col., 1985).

● ***E. coli CAG629***. F', *lacZ(am)*, *pho(am)*, *lon supC(ts)*, *trp(amp)*, *rpsL*, *rpoH(am)*, *165* φ *hg:Tn10*, *mal(am)*. (New England Biolabs).

● ***E. coli SG22097 (clpXP)***. ClpP::Cm, ClpX::Kn. (Gottesman, S. y Stout, V., 1991).

● ***E. coli XL1-Blue***. *recA1*, *endA1*, *gyrA96* *thi-1*, *bsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*(F', *proAB*, *lac^I* *M15I*, *-proAB* *Tn 10(tet^r)*). (Stratagene).

3.1.2 Plásmidos

El plásmido básico empleado en esta Tesis, y del que derivan el resto de los mismos utilizados en ella, es el pRG-*recA*-NHis-*repA*-WT:

Nombre	Parenteral	Características	Origen
pRG- <i>recA</i> -NHis- <i>repA</i> -WT	pUC18	Am, promotor <i>recA</i> , $\phi 10$ TIR, NHis (His ₆) codifica diana de trombina e incluye sitio SacII	(Giraldo, R. y col., 1998)

Plásmidos mutantes:

Nombre	Mutación
pRG- <i>recA</i> -NHis- <i>repA</i> -C160	C29S, C106S
pRG- <i>recA</i> -NHis- <i>repA</i> -K124C	C29S, C106S, C160S, K124C

Tabla 1. Plásmidos

3.1.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por el Servicio de Química de Proteínas del CIB utilizando un sintetizador 1000M de Beckman.

Los empleados para los estudios de interacción proteína DNA fueron: operador (IR), iterón (1DR) y no específico (NE). El protocolo utilizado para su purificación y para el anillamiento con sus cadenas complementarias está descrito en (Giraldo, R. y col., 1998).

IR (operador): (39-mer)

5'GAACAAGGACAGGGCATTGACTTGTCCCTGTCCCTTAAT-3'

1DR (iterón): (45-mer)

5'ATACCCGGGTTTAAAGGGGACAGATTCAGGCTGTTATCCACACCC-3'

NE (no específico): (45-mer)

5'ATACCCGATCGATGGTAGAGATGACGTAGGCTGTTATCCACACCC-3'.

Este DNA se diseñó de manera que mantiene la misma composición de bases del 1DR pero permutando la secuencia de unión de WH1 y WH2.

Los oligonucleótidos empleados para obtener los mutantes del plásmido pRG-*recA*-NHis-*repA*-WT fueron:

Nombre	Secuencia 5'→ 3'
C106S	TACAGGGAAGGCCAAGGCTCCGTCGAGCTAGGATTTTCTC
C29S	ATGAGAAACGCCTAGTGCTATCCGCTGCGTCTTTGATCGATT
C160S	CAAGCTCAAACAGCGGGAATCCCACTCGCCCAACTGCG
S160C	CAAGCTCAAACAGCGGGAATGCACACTCGCCCAACTGCG
K124C	CGCATCTAACCATGCTGCACTGCGAGTTCACCAGCTATCA

Tabla 2. Oligonucleótidos

3.1.4 Productos químicos y otros materiales

Sales, disolventes orgánicos y otros reactivos analíticos proceden de las casas comerciales Merck, Sigma, Roche, Serva, Aldrich y Probus-Panreac. Los antibióticos ampicilina y cloranfenicol proceden de Roche y la tetraciclina de Sigma. La albúmina de suero bovino (BSA) y la ovoalbúmina empleadas en los ensayos de aglomeración macromolecular, fueron suministradas por Sigma, ambas con una pureza del 99%. La sonda fluorescente CyTM3 amidita con la que se marcaron los DNAs pertenece a la casa comercial Amersham Biosciences. El *Kit* de mutagénesis dirigida del DNA es distribuido por la casa Stratagene. El reactivo fluorescente IAEDANS con el que se marcaron las proteínas fue suministrado por la casa comercial Molecular Probes-Invitrogen.

3.1.5 Enzimas para Biología Molecular

Las enzimas utilizadas fueron suministradas por las casas comerciales: Amersham Biosciences, Roche, New England Biolabs y Promega.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivos bacterianos

Para el crecimiento en medio sólido, las bacterias se incubaron en placas Petri conteniendo LBT-agar (10 g/L bactotripton, 5 g/L extracto de levadura, 1 g/L glucosa, 5 g/L NaCl, y agar 1.5%) en estufa a 30 ó 37° C (según las necesidades de cada estirpe) durante un tiempo aproximado de 15-18 horas.

Para el crecimiento de células en medio líquido destinadas a la expresión de proteínas se utilizaron matraces de vidrio conteniendo medio de cultivo 2xTY (16 g/L bactotripton, 10 g/L levadura, 5 g/L NaCl).

Cuando fue necesario estos medios fueron suplementados con antibióticos para obtener las siguientes concentraciones en cultivo: ampicilina 100 µg/ml, cloranfenicol 30 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml.

3.2.1.1 Conservación de células procariontas

Para la conservación a corto plazo, las estirpes se mantuvieron a 4° C en placas Petri conteniendo LBT-agar.

Para la conservación a largo plazo, se crioconservaron a -80° C, para ello, las bacterias fueron crecidas en medio sólido LBT-agar. Se recuperaron las bacterias con un asa estéril y se resuspendieron en 1 ml de LB + glicerol al 50% (v/v).

3.2.2 Métodos relativos al DNA

3.2.2.1 Preparación de células competentes y transformación de *E.coli* con DNA plasmídico

Para la preparación de células competentes de *E.coli*, se crecieron las diferentes estirpes a sus correspondientes temperaturas hasta una densidad óptica a 600 nm en torno a 0.4 U.A. Se recogieron las células centrifugando a 4° C durante 10 minutos. Tras resuspenderlas en la mitad del volumen inicial con 50mM de Ca₂Cl y dejarlas en hielo durante 30 minutos, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Finalmente se resuspendieron en 1/25 del volumen inicial con 50mM de Ca₂Cl.

Para la transformación de las bacterias competentes preparadas se utilizó el método de choque térmico descrito por (Lederberg, E.M. y Cohen, S.N., 1974)

3.2.2.2 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

Para el aislamiento de DNA plasmídico a escala preparativa se empleó el kit comercial “*High pure plasmid isolation*” de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando se requirió una purificación adicional se utilizó la técnica de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico según (Sambrook, J. y col., 1989). En la purificación del DNA a partir de geles de agarosa las moléculas son separadas por su tamaño mediante electroforesis en gel. Tras su tinción con bromuro de etidio (BrEt), las bandas fueron localizadas por transiluminación con luz ultravioleta y el

fragmento de interés fue escindido con ayuda de una cuchilla. Los fragmentos de interés fueron purificados mediante el Kit comercial *QIAquick gel Extraction Kit* de Qiagen, basado en la unión específica de las moléculas de DNA a gel de sílice, posterior lavado de ésta y elución del DNA en agua

En cuanto a la purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de poliacrilamida, tras la electroforesis, se siguió el protocolo descrito en (Giraldo, R. y col., 1998).

3.2.2.3 Marcaje de los fragmentos de DNAs y cálculo de concentraciones

Para los ensayos de unión de proteína RepA con DNAs, los oligonucleótidos fueron marcados en el extremo 5' de una de las dos hebras de cada dsDNA con una sonda fluorescente: CyTM 3 amidita (Amersham Biosciences)

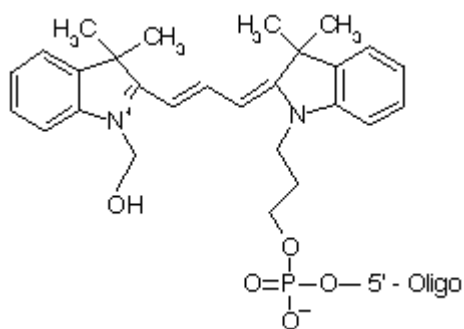


Figura 9. Sonda bifuncional Cy3

CyTM 3 amidita es una indocarbocianina fluorescente que emite en la región amarillo-verde del espectro visible. Presenta máximos de absorción y emisión a 550nm y 570nm respectivamente. Se eligió esta sonda por su alto coeficiente de extinción molar ($150000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y su gran estabilidad de señal frente a cambios en el pH del medio.

Para asegurar que se había producido el anillamiento correctamente se visualizó en gel nativo de PA (10%) muestras (10 μ M) de los distintos DNAs marcados de cadena sencilla junto con los anillados de doble cadena

El cálculo de las concentraciones se llevó a cabo según lo descrito en (Giraldo, R. y col., 1998).

3.2.2.4 Electroforesis del DNA

Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo utilizando tampón TAE (1X: 40mM Tris, 20mM ácido acético, 2mM EDTA). La concentración de agarosa del gel varió dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. En general, se prepararon geles del 0.8 al 1%. Las condiciones electroforéticas fueron de 80 V (que corresponden aproximadamente a 50mA iniciales) a temperatura ambiente.

En el caso de fragmentos de DNA de pequeño tamaño, la electroforesis se realizó en geles verticales de poliacrilamida al 10%. Para estos geles se utilizó tampón TBE (1X: 89mM Tris-borato, 98mM ácido bórico, 2mM EDTA).

En ambos casos los geles se tiñeron con BrEt y después fueron visualizados mediante irradiación con luz ultravioleta.

3.2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y mutagénesis dirigida

Para la obtención de los mutantes puntuales se empleó el kit “*QuikChangeSite-Directed Mutagenesis Kit*” de la casa Stratagene. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante: en la mezcla de reacción (volumen final 50 μ l) se incluyó: dNTPs (0.25mM), DNA molde (100ng), Pfu turbo DNA polimerasa (2.5 U/ μ l) y tampón de reacción del enzima (1X). Los cebadores se añadieron en una cantidad de 125 ng. Tras la desnaturalización inicial de la doble hélice molde, a 95° C durante 5 minutos, se utilizaron 25 ciclos de amplificación compuestos por 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de hibridación a la temperatura adecuada de cada cebador, y 2 minutos de extensión a 72° C. Tras los ciclos de amplificación, siguió una elongación final de 10 minutos a 72° C.

El termociclador utilizado fue el modelo *Mastercycler gradient* de la casa comercial Eppendorf

3.2.2.6 Construcción del plásmido pRG-recA-NHis-RepA-R93C

Para la obtención del vector de expresión del mutante *repA-R93C*, se sustituyó el gen *repA-WT* del plásmido pRG-recA-NHis-RepA-WT (Giraldo, R. y col., 1998) por el fragmento de 700pb resultado de la digestión del plásmido pSBM12 (Maestro, B. y col., 2003) con SacII/HindIII. El producto de ligación se transformó en células competentes de JM109, una estirpe *recA*- que permite mantener y conservar al plásmido en un fondo en el que el promotor *recA* no es inducible.

3.2.2.7 Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), utilizando el ABIPRISM 377 DNA sequencer de la marca Perkin Elmer, que se basa en la utilización de dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos.

3.2.3 Métodos relativos a las proteínas

3.2.3.1 Sobreproducción y purificación de las proteínas His₆-RepA-WT y sus versiones mutadas

Para la sobreproducción y purificación de estas proteínas se siguieron los protocolos de (Giraldo, R. y col., 1998), tanto para las proteínas solubles (RepA-WT, RepA-S160C) como para RepA-R93C, que forma cuerpos de inclusión.

3.2.3.2 Determinación de la concentración de proteínas

El cálculo de la concentración de las proteínas purificadas se realizó a partir de la medida de la absorbancia de las proteínas diluidas en GnHCl 6M. Se utilizó el coeficiente de extinción molar a 280nm calculado según: www.expasy.ch/tools/protparam.html.

Las proteínas BSA y ovoalbúmina se cuantificaron utilizando el *kit* de BioRad basado en el método de (Bradford, M.M., 1976).

3.2.3.3 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida, según el sistema discontinuo descrito por (Laemmli, U.K., 1970). Posteriormente, las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie (Hames, B.D., 1981).

3.2.3.4 Marcaje de proteínas con IAEDANS

Las proteínas se marcaron covalentemente con la sonda fluorescente 5-(2-etilacetamido)aminonaftaleno-1-sulfonato (IAEDANS) por reacción del grupo reactivo de la sonda (iodoacetamido) con los grupos tiol de las proteínas, selectivamente diseñados, para dar los correspondientes tioéteres.

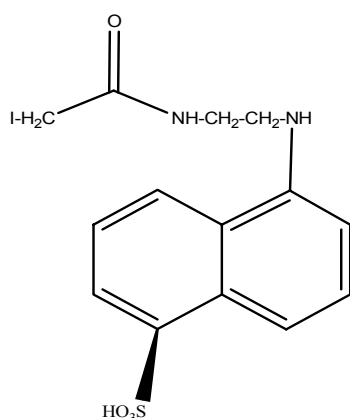


Figura 10. Sonda fluorescente IAEDANS

El protocolo seguido para el marcaje de las proteínas fue el suministrado por la casa comercial Molecular Probes: tras la purificación de la proteína, se dializa frente al tampón de marcaje: 0.5M (NH₄)₂SO₄, 20mM HEPES- pH 7.5. A este pH, los grupos tioles de la proteína son suficientemente nucleofílicos para reaccionar casi exclusivamente con el reactivo (sonda) en presencia de los numerosos grupos amino de la proteína, que están protonados y son muy poco reactivos. Se preparó una disolución concentrada de sonda fluorescente (IAEDANS) en

dimetilformamida (DMF). Se utilizó este disolvente orgánico debido a que la sonda fluorescente es poco soluble en tampones acuosos. La disolución se preparó suficientemente concentrada para que la cantidad de DMF finalmente añadida sobre la disolución de proteína fuera menos de 5% del volumen total. La sonda fluorescente se disolvió en DMF inmediatamente antes de la adición sobre la solución de proteína, ya que los grupos reactivos no son muy estables en solución acuosa. A continuación se añadió un exceso de sonda (20 moles sonda/mol proteína) a la disolución de proteína y se mantuvo en agitación y a 4°C durante 3h. Pasado este tiempo, se añadió un exceso de glutatión para consumir los grupos tioles de la sonda que no hubieran reaccionado. Finalmente, la sonda no reaccionada se separó de la proteína marcada por diálisis exhaustiva (48h). Tras la diálisis se comprobó que el tampón no contenía restos de sonda y se procedió a las medidas de FRET.

3.2.4 Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible

Esta técnica se ha utilizado de forma rutinaria para la determinación de las concentraciones de las muestras estudiadas (proteína, DNA, sondas fluorescentes), para la estimación del grado de marcado de las proteínas con IAEDANS, así como para las medidas de absorbancia de las disoluciones empleadas en la determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia.

Los espectros de absorción se adquirieron en un espectrofluorímetro ultravioleta-visible Varian Cary 3E, de doble haz y doble monocromador (190-900nm \pm 0.2nm) cuya resolución (rendijas) se puede seleccionar en un intervalo de 0.2-10nm. Para las medidas se emplearon cubetas de cuarzo Starna (26.160-F/Q/10/Z8.5) de 2x10 mm. Para controlar la temperatura se empleó un módulo Peltier 1x1 de Varian.

3.2.5 Ultracentrifugación analítica

Estos experimentos fueron realizados con la ayuda del Dr. Carlos Alfonso (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid), utilizando una

ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A equipada con un dispositivo de medida de absorción óptica ultravioleta-visible que permite la selección de longitudes de onda en el intervalo de 200 a 700 nm. Se utilizaron los rotores An60Ti y An50Ti; celdas de doble sector y seis agujeros de ventana de cuarzo de 12 mm de paso óptico.

Las proteínas analizadas con esta técnica fueron dializadas a 4° C frente a 0.25M (NH₄)₂SO₄, 50mM NH₄-acetato pH 6, 0.1mM EDTA, con el fin de evitar interferencias derivadas del uso de componentes presentes en el tampón de almacenamiento, tales como el glicerol, que afecta a la flotación de las proteínas, y el β-mercaptoetanol, que interfiere con la detección espectroscópica.

3.2.5.1 Equilibrio de sedimentación

Volúmenes de 80 µl de muestras con diferentes concentraciones de proteína se colocaron en celdas de 6 canales con 1.2 cm de paso óptico. Los gradientes de equilibrio de sedimentación (Rivas, G. y Minton, A.P., 1993) se formaron a 5° C sometiendo a las muestras a velocidades de 13000 ó 15000 rpm durante un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio (16-24 h.). La absorción radial fue tomada a diferentes longitudes de onda y las líneas base se midieron a 50000 rpm. Los datos se procesaron según lo descrito por (Abril, A.M. y col., 1997).

Para una proteína en solución sometida a un campo centrífugo, el equilibrio de sedimentación se alcanza cuando los efectos opuestos de la fuerza centrífuga y de la difusión se compensan. En el equilibrio, la concentración de la proteína se distribuye a lo largo de la celda de manera diferente aunque dicha distribución se mantiene constante para cada velocidad de centrifugación y depende únicamente de la masa y de la concentración de la proteína, no de su forma. El procesamiento de los datos (ver materiales y métodos) permite calcular el peso molecular, cuyo valor nos da información inmediata sobre el estado de asociación de la misma.

3.2.6 Dicroísmo circular (CD)

Esta técnica espectroscópica (Schmid, F., 1997) se emplea para el estudio de la estructura secundaria promedio de las proteínas. Las medidas fueron realizadas en el ultravioleta lejano, donde los enlaces peptídicos dan señales distintas según estén dispuestos en hélices α , láminas β o en segmentos no periódicos de la estructura.

3.2.6.1 Adquisición de espectros y análisis

Los espectros de dicroísmo circular se adquirieron en un espectropolarímetro Jasco-720 a una temperatura constante de 5°C, regulada mediante un baño termostatzado con agua circulante (Neslab RTE-110).

Las medidas se realizaron a concentraciones de proteína entre 9 y 15 μ M. En tampón 0.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50mM NH_4 -acetato pH 6, 0.1mM EDTA, 5mM β -mercaptoetanol y 10% glicerol. Se emplearon cubetas Hellma de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico (200 μ l de muestra).

El espectro fue adquirido a una velocidad de 20 nm/min, con una anchura de banda de 0.2 nm y haciendo un barrido desde 260 hasta 195 nm. El tiempo de respuesta fue de 4 segundos y se promediaron 5 espectros de cada muestra.

3.2.6.2 Ensayos de desnaturalización térmica

Los ensayos de desnaturalización térmica fueron realizados a las mismas muestras de las que se adquirió su espectro de CD tras cubrirlas con aceite mineral para evitar posibles pérdidas de volumen por evaporación. Los cambios que se producen en la elipticidad (θ) a medida que se incrementaba la temperatura de la celda fueron monitorizados a 222 nm que corresponde con uno de los mínimos característicos de la estructura α -helicoidal. La temperatura se varió entre 5 y 90° C, con un incremento de 0.2° C (20° C/h) mediante un sistema peltier automatizado.

3.2.7 Cromatografía de exclusión en gel (FPLC)

Para la realización de estas medidas se empleó una columna Superdex-200 HR10/30, montada en un equipo ÄKTA basic-10 HPLC (Pharmacia). La columna fue equilibrada con la misma solución empleada para los espectros de CD. Se llevó a cabo a 0.5ml/min, midiendo la absorción del eluido a 280nm y 320 nm.

3.2.8 Espectroscopia de fluorescencia

La técnica de espectroscopia de fluorescencia (en estado estacionario y en resolución temporal) se ha utilizado a lo largo de este trabajo para caracterizar la interacción entre la proteína RepA-WT y los fragmentos de DNA: IR, 1DR y NE, utilizando como sonda el único residuo de triptófano de la proteína o sondas extrínsecas (IAEDANS, Cy3 amidita) con las que se ha marcado la proteína y el DNA, respectivamente. En este último caso se han podido obtener constantes de unión proteína-DNA con resolución nanomolar.

Además, la técnica de transferencia de energía resonante fluorescente nos está permitiendo verificar la transformación estructural de la proteína RepA tras unirse al DNA (1DR) (Giraldo, R. y col., 2003); (Diaz-Lopez, T. y col., 2003); (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004).

3.2.8.1 Espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario

Los espectros de fluorescencia y las medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un espectrofluorímetro SLM 8000D en el modo de conteo de fotones. En la fig.11 se representa un esquema del fluorímetro. La fuente de luz es una lámpara de xenón de alta presión Osram (450W) que emite de forma continua desde 250 nm hasta el infrarrojo, siendo seleccionada la longitud de onda de excitación por medio de un doble monocromador. La intensidad de fluorescencia se mide a 90° de la dirección del haz de excitación.

Las cubetas empleadas en las medidas fueron de cuarzo Starna de 0.2x1 cm El compartimento de las muestras se termostató a 5°C con un baño de agua

(Hetofrig) y la temperatura de la muestra se comprobó con un termopar (Digi-Sense de Cole Parmer).

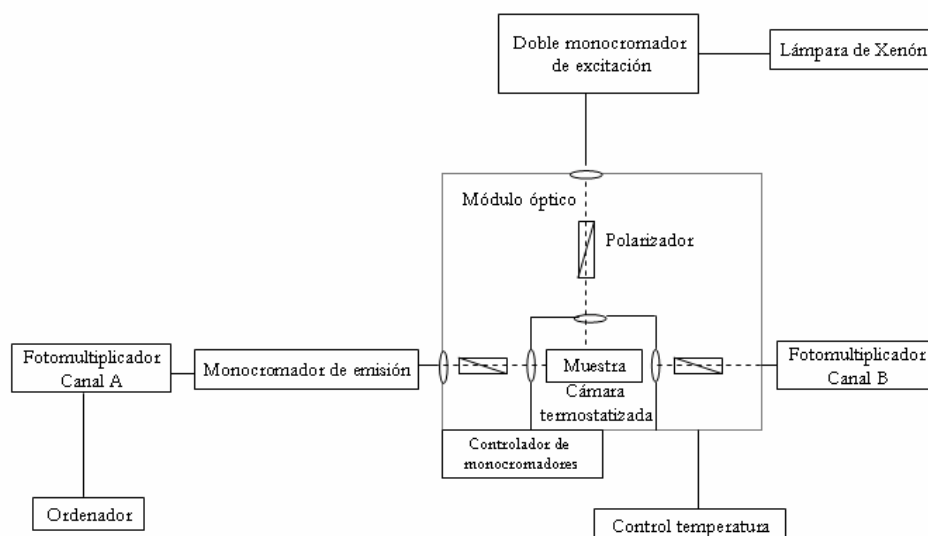


Figura 11. Esquema simplificado del espectrofluorímetro SLM 8000D

En todos los casos los espectros fueron corregidos con los factores de corrección obtenidos para el fluorímetro SLM8000D en el laboratorio (Cañadas, O., 2002). Los observables adquiridos por medio de medidas realizadas en estado estacionario fueron: espectros de emisión y excitación, rendimientos cuánticos de fluorescencia y anisotropía de fluorescencia.

3.2.8.1.a Espectros de emisión y excitación: el espectro de emisión de una sustancia es la representación de la intensidad de fluorescencia emitida a las distintas longitudes de onda de emisión para una longitud de onda de excitación fija. Del mismo modo, la variación en la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación para una longitud de emisión fija constituye el espectro de excitación.

Las longitudes de onda experimentales variaron según la sonda empleada. En la siguiente tabla se recogen estas condiciones:

Sonda	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
Trp94	295	300-450
IAEDANS	336	350-650
Trp94- IAEDANS	295	300-750

Tabla 3. Longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y emisión (λ_{em}) empleadas en las distintas adquisiciones de los espectros

En todos los casos los espectros fueron corregidos con los factores de corrección obtenidos para el fluorímetro en el laboratorio (Cañadas, O., 2002).

Para evitar contribuciones a la intensidad de fluorescencia atribuibles a impurezas fluorescentes presentes en el tampón, en todos los casos se adquirieron espectros de fluorescencia del mismo (fondo) o en su caso disoluciones de proteína o fragmentos de DNA no marcados, en las mismas condiciones que la muestra y fueron restados al espectro de la muestra.

En ausencia de polarizadores, la luz procedente de un fluorímetro de red de difracción, como el empleado en este trabajo, está parcialmente polarizada debido a la presencia del monocromador de excitación. Esto da lugar a que, si la anisotropía de fluorescencia de la muestra es distinta de cero, incluso en ausencia de polarizadores, la emisión puede estar parcialmente polarizada. Esta polarización de fluorescencia puede constituir una fuente significativa de errores sistemáticos en las medidas de intensidad de fluorescencia si el sistema de detección presenta diferente sensibilidad a la luz polarizada vertical y horizontalmente. Esta distorsión debida al efecto de la polarización de la muestra

se ha eliminado experimentalmente excitando a la muestra con luz verticalmente polarizada y midiendo la intensidad de fluorescencia polarizada a 54.7° (ángulo mágico)(Spencer, R.D. y Weber, G., 1970) de la vertical, siendo la señal medida de esta manera proporcional a la intensidad de fluorescencia total.

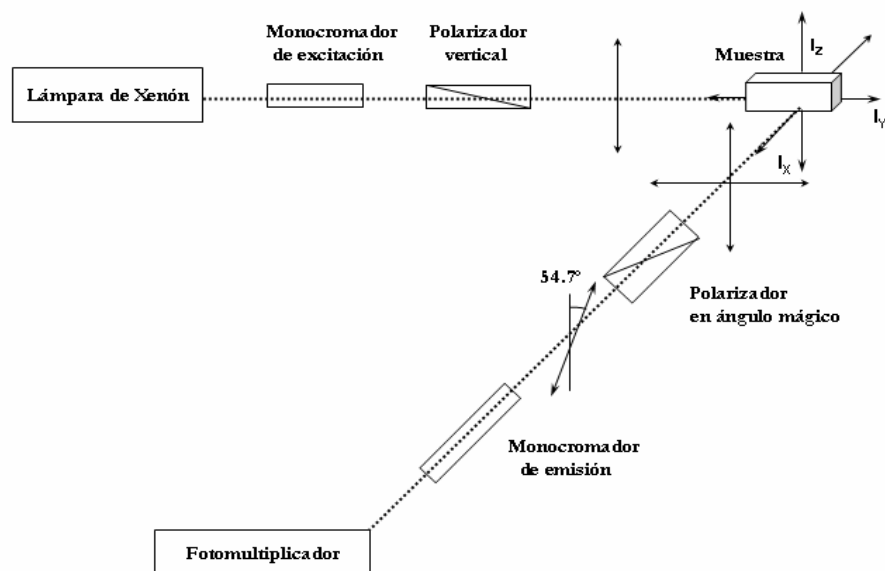


Figura 12. Esquema de una de las configuraciones de los monocromadores de excitación y emisión que permiten la detección de una señal proporcional a la intensidad de fluorescencia total, eliminando los efectos de polarización residual de la intensidad de excitación.

3.2.8.1. b Cálculo de los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ)

En esta tesis las medidas de rendimientos cuánticos de fluorescencia se hicieron con respecto a N-acetilriptofanoamida (NATA)

$$\Phi = \Phi_{\text{nata}} \times \text{área}_{\text{em}} / D.O_{295} \times D.O_{295} / \text{área}_{\text{em}} \quad (3.1)$$

donde Φ_{nata} es 0.14, A_{em} es el área del espectro de emisión de la muestra y $D.O_{295}$ es el valor de absorbancia a la longitud de onda de 295nm (correspondiente al Trp).

3.2.8.1.c Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

Las medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en el fluorímetro SLM 8000 D, al que se le han incorporado polarizadores Glay-Taylor en los canales de emisión y excitación de fluorescencia. Las muestras fueron excitadas con luz polarizada verticalmente y se midieron los componentes de la intensidad de fluorescencia polarizada en las direcciones paralela (I_{\parallel}) y perpendicular (I_{\perp}) al plano de polarización de la luz de excitación (fig) de forma alternada, utilizando el mismo canal de emisión y, por tanto, el mismo fotomultiplicador (forma L).

La anisotropía de fluorescencia se expresa como

$$r = \frac{I_{\parallel} - G I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2G I_{\perp}} \quad (3.2)$$

Esta ecuación difiere de la teórica (1.1) en que se han introducido una corrección debida a la diferente sensibilidad del canal de emisión a la luz polarizada horizontal y verticalmente (factor G). Las intensidades I_{\parallel} y I_{\perp} experimentales proporcionan la anisotropía correcta si el sistema de detección (fotomultiplicador, monocromador y óptica asociada) presenta la misma sensibilidad a la luz polarizada vertical y horizontalmente. En general, en sistemas con el monocromador de emisión de red, esto no ocurre, por lo que se introduce un factor de corrección (el factor G) en la expresión de la anisotropía, que tiene en cuenta esta sensibilidad diferencial. Este factor es función de la longitud de onda de emisión.

$$G = S_V/S_H \quad (3.3)$$

Donde S_V y S_H son las sensibilidades del canal de emisión para la luz polarizada vertical y horizontal respectivamente. Experimentalmente el factor G se determina midiendo la respuesta del detector utilizando una fuente de radiación no polarizada y colocando secuencialmente el polarizador de emisión en las posiciones vertical y horizontal. Una sustancia fluorescente puede actuar como una fuente de luz no polarizada si se excita con luz polarizada horizontalmente. De acuerdo con las propiedades de luz emitida en un proceso de fotoselección, en un instrumento ideal tendríamos que

$$I_{HV} = I_{HH} \quad (3.4)$$

$$\text{y } G = I_{HV}/I_{HH} \quad (3.5)$$

(los subíndices se refieren a las orientaciones de los polarizadores)

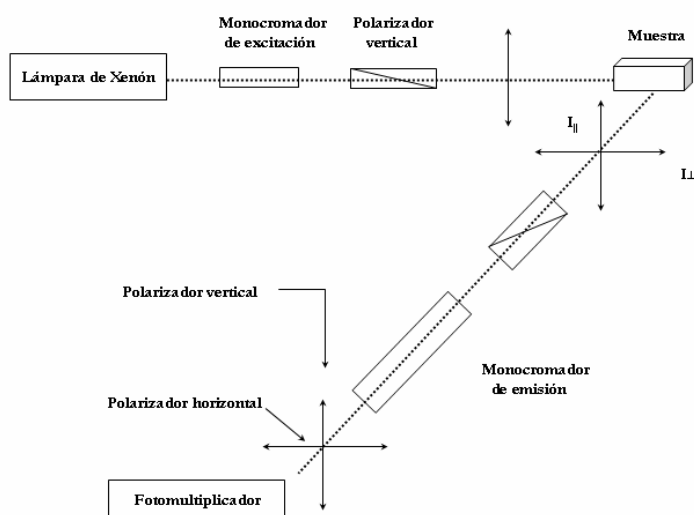


Figura 12. Diagrama esquemático de la medida experimental de la anisotropía de fluorescencia

Si las muestras contienen impurezas fluorescentes, su contribución a las componentes paralela y perpendicular de la intensidad de fluorescencia polarizada debe ser restada para obtener el valor correcto de la anisotropía de fluorescencia

del fluoróforo que estamos estudiando. Para corregir este factor se midió la solución tampón en las mismas condiciones que la muestra. La contribución obtenida se restó a las componentes paralela y perpendicular de la intensidad de fluorescencia emitida por la muestra:

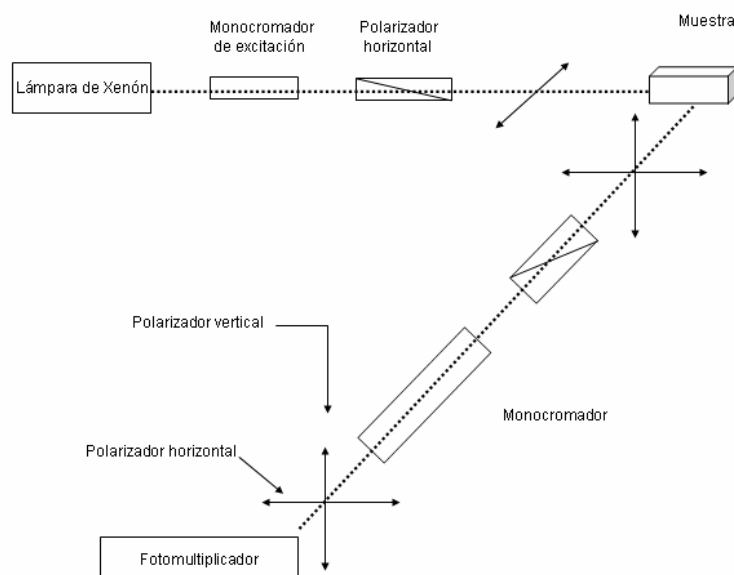
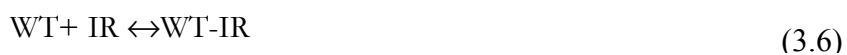


Figura 13. Esquema óptico de la medida experimental del factor G.

Determinación de las constantes de unión a partir de medidas de anisotropía

La curva de unión obtenida para RepA-WT+IR se ajustó para un modelo de dos estados según la reacción:



$$r = B.rB + (1 - B)rF$$

$$B = \frac{[WT - IR]}{[WT]_T} = \frac{\gamma - \sqrt{\gamma^2 - 4[WT]_T [IR]_T}}{2[WT]_T}$$

$$\gamma = K_D + [IR]_T + [WT]_T$$

3.2.8.2 Espectroscopia de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos.

Las medidas se realizaron en el dominio de tiempos y se empleó la técnica de conteo de fotones únicos correlacionados temporalmente (Yguerabide, J., 1972);(Yguerabide, J. y Yguerabide, E., 1984),(Ware, W., 1971), (Birks, J. y Munro, I., 1967); (Lakowicz, J., 1999). Esta técnica consiste en excitar repetidamente (kHz-MHz) la muestra fluorescente con un pulso de luz (ns-ps) y la fluorescencia emitida es atenuada de tal forma que únicamente una fracción inferior al 5% de los fotones emitidos es detectada. La baja probabilidad de detección permite que a partir de la medida repetitiva del intervalo temporal excitación-detección, se pueda construir la curva de evolución temporal de la fluorescencia.

Las cubetas utilizadas fueron NSG Precision cells (3x3mm) El compartimento de la muestra se termostató a 5° C con un baño de agua circulante Hetofrig. La temperatura de la muestra se comprobó con un termopar Digi-Sense de Cole-Parmer.

En la figura 14 se muestra un esquema simplificado de un sistema de medida de fluorescencia con resolución temporal.

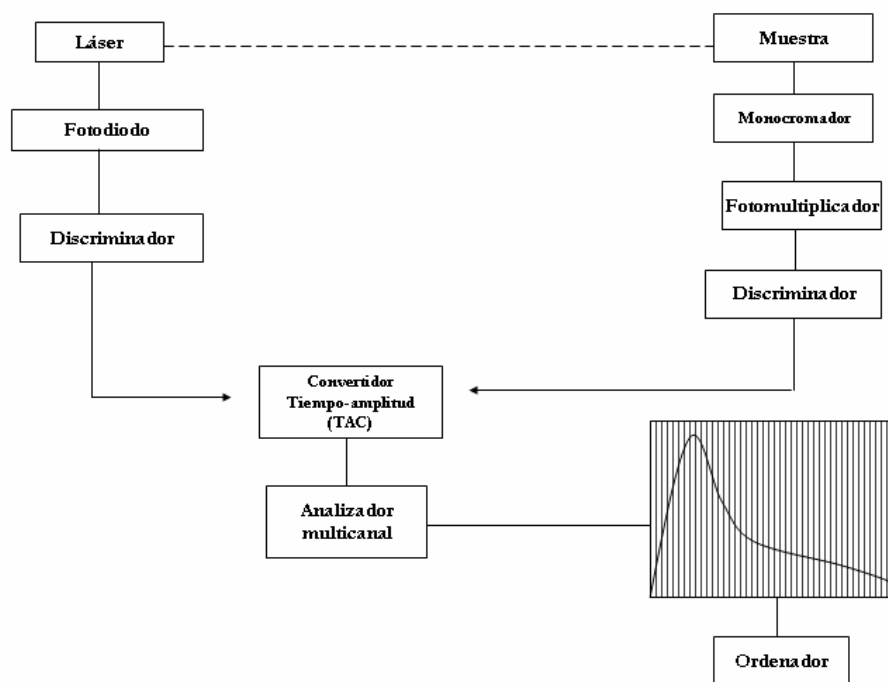


Figura 14. Diagrama esquemático de un sistema de medida de fluorescencia resuelta en el tiempo

3.2.8.2.a Medida experimental de los tiempos de vida media de fluorescencia y de la anisotropía de fluorescencia

Los tiempos de vida media se determinaron a partir de los decaimientos de la intensidad de fluorescencia de la muestra obtenidos excitando con luz polarizada verticalmente y con el polarizador de emisión en posición de ángulo mágico ($I_{54}(t)$ o $I_m(t)$). En el caso de la obtención de decaimientos de anisotropía de fluorescencia, se recogieron alternativamente y durante el mismo tiempo, los decaimientos de las componentes paralela, $I_{\parallel}(t)$, y perpendicular, $I_{\perp}(t)$, de la intensidad de fluorescencia excitando la muestra con luz polarizada verticalmente. Utilizando la luz dispersa emitida por agua mili-Q a la misma longitud de onda de excitación de la muestra, se obtuvo la función de respuesta instrumental del sistema antes y después de cada medida, pero sin ningún filtro de corte.

También se recogieron los decaimientos del tampón en idénticas condiciones a la muestra (incluyendo el filtro de corte), con el fin de eliminar la contribución del fondo.

Se limitó el número máximo de fotones de fluorescencia a 10000-12000 fotones por segundo, correspondientes a la zona lineal de respuesta del detector (excitación 0.8-4Mhz). Con estas condiciones de muestreo se asegura que el número de cuentas en cada canal del MCA sea proporcional a la probabilidad de emisión en el intervalo Δt , en el tiempo $n\Delta t$, donde n es el número de canal.

En los experimentos de despolarización de fluorescencia con resolución temporal el factor G se ha determinado considerando que la anisotropía de fluorescencia de estado estacionario (r) estimada a partir de la integración de los decaimientos de las componentes paralela $I_{\parallel}(t)$ y perpendicular $I_{\perp}(t)$ de la intensidad de fluorescencia, debe coincidir con la determinada utilizando el espectrofluorímetro de estado estacionario, para una misma muestra en idénticas condiciones experimentales:

$$r = \frac{\int I_{\parallel}(t)dt - G \int I_{\perp}(t)dt}{\int I_{\parallel}(t)dt + 2G \int I_{\perp}(t)dt} \quad (3.7)$$

3.2.8.2.b Análisis numérico de los decaimientos de fluorescencia. Técnicas de reconvolución iterativa

Se define la respuesta a un impulso de un sistema, $I(t)$, como la respuesta que se observaría con un instrumento ideal si el sistema se excita con un pulso de luz de duración cero y energía finita (función δ). El pulso de excitación de las fuentes de luz láser utilizadas en los experimentos tiene una cierta duración (unos pocos picosegundos) y, además, el sistema de detección introduce distorsiones de decenas de picosegundos. Por ello, la respuesta de fluorescencia obtenida experimentalmente $I_{\text{exp}}(t)$ es el resultado de la convolución de la respuesta ideal

$i(t)$ con la función de respuesta instrumental $L'(t)$. El grado de deformación en la medida depende de la duración de la función instrumental en relación con las constantes de tiempo del decaimiento de fluorescencia.

Matemáticamente el concepto de convolución se expresa del siguiente modo:

$$I_{\text{exp}}(t) = \int_0^t L'(T)i(t-T)dT \quad (3.8)$$

Donde T es el tiempo de inicio de la respuesta al pulso de excitación.

El decaimiento experimental $I_{\text{exp}}(t)$ es la suma de las respuestas a los impulsos $i(t)$ creadas por todas las funciones δ de excitación (pulsos δ) individuales que ocurren hasta el tiempo T . La función instrumental determinada experimentalmente a la longitud de onda de excitación, $L(t)$, es una buena aproximación a $L'(t)$ siempre y cuando las distorsiones introducidas por el sistema de detección para $L'(t)$ e $I_{\text{exp}}(t)$ sean lineales y las mismas para ambas medidas.

El método utilizado en este laboratorio para la obtención de las vidas medias de fluorescencia y los tiempos de correlación rotacional a partir de los decaimientos de fluorescencia y anisotropía se denomina método de reconvolución iterativa y se basa en el ajuste de mínimos cuadrados no lineales (Grinvald, A. y Steinberg, I.Z., 1974); (Grinvald, A., 1976); (Beechem, J.M., 1992). El análisis se realizó con el programa de análisis global (Laboratory for Fluorescent Dynamics)

3.2.8.3 Procesos de Transferencia de energía (FRET)

Un proceso FRET puede definirse como la interacción dependiente de la sexta distancia que se produce en el estado excitado y en la cual la emisión de un fluoróforo está acoplada a la excitación de otro.

Las dos ecuaciones que definen el proceso son:

$$E=1-I_{DA}/I_D \quad (3.9)$$

(2.8)

$$E=R_0^6/(R_0^6+R^6) \quad (3.10)$$

Donde E es la eficiencia del proceso y R_0 es la distancia Förster, que es la distancia a la que la eficiencia de transferencia de energía es del 50%, o la distancia a la que el 50% de los donadores excitados son desactivados por FRET. Los valores de I_{DA} y I_D se obtienen de los espectros de emisión del donador y el donador en presencia del aceptor.

La magnitud de R_0 es dependiente de las propiedades espectrales del donador y aceptor. El cálculo del R_0 obtenido en esta Tesis se obtuvo mediante la ecuación

$$R_0= 0.211 (n^{-4} Q_D k^2 J)^{1/6} \quad (3.11)$$

Donde n es el índice de refracción del medio cuyo valor empleado para todas las proteínas es de 1.4.

El factor de orientación k^2 depende de la relativa orientación de los dipolos de transición del donador y aceptor. Si el donador y el aceptor rotan libremente en un tiempo inferior a la vida media del donador, entonces k^2 es 2/3.

El rendimiento cuántico del donador (Q_D) se lo calculamos de forma relativa con respecto al N-acetilriptofanoamida (NATA). En nuestro caso el valor del rendimiento cuántico para el Trp fue de 0.03 (± 0.01).

J ($M^{-1}cm^{-1}nm^4$) es la integral del solapamiento existente entre el espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor:

$$J = \frac{[\sum F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda]}{[\sum F_D(\lambda) \Delta\lambda]} \quad (3.12)$$

donde $F_D(\lambda)$ es el espectro de emisión corregido del donador (unidades arbitrarias) ; $\epsilon_A(\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar del aceptor ($M^{-1}cm^{-1}$). Para la sonda empleada en esta tesis (IAEDANS) éste toma el valor de $5700 M^{-1}cm^{-1}$

El valor de R_0 publicado en la bibliografía para el par donador-aceptor Trp-IAEDANS en otras proteínas es del orden de 20\AA (B.W.Van der Meer, g Coker III, SY. S.Chen (1994) en “Resonance Energy Transfer”. Theory Data. VCH Publishers, Inc. NY).

De esta manera podemos obtener el valor de la distancia (R) entre dos residuos de una proteína

4. RESULTADOS

A. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA His-RepA-WT: FLUORESCENCIA INTRÍNSECA Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LAS SECUENCIAS DEL OPERADOR (IR) Y DE UN ITERÓN (1DR)

La proteína RepA se empleó fusionada en su extremo N-terminal a un péptido His 6 toda vez que incrementa su solubilidad y no altera su función *in vivo* (Diaz-Lopez, T. y col., 2003). Con el fin de abreviar, en lo sucesivo nos referiremos a His-RepA-WT como RepA-WT.

4.1 Espectro de absorción

Para la realización de las medidas de fluorescencia de la proteína RepA-WT y sus mutantes siempre se centrifugó previamente dicha proteína a 10000 rpm durante 10min para la eliminación de posibles agregados. La concentración de la proteína se calculó por su espectro de absorción tomando la medida de absorbancia a 280nm sabiendo que $\epsilon_{280}=17210 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ((Diaz-Lopez, T. y col., 2003)). En la figura 15 se muestra un espectro de absorción típico de RepA-WT.

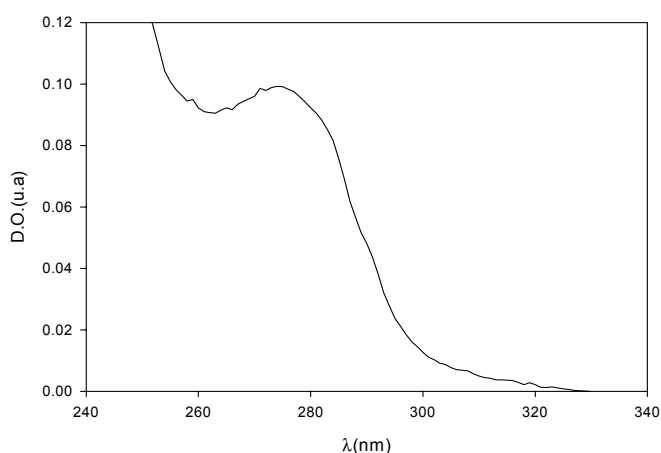


Figura 15. Espectro de absorción de la proteína RepA-WT a la concentración de $6 \mu\text{M}$ en tampón 0.5M sulfato amónico, 50mM acetato amónico pH 6.0, 10mM β -mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, 10% glicerol. La medida fue realizada a temperatura ambiente. El paso óptico fue de 1cm

4.2 Espectros de emisión y excitación

En la figura 16 se muestran los espectros corregidos de excitación (A) y emisión de RepA-WT (B) ($1\mu\text{M}$) a las longitudes de onda de 345 nm emisión y 295 nm excitación, respectivamente. A 345 nm, la emisión se debe al único residuo de Trp que contiene RepA, por lo que el espectro de excitación coincide con el espectro de absorción del Trp. A 295 nm se excita de forma selectiva al Trp. El espectro de emisión presenta un máximo a 320 nm, indicativo de un entorno muy poco polar de este residuo.

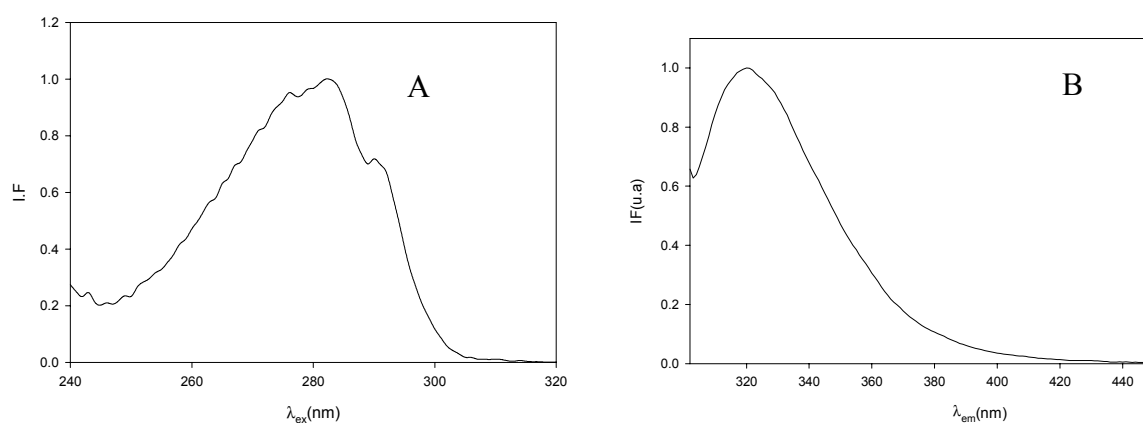


Figura 16. Espectros de excitación (A) y emisión (B) de fluorescencia corregidos y normalizados de RepA-WT a $1\mu\text{M}$ en tampón 0.15 M sulfato amónico, 15 mM acetato amónico pH 6.0, 3 mM β -mercaptoetanol, 30 nM EDTA, 3 % glicerol (V/V). El espectro de emisión presenta un máximo a 327 nm. La medida fue realizada a 5°C . Rendijas 8mm, cubetas 2x10mm.

4.3 Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario y fluorescencia en tiempo real de la proteína RepA-WT

Las constantes aparentes de equilibrio de disociación (K_{dapp}) para RepA-WT con las secuencias del operador (IR) y del iterón (1DR) se obtuvieron previamente mediante técnicas electroforéticas (EMSA) en el laboratorio (Giraldo, R. y col., 1998). Estas constantes eran del orden de 5×10^{-8} M para el complejo RepA-WT+IR y de 5×10^{-6} M para el complejo RepA-WT+1DR.

Posteriores resultados (Díaz-López, T. y col., 2003) mostraban que la disociación activa y el cambio conformacional en RepA-WT inducidos por la secuencia del iterón, se observaba a concentraciones equimolares de DNA y proteína del orden de 5 μ M.

En este trabajo nos propusimos estudiar mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia, la interacción de la proteína RepA con el DNA. Como paso previo se caracterizó espectroscópicamente la proteína RepA-WT y se estudió su dinámica local y global con medidas de fluorescencia realizadas en estado estacionario y con resolución temporal de picosegundos a la concentración de 1 μ M. La decisión de trabajar a esta concentración se debe a que por un lado nos permite tener una relación señal-ruido razonable y con menor contribución de agregados, y por otra parte, la sensibilidad del ensayo se acerca más al valor de las constantes obtenidas anteriormente en el laboratorio. En la tabla...se representan los parámetros espectroscópicos obtenidos para la proteína RepA-WT.

El decaimiento de fluorescencia es triexponencial, con un tiempo de vida media de 4.6 ± 0.2 ns, que representa el 81% de la intensidad de fluorescencia total, un tiempo de vida media intermedio de 1.8 ± 0.2 ns, y un tiempo corto de 0.3 ± 0.1 ns (aproximadamente un 4% del total)

muestra	Max. emis	$\Phi_{295\text{rel.NATA}}$	r	a_1	τ_1	a_2	τ_2	a_3	τ_3	$\langle\tau\rangle$
RepA-WT(1 μ M)	327	0.03 ± 0.01	0.13	0.26	0.3	0.25	1.8	0.49	4.7	2.83

Tabla 4. Parámetros de fluorescencia obtenidos en estado estacionario y en resolución temporal incluyendo: longitud de onda correspondiente al máximo en el espectro de emisión corregido (λ_{exc} 295 nm), anisotropía en estado estacionario (r , λ_{exc} 295 nm/ λ_{em} 345 nm) y decaimientos de intensidad de fluorescencia de la proteína RepA-WT a la concentración de 1 μ M (τ_i) (λ_{exc} 297 nm/ λ_{em} 345 nm). Los factores preexponenciales (a_i) están normalizados. En el cálculo de errores se ha tenido en cuenta la variabilidad entre distintas preparaciones de proteína.

En estudios publicados con anterioridad a esta tesis (Giraldo, R. y col., 1998) se habían realizado experimentos espectroscópicos (CD) a la concentración de 5 μ M de proteína, se comprobó que no había variaciones significativas entre ambas muestras (1 y 5 μ M) medibles mediante espectroscopia de fluorescencia.

4.4 Estudio de la unión de la proteína RepA-WT a secuencias distintas de DNA (IR y 1DR)

4.4.1 Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

La anisotropía de fluorescencia nos informa sobre los movimientos rotacionales de las moléculas fluorescentes. Pequeñas moléculas rotan rápidamente, mientras que moléculas grandes rotan más lentamente en disolución. En condiciones en las que no cambia el entorno de la sonda, un incremento en el tamaño de la molécula debido a la formación de un complejo se refleja en una disminución de la difusión rotacional de la especie marcada que a su vez se traduce en un aumento en el valor de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. En

consecuencia, los métodos de anisotropía de fluorescencia son muy útiles en el estudio cuantitativo de interacciones entre macromoléculas.

La sensibilidad de los métodos de fluorescencia es bastante alta estando el límite en la zona nanomolar – picomolar según la sonda fluorescente empleada. Los residuos de triptófano de las proteínas resultan ser útiles solamente en el estudio de las interacciones de muy baja afinidad debido a su bajo rendimiento cuántico.

A pesar de dicha limitación de partida, decidimos explorar la interacción entre proteína y DNAs a través del único residuo de Trp en RepA-WT (W94) como control inicial del estudio.

Los valores de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de muestras de proteína RepA-WT en presencia de distintas concentraciones de IR (operador) y 1DR (iterón) se muestran en la figura... En todos los casos, a medida que aumenta la concentración de DNA total se produce un aumento de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. Aunque los datos son muy ruidosos y no nos permiten realizar un análisis cuantitativo, en principio, este aumento podría deberse a varios factores: una fuerte agregación de la proteína en presencia del DNA, o a la formación de complejos proteína-DNA. Por ello decidimos caracterizar los complejos formados a partir de las medidas de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal y de los espectros de emisión de fluorescencia.

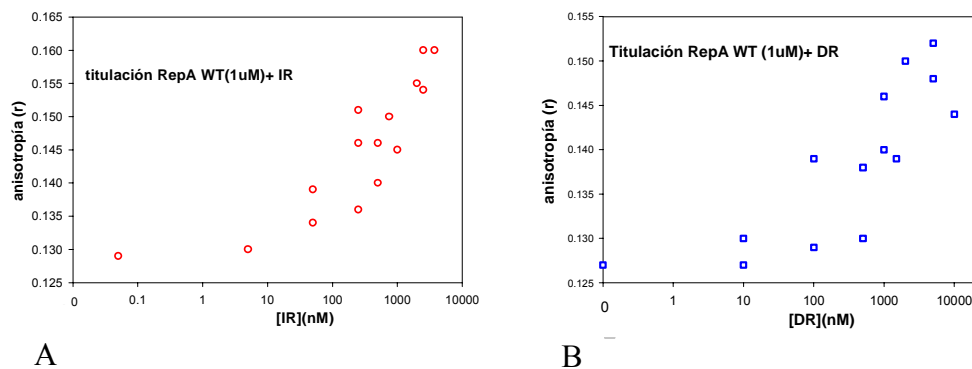


Figura 17. Variación de la anisotropía en estado estacionario de muestras de RepA-WT (1 μ M) con la concentración de IR (A) y 1DR (B) a las longitudes de excitación y emisión 295 y 345 nm respectivamente. Las medidas se realizaron en tampón 0.15 M sulfato amónico, 15 mM acetato amónico pH 6.0, 3 mM β -mercaptoetanol, 0.03 mM EDTA, 3 % glicerol y a la temperatura de 5°C.

Nota: Salvo que se indique lo contrario el tampón empleado en los experimentos de interacción proteína-DNA fue siempre 0.15 M sulfato amónico, 15 mM acetato amónico pH 6.0, 3 mM β -mercaptoetanol, 0.03 mM EDTA, 3 % glicerol y a la temperatura de 5°C

4.4.2 Decaimientos de anisotropía de fluorescencia

Con el fin de caracterizar los posibles complejos proteína-DNA formados, se realizaron experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal para la proteína libre y en presencia de los distintos fragmentos de DNA. Las concentraciones totales de DNA empleadas en los experimentos de decaimiento de anisotropía de fluorescencia fueron aquellas en las que sabíamos, gracias a los experimentos realizados en estado estacionario, que existía formación de complejo.

Los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de las muestras se ajustaron todos a un modelo de dos exponenciales según la ecuación (1.7).

Se utilizó un modelo de decaimiento de anisotropía no asociativo (Beechem, J.M., 1992) y la bondad del ajuste se juzgó a partir del valor de χ^2_r (valor óptimo $0.5 \leq \chi^2_r \leq 1.5$) y de la distribución de residuos.

En la tabla 5 se presentan los parámetros hidrodinámicos obtenidos: en todas las muestras se observa una despolarización rápida entre 20-60 ps, con una contribución entre el 40-50%, debida fundamentalmente a acoplamientos excitónicos entre el triptófano y los residuos aromáticos vecinos. El tiempo de correlación rotacional global (ϕ_G) se asocia al movimiento global de la proteína y los complejos proteína-DNA en cada caso. El elevado valor de ϕ_G observado en la interacción con el DNA no específico parece indicar la formación de agregados de proteína en presencia de NE.

muestra	ϕ_r (ps) (± 20)	β_G (± 0.05)	ϕ_G (ns) (± 20)
RepA-WT (1 μ M)	40	0.51	53 (± 10)
RepA-WT+IR(2.5 μ M)	30	0.58	106
RepA-WT+IR(5 μ M)	20	0.59	106
RepA-WT+1DR(5 μ M)	30	0.57	80 \pm 15
RepA-WT+1DR(10 μ M)	50	0.60	80 \pm 15
RepA-WT+NE(1 μ M)	60	0.55	120
RepA-WT+NE(5 μ M)	40	0.52	500

Tabla 5. Parámetros de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de las muestras RepA-WT+DNAs a las concentraciones indicadas. El valor de $r(0)$ para todas las medidas fue de 0.35. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 297 y 345 nm respectivamente. Las amplitudes fraccionales (β_L , β_G) están normalizadas.

Los números entre paréntesis representan el error del ajuste determinado al 67% del nivel de confianza ($\pm 1\sigma$) utilizando el análisis riguroso de errores (Beechem, J.M., 1992).

4.4.3 Espectros de emisión de fluorescencia

Estos experimentos fueron realizados con las mismas muestras preparadas para las medidas de decaimientos de anisotropía de fluorescencia. No se observan grandes cambios en la forma de los espectros de emisión de fluorescencia y en el máximo de emisión para distintas secuencias y concentraciones de DNA empleadas como se puede apreciar en la figura. El espectro de emisión de RepA en presencia de DNA NE (5 μ M) presenta un hombro en valores de $\lambda_{em} > 370$ nm que podría deberse a la formación de agregados. Los agregados de RepA como resultado de su interacción con secuencias de DNA no específico ya habían sido apreciados mediante espectroscopia de CD (Diaz-Lopez, T. y col., 2003).

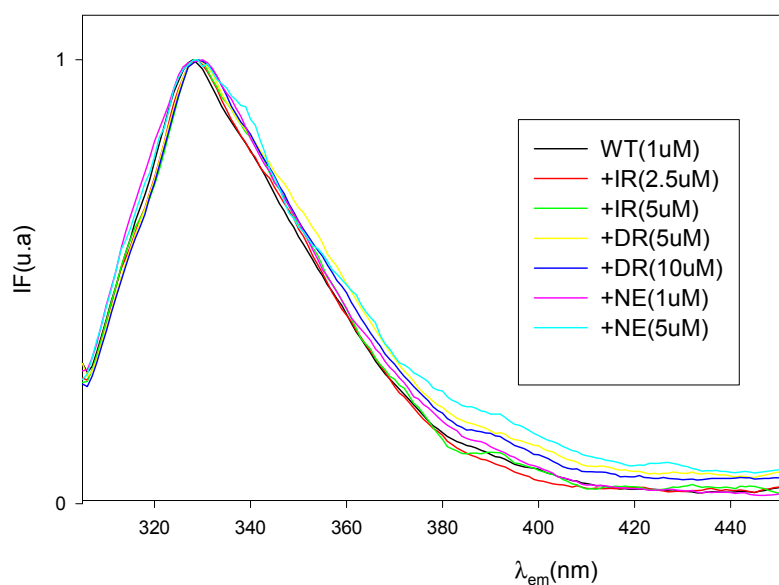


Figura 18. Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de las muestras de proteína RepA-WT libre y en presencia de los distintos DNAs. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 295 nm y 345 nm respectivamente.

4.4.4 Decaimientos de intensidad de fluorescencia

Los decaimientos de intensidad de fluorescencia recogidos para las muestras de proteína RepA-WT en presencia de los DNAs al igual que para la proteína libre se ajustaron a una función triexponencial de la forma:

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^3 \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (4.1)$$

En la tabla... se representan los tiempos de vida y los rendimientos cuánticos de fluorescencia. En todos los casos se observa un tiempo de vida media largo entre 3.8-4.2 ns que representa entre el 70-77% de la intensidad total, lo que se traduce en una disminución del tiempo de vida media promedio respecto de la proteína RepA libre. No se observan grandes cambios en el valor y en la contribución de la vida media más corta (0.2-0.3 ns), entre la proteína libre y las distintas preparaciones en presencia de DNA.

muestra	a_1	τ_1	a_2	τ_2	a_3	τ_3	$\langle \tau \rangle$	Φ_{295} (± 0.01)
RepA-WT+IR(2.5 μ M)	0.69	0.06	0.145	1.38	0.168	3.84	0.89	0.03
RepA-WT+IR(5 μ M)	0.22	0.38	0.477	2.12	0.304	4.52	2.47	0.03
RepA-WT+1DR(5 μ M)	0.23	0.31	0.36	1.94	0.406	4.43	2.57	0.03
RepA-WT+DR(10 μ M)	0.259	0.34	0.404	2.16	0.337	4.69	2.54	0.03
RepA-WT+NE(1 μ M)	0.267	0.36	0.358	1.92	0.375	4.5	2.47	0.03
RepA-WT+NE(5 μ M)	0.325	0.23	0.328	1.57	0.348	4.11	2.02	0.03

Tabla 6. Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida media promedio de las muestras de proteína RepA-WT unida a los distintos DNAs a las concentraciones indicadas. Los factores preexponenciales (a_i) están normalizados. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 297 y 345 nm respectivamente.

B. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE RepA-WT CON LAS SECUENCIAS IR Y 1DR

Los resultados obtenidos en los ensayos de unión proteína-DNA utilizando como sonda el residuo Trp94 de RepA nos pusieron de manifiesto la necesidad de marcar al DNA o a la proteína para poder determinar de forma cuantitativa las constantes de unión. Decidimos marcar los distintos fragmentos de DNA con una sonda fluorescente que presentara un rendimiento cuántico y un coeficiente de extinción mayor que el del Trp94 intrínseco de la proteína, de modo que nos permitiera estudiar la interacción en la zona nanomolar.

La sonda elegida para llevar a cabo los experimentos de unión de la proteína con los DNAs fue Cy3-amidita. Su elección se debió esencialmente a su alto coeficiente de extinción molar ($150000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}_1$) y a su gran estabilidad de señal frente a cambios de pH del medio. El DNA se marcó en el extremo 5' de una de las hebras de cada dsDNA incorporando el fluoróforo durante la propia síntesis química de una de las hebras oligonucleotídicas. En la figura 19 se muestra un gel en el que podemos apreciar que al producirse la hibridación de las cadenas complementarias de los DNAs no quedan restos de cadena sencilla de DNA sin hibridar.

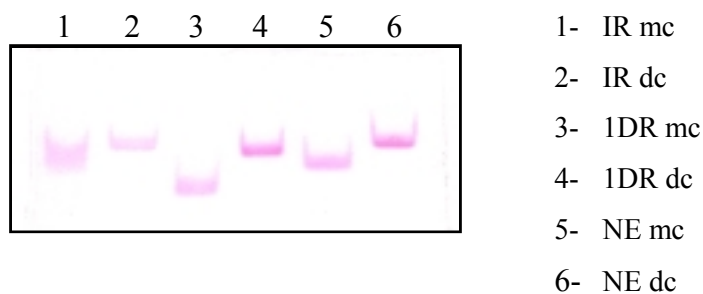


Figura 19. Gel de las secuencias IR, 1DR y NE de una y doble cadena a la concentración de $10 \mu\text{M}$.

4.5 Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

Los valores de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario para las curvas de unión de los distintos DNAs a la proteína RepA-WT se muestran en la figura... Las longitudes de onda de emisión y excitación seleccionadas para estos experimentos fueron de 550 nm y 570 nm respectivamente, que se corresponden con la máxima absorción y emisión de la sonda Cy3. Las concentraciones de los DNAs marcados fueron las siguientes:

[IR-Cy3]=10 nM

[1DR-Cy3]=20 nM

[NE-Cy3]=20 nM

La concentración empleada para IR es la mitad de la empleada para los otros DNAs. Al ser esta interacción mucho más afín, se disminuyó la concentración del DNA al límite de sensibilidad del instrumento para esta sonda.

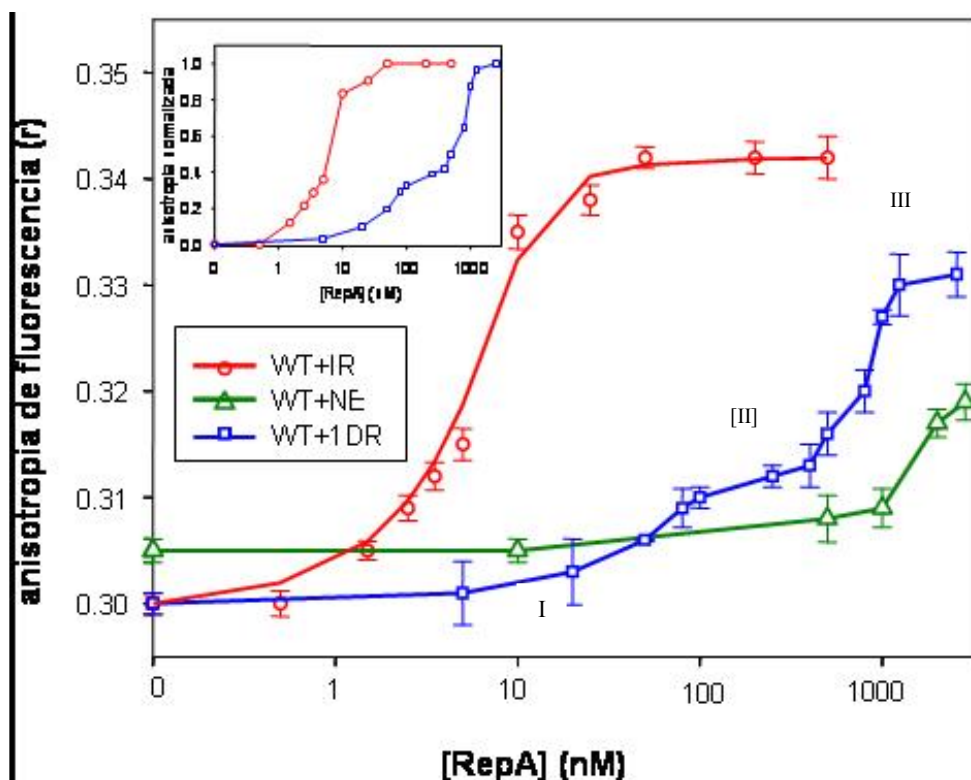


Figura 20. Medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario en el estudio de la interacción de los DNAs-Cy3 con la proteína RepA-WT. La concentración total de RepA se expresó en términos de concentración de monómero.

En todos los casos a medida que se incrementa la concentración de RepA-WT se observa un incremento de la anisotropía de fluorescencia.

Aunque el tiempo de vida media de fluorescencia del Cy3 es mucho menor que el tiempo de rotación global de RepA libre y de los complejos RepA-WT-DNA, los valores de anisotropía obtenidos para las distintas muestras de DNAs en presencia de máxima concentración de proteína RepA-WT pueden explicarse por el diferente tamaño de los complejos RepA-WT-DNA (Diaz-Lopez, T. y col., 2003);(Lakowicz, J., 1999).

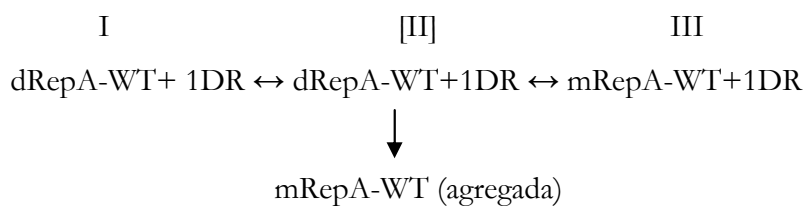
El valor $r_f=0.3$ es indicativo de que Cy3 se encuentra rígidamente unido al DNA. Al unirse a RepA se observa un aumento de un 14%, con un valor muy cercano al r_0 de Cy3 ($r_0=0.35$).

La curva de unión para RepA-WT+IR se ajustó para un modelo de dos estados según la ecuación (3.6) y se pudo obtener una constante de disociación ≤ 1 nM.

[IR-Cy3]=10nM (paso limitante de la sensibilidad del experimento para la determinación de la K_D)

En el caso de la curva de anisotropía de RepA-WT+1DR, se observa la presencia de tres estados, que hemos denominado: I, [II] y III. El segundo estado ([II]), que aparece en el intervalo de concentraciones de 100-300nM de RepA-WT, podría indicar la presencia de un intermediario de transición (Poujol, N. y col., 2003). Hemos determinado los tiempos de vida media a las distintas concentraciones de proteína y no se observa un comportamiento anómalo en este intervalo, lo que indica que el comportamiento observado en r no puede explicarse por cambios espectroscópicos de la sonda. Estos datos sugieren que estamos detectando un intermediario en la interacción de RepA con DR, cuyo valor de anisotropía en estado estacionario es menor que el determinado para el complejo final RepA+1DR en el que RepA se encuentra en forma monomérica.

La vida media de fluorescencia del DNA-Cy3 es muy corta ($\langle\tau\rangle=1.0-1.2$ ns, ver apartado siguiente), lo que no nos ha permitido determinar la conformación global de este posible intermediario. Además no se ha podido ajustar la curva a un modelo de equilibrio de tres estados, posiblemente debido a la formación irreversible de agregados inactivos de RepA durante la interacción.



En el caso de NE, se observa que la afinidad es mucho menor y a la máxima concentración de RepA estudiada ($2\mu\text{M}$) aún no se observa saturación.

Se hizo un control a 0.5M de sal y se comprobó que no se observaban cambios en la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario, que indicaba que a alta fuerza iónica se inhibe la unión entre RepA-WT' y el DNA.

4.6 Tiempos de vida media de fluorescencia

Los decaimientos de intensidad de fluorescencia recogidos para las muestras de los DNAs marcados con Cy3, libres y en presencia de máxima concentración de proteína, se ajustaron todos a una función biexponencial de la forma:

$$I(t) = I_0 \sum_{i=1}^2 \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (4.2)$$

Con $\tau_1 = 0.7-0.8 \text{ ns}$ y $\tau_2 = 1.6-2.6 \text{ ns}$

Los valores de las vidas promedio se recogen en la siguiente tabla:

muestra	a_1	τ_1	a_2	τ_2	$\langle \tau \rangle$
IR 10nM	0.29 ± 0.08	1.6 ± 0.2	0.71 ± 0.08	0.68 ± 0.06	1.0 ± 0.2
IR(10nM)+ WT (1 μ M)	0.35 ± 0.08	1.9 ± 0.2	0.65 ± 0.08	0.76 ± 0.09	1.2 ± 0.2
DR 20nM	0.46 ± 0.1	1.7 ± 0.2	0.54 ± 0.09	0.66 ± 0.1	1.14 ± 0.2
DR 20nM + WT (2.1 μ M)	0.43 ± 0.1	2.4 ± 0.3	0.57 ± 0.09	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2
DR 20nM + WT (100nM)	0.347 ± 0.005	1.85 ± 0.02	0.653 ± 0.009	0.78 ± 0.02	1.15 ± 0.2
NE 20nM	0.44 ± 0.1	1.7 ± 0.2	0.56 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.15 ± 0.2
NE 20nM + WT (2.5 μ M)	0.63 ± 0.1	2.6 ± 0.1	0.37 ± 0.05	0.8 ± 0.2	1.9 ± 0.2

Tabla 7. Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida media promedio de las muestras de los distintos DNAs-Cy3 libres y unidos a la proteína RepA-WT a las concentraciones indicadas. Los factores preexponenciales (a_i) están normalizados. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 550 y 570 nm respectivamente.

Los decaimientos de fluorescencia de 1DR-Cy3 y NE-Cy3 libre son muy similares. Si comparamos sus secuencias observamos que coinciden en las siete últimas bases del extremo 5' del oligonucleótido. La secuencia del extremo 5' del IR-Cy3 es diferente a la de 1DR y NE, lo que da lugar a una ligera disminución de la vida media promedio del IR-Cy3 respecto de 1DR-Cy3. En un trabajo previo se ha estudiado la disposición del fluoróforo Cy3 unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido. Parece que en general, Cy3 interacciona directamente con las bases del extremo 5'al que está unido covalentemente, quedando así su movilidad muy restringida (Norman, D.G. y col., 2000). La formación de complejos RepA-IR y RepA-DR da lugar a un ligero aumento de la vida media de fluorescencia del Cy3, lo que indicaría un posible cambio conformacional del DNA al interactuar con la proteína que afectaría a la interacción del Cy3 con las bases cercanas y por lo tanto a sus propiedades

espectroscópicas. En el caso de la interacción no específica de RepA con el fragmento NE, el aumento es del 60%.

4.7 Estudio de la interacción entre un mutante monomérico (His₆RepA-R93C) y la secuencia de un iterón

La curva de unión de la proteína RepA-WT con el 1DR marcado con Cy3 nos muestra la presencia de un posible intermediario ([II]) en la curva de unión. Dado que no es posible hacer medidas de decaimientos de anisotropía para obtener resultados acerca de la forma del complejo, pensamos en hacer esta misma curva de unión pero titulado con un mutante monomérico de RepA-WT (RepA-R93C) y así poder obtener más información acerca del posible paso intermedio en la formación del complejo RepA-WT+1DR.

4.7.1 Expresión del mutante monomérico His₆RepA-R93C

En los años 90 y se hizo en nuestro laboratorio una búsqueda de mutantes de pPS10 capaces de replicarse en *E.coli*. Entre ellos se obtuvo el mutante RepA-R93C (Fernández-Tresguerres, M.E. y col., 1995); (Maestro, B. y col., 2003). Las características más significativas que esta mutación confería al plásmido pPS10 eran que se incrementaba su número de copias en *P.aeruginosa* hasta siete veces más que con respecto a la proteína silvestre y que la afinidad de esta proteína por los iterones era mayor que la mostrada por RepA-WT. Todas estas características apuntaban a la posibilidad de que fuera un mutante monomérico.

Tras la resolución de la estructura de la forma dimérica del dominio N-terminal de RepA (WH1) (Giraldo, R. y col., 2003), pudimos observar cómo el residuo Arg93 formaba parte de la superficie de dimerización en dRepA. No es de extrañar pues, que la introducción de la mutación (R93C) a este nivel favorezca la forma monomérica de la proteína RepA. Con el fin de sobreexpresarla, clonamos

al gen *repA-R93C* en el mismo vector de expresión utilizado para la proteína RepA-WT, es decir, con un apéndice His6 en su extremo amino terminal. De esta manera se pudo purificar esta proteína mediante cromatografía de afinidad a níquel.

La expresión se realizó a una temperatura de 30° C, que incrementa la solubilidad de la proteína sobreproducida. Sin embargo, tras el tratamiento de lisis, se identificó que la proteína RepA-R93C se encontraba formando cuerpos de inclusión, siendo necesario solubilizarla en Gu-HCl y replegarla mediante diálisis para obtener proteína soluble (Giraldo, R. y col., 1998). Esto es una primera indicación de la posible inestabilidad estructural del mutante. Una vez purificada se decidió mantener el péptido de fusión ya que el carácter hidrofílico del mismo aumentaba su solubilidad.

Se siguió el protocolo de purificación de la proteína a partir de los cuerpos de inclusión descrito en (Giraldo, R. y col., 1998) que incluye la purificación en columna Ni-IMAC seguida de una SP-Sepharosa.

4.7.2 Determinación del estado de asociación de la proteína RepA-R93C

Experimentos de filtración en gel (fig.21) nos han permitido demostrar que la mutación R93C resulta efectivamente en la monomerización de RepA, si bien en un intervalo de concentración $\leq 10 \mu\text{M}$, pues la proteína muestra clara tendencia a agregar a mayores concentraciones. Esto se pone de manifiesto tras centrifugar las muestras y presentar en los espectros de la proteína (fig.) el hombro característico de los agregados a $\lambda \geq 320 \text{ nm}$ y un aumento de la contribución de la luz dispersa.

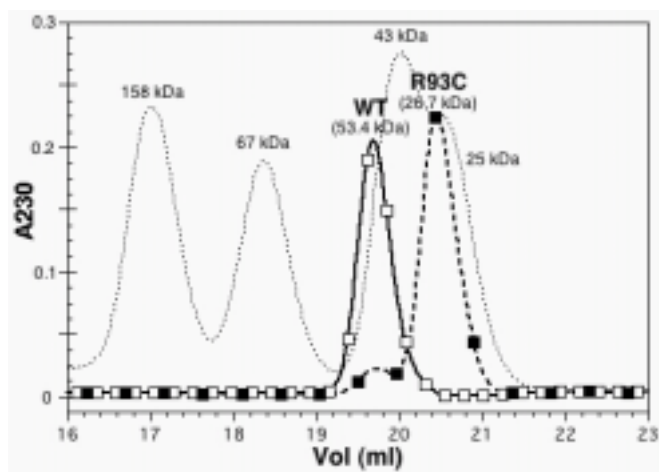


Figura 21. Perfil de elución en FPLC de la proteína RepA-R93C en comparación con la proteína silvestre en el tampón 0.5M sulfato amónico, 50mM acetato amónico pH 6.0, 10mM β -mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, 10% glicerol

En la fig.22 está representado el espectro de absorción de la proteína RepA-R93C en el tampón sulfato amónico 0.5M, 50mM acetato amónico pH 6.0, 10mM β -mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, 10% glicerol. La muestra se centrifugó durante 10 min. a 10000 rpm y como se puede observar, aún siguen quedando agregados que no se han podido eliminar en la centrifugación. Este hecho pone de manifiesto la alta tendencia a agregar que presenta este mutante monomérico. Para el cálculo de concentración se estimó y eliminó la contribución de la luz dispersa a la absorbancia debida a los agregados a 280nm.

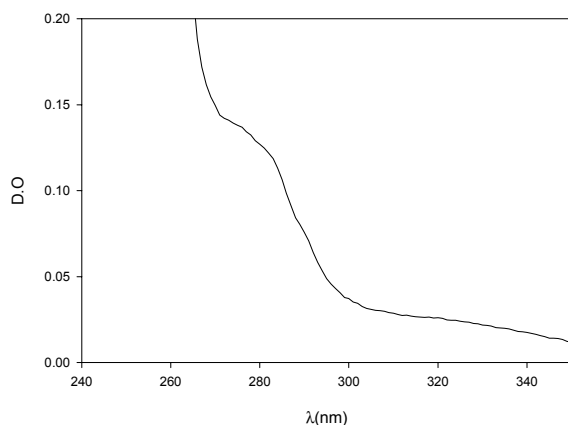


Figura 22. Espectro de absorción del mutante RepA-R93C en el tampón sulfato amónico 0.5M, 50mM acetato amónico pH6.0, 10mM β-mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, 10% glicerol, a 5° C.

Para el cálculo de la concentración se eliminó la contribución a 320nm por considerarla agregados.

4.7.3 Valoración de la interacción de la proteína RepA-R93C con la secuencia de 1DR

Se llevó a cabo el mismo experimento de anisotropía de fluorescencia de unión con 1DR pero en este caso utilizando la proteína RepA-R93C. Los ensayos fueron realizados en las mismas condiciones de concentración de proteína y DNA que con la proteína nativa. La comparación de las curvas de unión de la proteína RepA-WT y RepA-R93C a la secuencia 1DR se muestran en la figura 23.

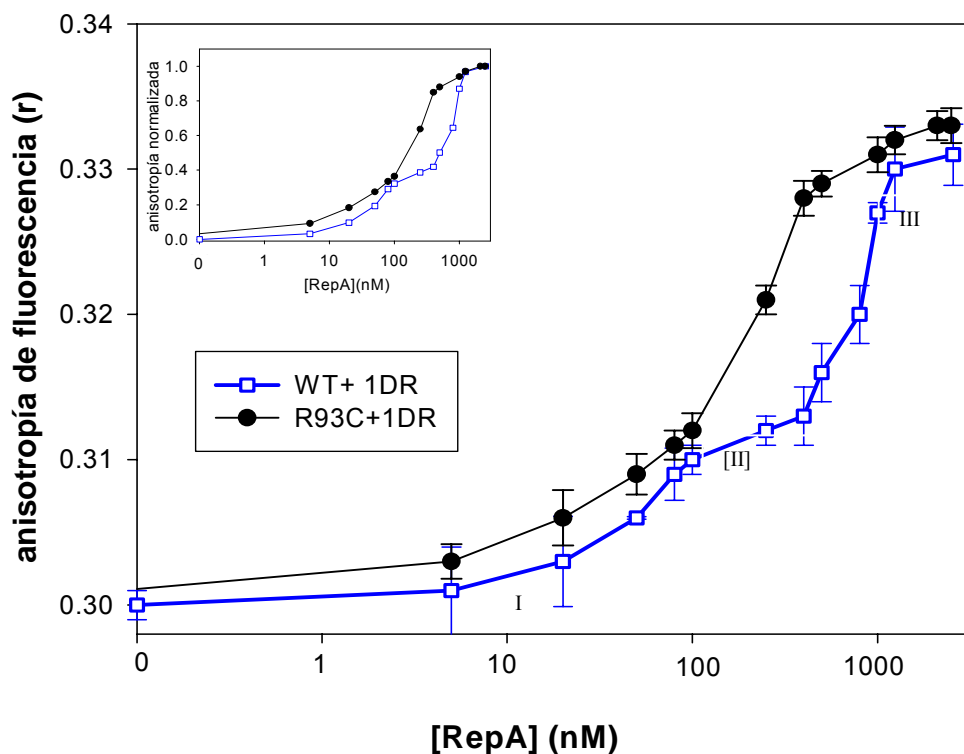


Figura 23. Medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario correspondientes a la titulación de los DNAs-Cy3 con la proteína RepA-WT y RepA-R93C. Las medidas fueron realizadas a 40nM de 1DR.

En la curva correspondiente a la interacción de R93C con 1DR podemos apreciar la desaparición del paso intermedio y un aumento de la afinidad de la unión del mutante monomérico RepA-R93C al iterón. Estos datos son compatibles con nuestra hipótesis sobre la existencia de un intermediario de transición en la curva de unión RepA-WT con 1DR (Poujol, N. y col., 2003).

Las curvas de unión medidas a través de anisotropía de fluorescencia para la formación del complejo RepA-WT+IR, nos han permitido obtener una $K_D \leq 1nM$. Los resultados obtenidos para la curva RepA-WT+1DR nos han permitido detectar la presencia de un posible intermediario de transición en la formación del complejo proteína-DNA.

C. EFECTO DE CONCENTRACIONES ELEVADAS DE DIVERSOS ADITIVOS PROTEICOS EN LA AFINIDAD DE RepA-WT POR LA SECUENCIA DE UN ITERÓN: INTERACCIONES EN CONDICIONES DE AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR

En esta parte del trabajo hemos estudiado el efecto de la exclusión de volumen en la interacción RepA-DNA (1DR), en presencia de concentraciones moderadas de dos proteínas no relacionadas, BSA y ovoalbúmina, utilizadas como agentes aglomerantes. Se trata de comprobar si en un medio aglomerado, aumenta la afinidad de esta interacción. La relación funcional de este estudio viene apoyada por el hecho de que el interior de las células contiene una concentración total de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) que oscila entre 50 y 400 mg/ml (Minton, A.P., 2001).

Ya que este fenómeno no es específico, distintas macromoléculas deben dar lugar, en principio, a un efecto similar simplemente en virtud de su elevada concentración.

Previamente se había visto en geles que la unión de la proteína RepA-WT a un único iterón era de muy baja afinidad ($K_{dapp}=5\mu\text{M}$) (Giraldo, R. y col., 1998) pero que se veía claramente mejorada en presencia de concentraciones de BSA y ovoalbúmina (OA) hasta de 50 mg/ml en geles EMSA (Díaz-López, T., 2004)

4.8 Estudios mediante anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

En la fig...se muestran las curvas de unión entre 1DR y RepA-WT en condiciones aglomerantes, seguidas mediante medidas de anisotropía de fluorescencia. Las proteínas BSA y OA se añadieron a la mezcla de reacción a diferentes concentraciones (50mg/ml y 140mg/ml). El cálculo de las concentraciones de BSA y OA se realizó de dos maneras distintas (ley de Lambert-Beer, método Bradford de BioRad) y todas las estimaciones daban

valores muy aproximados de concentración, por lo que se tomó la medida de A_{280} .

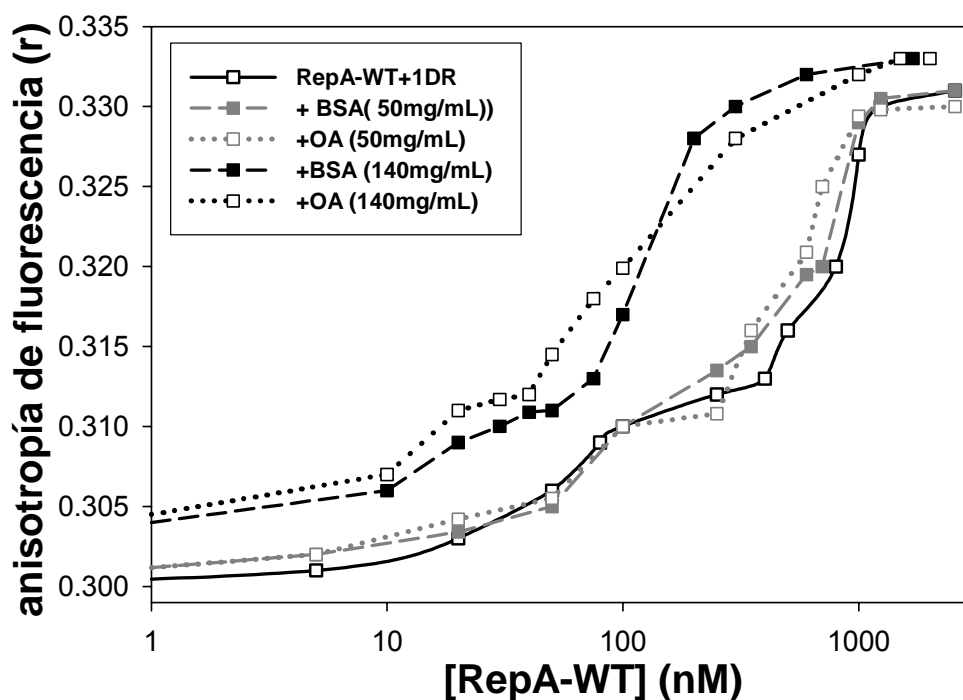


Figura 24. Medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario durante la titulación de los DNAs-Cy3 con la proteína RepA-WT en condiciones de aglomeración macromolecular inducida por BSA y OA. La concentración total de 1DR fue de 40nM. Las concentraciones empleadas de agente aglomerante (BSA y OA) fueron de 50mg/ml y 140 mg/ml El error de cada medida fue de ± 0.005 .

Estos estudios sólo se realizaron con la secuencia 1DR porque la constante de unión del IR está ya por debajo del límite de sensibilidad del ensayo de anisotropía ($K_d \leq 1\text{nM}$, $[\text{DNA-Cy3}]_{\text{min}} = 10\text{nM}$). La presencia de impurezas fluorescentes en las disoluciones de BSA y OA con una contribución no despreciable a la intensidad de fluorescencia, limita el intervalo de

concentraciones de DNA total a estudiar. En estos experimentos se trabajó con una concentración total de 1DR de 40nM.

Se optimizaron para cada caso las longitudes de excitación y emisión de manera que la relación señal-ruido fuera la más favorable posible:

Control: 1DR+ RepA sin aglomerante: 550nm exc/570nm emis

1DR+RepA+OA: 555nm exc/590nm emis

1DR+RepA+BSA: 555nm exc/570nm emis.

Las medidas se realizaron en el mismo tampón que en los experimentos en condiciones ideales, salvo que hubo que elevar el pH hasta 7.5 ya que a pH 6 la OA y la BSA precipitaban a las concentraciones del experimento. Se hizo el control a pH 7.5 para la curva en condiciones ideales (sin agentes aglomerantes) y se comprobó que no variaba con respecto a la obtenida a pH 6.

Además, para poder comparar los datos de los dos experimentos (en ausencia y en presencia de agente aglomerante) se comprobó que la forma de la curva teórica de anisotropía (simulación a dos estados) para $K_d=300\text{nM}$ (K_d para 1DR-RepA sin aglomerante) no variaba prácticamente para una concentración de 40nM de 1DR.

Los resultados nos muestran que en condiciones de baja aglomeración macromolecular (50mg/ml de BSA y OA) la afinidad de RepA-WT por la secuencia 1DR es prácticamente igual que la obtenida en condiciones ideales. Sin embargo, cuando nos fijamos en las curvas a una concentración moderada de agente aglomerante (140 mg/ml) se aprecia un notable incremento en la afinidad de la proteína por esta secuencia de DNA.

Resulta significativo que en presencia de los dos agentes aglomerantes se sigue observando el posible intermediario en la curva de unión.

4.9 Tiempos de vida media de fluorescencia de DNA-Cy3 en condiciones de aglomeración macromolecular

Los decaimientos de intensidad de fluorescencia obtenidos para estas soluciones fueron ajustados satisfactoriamente a un modelo de tres exponenciales de la forma:

$$I(t) = I_0 \sum_{i=1}^3 \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (4.3)$$

En la tabla 24 se muestran los tiempos de vida media de fluorescencia τ_i y sus factores preexponenciales α_i , así como los tiempos de vida medio ($\langle \tau \rangle_1$)

muestra	a_1	τ_1	a_2	τ_2	a_3	τ_3	$\langle \tau \rangle$
BSA (140mg/ml)	0.12±0.001	4.68±0.03	0.363±0.003	1.57±0.02	0.518±0.006	0.367±0.008	1.3±0.2
BSA (140mg/ml) + DR (40nM)	0.12±0.001	4.37±0.02	0.384±0.002	1.44±0.01	0.494±0.002	0.36±0.007	1.3±0.2
BSA (140mg/ml) + DR (40nM) + WT (1.5µM)	0.12±0.001	4.49±0.02	0.356±0.002	1.51±0.01	0.523±0.005	0.37±0.002	1.3±0.2

Tabla 8. Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida media promedio de las muestras indicadas. Los factores preexponenciales (a_i) están normalizados. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 550 y 570 nm respectivamente. El tampón empleado fue el mismo empleado siempre en las curvas de unión, salvo que el pH se mantuvo a 7.5.

La presencia de impurezas fluorescentes en BSA en el intervalo de excitación/emisión del Cy3 no nos ha permitido determinar correctamente los tiempos de vida media de 1DR-Cy3 en BSA 140 mg/ml. De cualquier modo lo que si podemos decir acerca de estos resultados es:

- i) No hay prácticamente cambios en las vidas medias promedio de 1DR-Cy3/ 140mg/ml BSA \pm RepA-WT (1.5 μ M).
- ii) No parece que la vida media de 1DR-Cy3 en BSA sea distinta a la determinada en ausencia de agente aglomerante.
- iii) El fondo de BSA está muy polarizado, de ahí la dificultad de medir a altas concentraciones de BSA, lo que limita la sensibilidad del ensayo a concentraciones de 40nM de DNA-Cy3.

El estudio en condiciones de aglomeración macromolecular de la curva de formación del complejo RepA-WT+1DR, nos muestra un aumento en la afinidad de la proteína por este fragmento de DNA a altas concentraciones (140 mg/ml) de agente aglomerante (BSA y OA).

Todas las curvas obtenidas en condiciones de aglomeración macromolecular mantienen la misma forma, lo que refleja una propiedad intrínseca de la interacción.

D. CAMBIOS CONFORMACIONALES EN RepA-WT ESTUDIADOS MEDIANTE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA NO RADIATIVA (FRET)

La comparación estructural de los modelos del dímero de RepA (dRepA) unido al operador y del monómero unido al iterón (mRepA) (Giraldo, R., 2003); (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004), puso en evidencia las diferencias en elementos de estructura secundaria entre los dominios N-terminales de ambas especies (Giraldo, R. y col., 2003).

El propio modelado muestra la reducción en el número de interacciones hidrofóbicas que se produce al monomerizar la proteína RepA (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004).

Todos estos datos apuntaban claramente a la existencia de un cambio conformacional en la proteína RepA al monomerizar, que se corroboró mediante espectroscopia de CD (Diaz-Lopez, T. y col., 2003). De ahí que nos planteáramos la necesidad de utilizar otras técnicas espectroscópicas, en concreto FRET, para caracterizar la transformación estructural de RepA en disolución.

La técnica FRET fue la elegida para visualizar espectroscópicamente esta variación estructural ya que nos permite obtener estimaciones de distancias intra e intermoleculares en proteínas y sus ligandos en el intervalo de 10-100Å. Aunque las distancias son menos precisas que las determinadas por cristalografía de rayos X o NMR, la técnica de FRET es única para caracterizar cambios conformacionales en macromoléculas en disolución, en condiciones cercanas a las biológicas.

4.10 Transferencia de energía no radiativa entre residuos aromáticos de la proteína RepA-WT

4.10.1 Espectros de emisión

En este apartado vamos a explorar la posibilidad de que se produzcan fenómenos de transferencia de energía entre los grupos aromáticos vecinos de la proteína RepA-WT. Esta transferencia se produce como consecuencia del solapamiento entre los espectros de absorción y emisión de los residuos de fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp), aunque principalmente entre Tyr y Trp. Esto es así porque RepA contiene ambos residuos y los dos son excitados a 275 nm. Para que se produzca FRET, además de solapamiento, es importante la orientación relativa de los dipolos de transición del donador/aceptor. La aplicación de esta técnica en el estudio de la disociación de dímeros de proteína RepA-WT en monómeros es muy útil debido a que la información que puede darnos está directamente relacionada con el estado de asociación de la proteína, ya que según esté RepA-WT en forma dimerica o monomérica se presentará transferencia de energía o no.

Las distancias Förster (R_0) que corresponden a un 50% de eficiencia de transferencia de energía para los pares de aminoácidos donador-aceptor de una proteína quedan reflejadas en la siguiente tabla:

Donador	Aceptor	$R_0(\text{Å})$
Tyr	Tyr	9-16
Tyr	Trp	9-18
Trp	Trp	4-16

Tabla 9. Distancias Förster (R_0) para que se produzcan fenómenos FRET entre aromáticos de proteínas. Adaptada de Lakowicz.

Un monómero de RepA contiene 10 residuos de Tyr y un único residuo de Trp. Cuando estos residuos están a una distancia entre $0.5R_0$ y $1.5R_0$ y la orientación relativa de sus dipolos de transición es apropiada, se pueden observar procesos de transferencia de energía tyr-Trp. En este apartado hemos caracterizado el proceso FRET Tyr-Trp en RepA-WT a través de los cambios observados en los espectros de emisión.

Para un par donador-aceptor dado, la distancia para que se produzca FRET dependerá del rendimiento cuántico y del espectro de emisión del donador, los cuáles pueden variar bastante para un mismo residuo que se localice en distintos entornos de la proteína. El espectro de absorción es menos sensible al entorno, así que los parámetros que principalmente determinan el rango de R_0 son los mencionados anteriormente. Es importante destacar que para que se produzcan fenómenos de FRET es necesario no solamente que exista una adecuada distancia entre residuos, sino una apropiada orientación de los grupos indol y fenol.

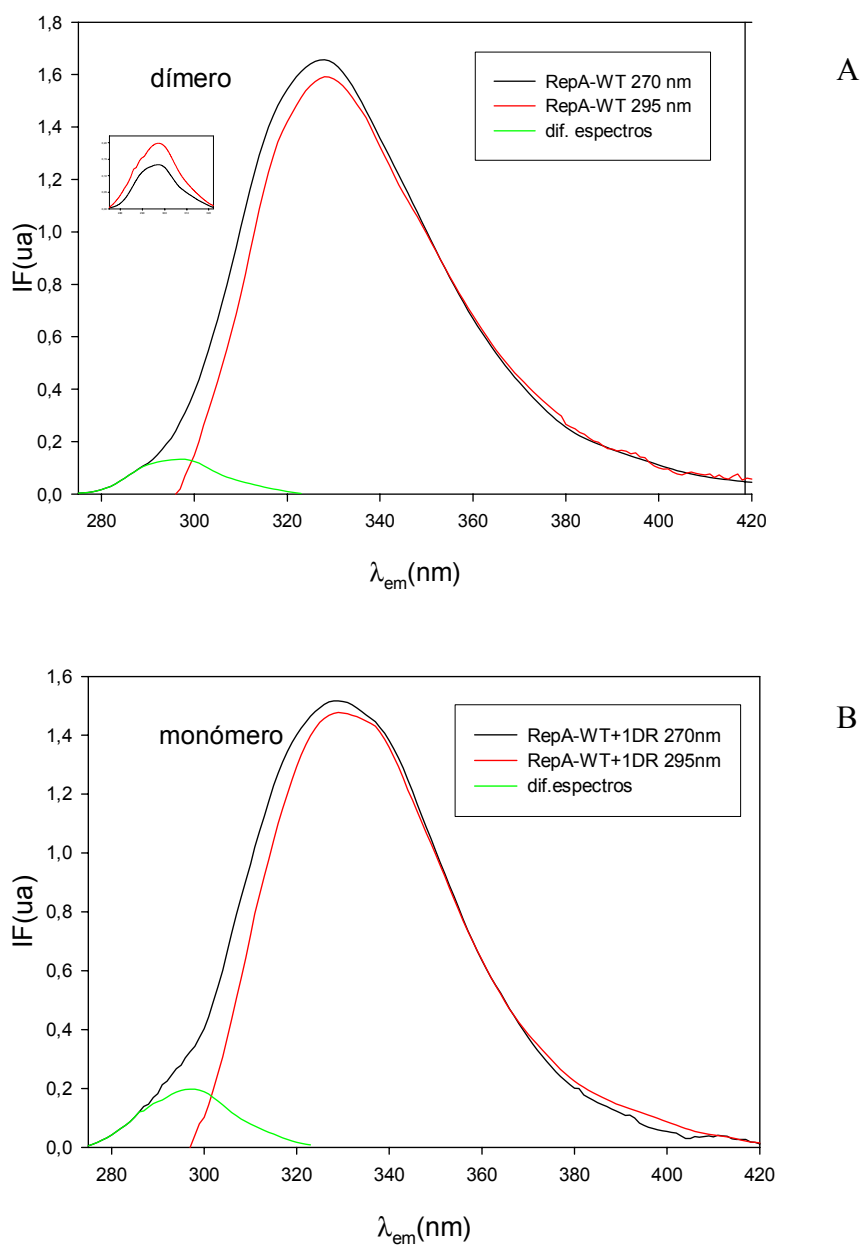


Figura 25. Espectros de fluorescencia para RepA-WT sólo (A) y unida a la secuencia del iterón (B). En rojo se muestran los espectros excitando a 295 nm y en negro a 270 nm. El color verde refleja la diferencia de espectros. Las concentraciones empleadas fueron $1\mu\text{M}$ para la proteína y 2.5 y $5\mu\text{M}$ para IR y 1DR, respectivamente.

El espectro de emisión de la forma dimérica muestra emisión correspondiente a Tyr y Trp cuando se excita a 270 nm, y solamente emisión correspondiente al Trp cuando se excita a 295 nm. El espectro de emisión correspondiente a la diferencia de ambos se obtuvo normalizando los espectros a una longitud de onda en la que sólo el Trp emite (370 nm) seguido de la sustracción de espectros. El espectro resultante corresponde a la emisión de Tyr. Cuando la proteína interactúa con la secuencia del iterón, la proteína se disocia a monómero (Diaz-Lopez, T. y col., 2003). En la fig. 25 podemos apreciar cómo la relativa contribución de las Tyr aumenta en el estado monomérico debido a que estos residuos se localizan más distantes del Trp aceptor en este estado monomérico que en su forma dimérica.

4.10.2 Estudios de FRET entre residuos aromáticos a través de la anisotropía. Espectros de anisotropía de excitación

El espectro de anisotropía de excitación es la representación de la anisotropía frente a la longitud de onda de excitación de un fluoróforo.

Se midió la anisotropía de la proteína WT sólo y unida a los distintos DNAs, manteniendo constante la longitud de onda de emisión a 345nm, donde sólo emite el triptófano y variando la excitación entre las longitudes de onda desde 270 nm a 300nm. A $\lambda_{ex} < 295$ nm se excitan los residuos de tirosina y triptófano, mientras que a $\lambda_{ex} > 295$ nm se excita sólo el Trp94. Mediante este experimento podemos estudiar, a través de la emisión del triptófano, los distintos acoplamientos que existen entre el Trp y los aromáticos vecinos que rodean al triptófano en la proteína WT.

El complejo WT+1DR tiene un tamaño menor que WT+IR y sin embargo los valores de r son ligeramente mayores para WT+1DR que para WT+IR en el intervalo de $\lambda_{ex} = 270-285$ nm, lo que indicaría que además de la despolarización

debida a la dinámica de los complejos RepA+DNA, en el complejo WT+IR y en WT dimérica existe un mayor acoplamiento entre el triptófano y los aromáticos vecinos que dan lugar a una despolarización de la fluorescencia del triptófano adicional. Los valores más altos observados en WT+1DR indicarían que este acoplamiento desaparecería en parte probablemente asociado al cambio conformacional en RepA al interactuar con 1DR.

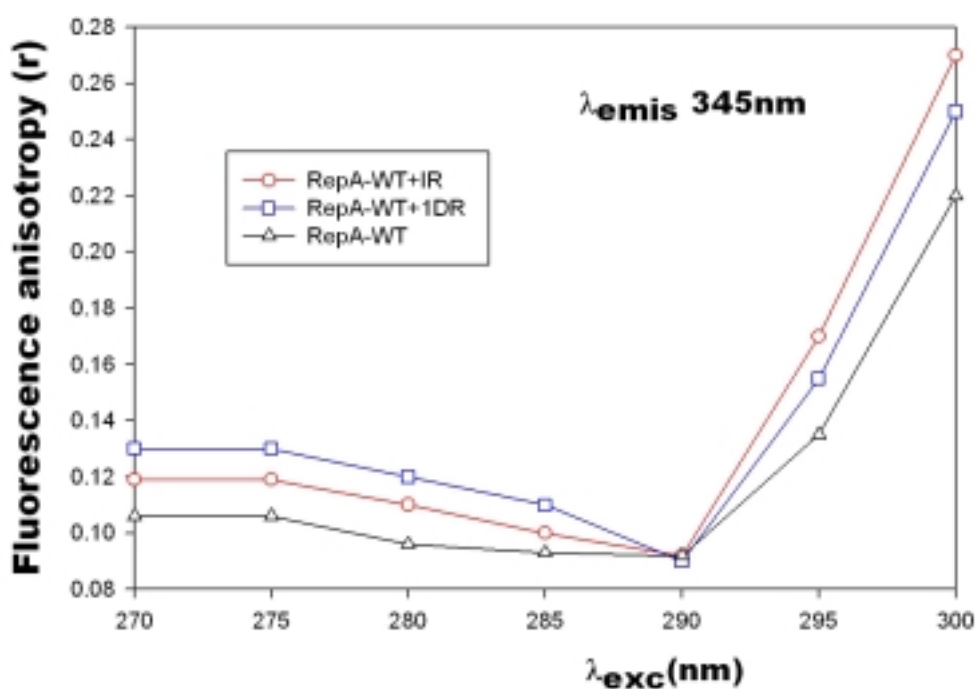


Figura 26. Espectro de anisotropía de excitación para la proteína RepA-WT (1 μ M) sola y unida a las secuencias IR (2.5 μ M) y 1DR (5 μ M). La longitud de onda de emisión permaneció constante a 345 nm y se varió la longitud de onda de excitación de 270-300 nm.

4.11 Transferencia de energía no radiativa entre el Trp94 y el residuo C160 marcado covalentemente con IAEDANS de la proteína RepA-WT

4.11.1 Diseño de mutantes

Al inicio de la realización de esta tesis, la estructura de dRepA fue resuelta (Giraldo, R. y col., 2003). Este hecho nos permitió hacer un diseño racional de mutantes de cisteína: la idea principal radicaba en la obtención de mutantes de la proteína RepA que presentaran un único residuo de este aminoácido para poder derivatizarlo mediante química de maleimidas, con un fluoróforo y proceder posteriormente a medidas de FRET entre el triptófano intrínseco de la proteína (Trp94, donador) y el fluoróforo extrínseco (aceptor). De esta manera determinamos cambios en distancias intramoleculares que nos permitirían estudiar con más profundidad la transformación estructural en RepA como respuesta a su unión a los DNAs del operador y del iterón.

La proteína RepA-WT presenta 3 residuos nativos de cisteína: C29, C106, y C160. En la fig. 27 podemos ver las posiciones que ocupan estos residuos en la estructura de la proteína. Es de notar que, C29 y C106 resultaron derivatizadas con elevada ocupación por un compuesto mercurial (PCMB) componente del procedimiento de obtención de fases cristalográficas en cristales de RepA (Giraldo, R. y col., 2003) lo que fue una prueba de sus accesibilidad.

Se decidió sustituir estos residuos de cisteína (-SH) por el aminoácido serina (-OH) debido a la gran semejanza en estructura y polaridad que estos dos residuos presentan. De esta manera, las proteínas mutantes obtenidas presentarían un único residuo de cisteína y las otras dos quedarían sustituidas por serinas. En el siguiente esquema se muestra la estrategia seguida para la obtención de los mutantes:

Exceptuando C160 que se localiza en el segundo dominio (WH2), las otras dos cisteínas se localizaban en posiciones que según la superposición (dRepA-mRepE54) no presentaban en principio un gran cambio de posición espacial (Giraldo, R. y col., 2003). Debido a este hecho, decidimos hacer mutantes de RepA que se localizaran en posiciones que sufrieran un mayor cambio en el proceso de monomerización. De esta manera diseñamos además los mutantes S9C, K85C, K124C y S128C. Las posiciones que ocupa cada residuo quedan reflejadas en la siguiente figura.

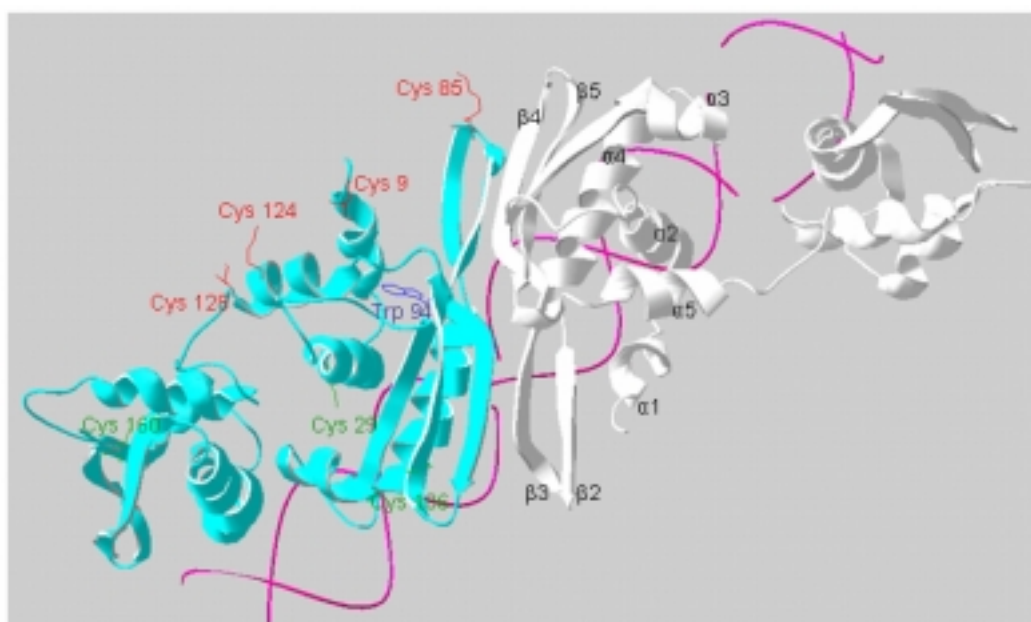


Figura 27. Modelado de la estructura de la proteína RepA-WT unida a la secuencia del IR (magenta). En color celeste se destaca una subunidad del dímero y sobre el mismo se dibujan las posiciones de cada uno de los residuos modificados para poder obtener los mutantes derivatizables para FRET. Los residuos de Cys nativos aparecen en verde y los mutados en rojo. El triptófano intrínseco de la proteína se colorea en violeta. En la otra subunidad del dímero se destacan los elementos de estructura secundaria del dominio N-terminal (WH1). La visualización del modelo se ha realizado con el programa Swiss-Pdb-Viewer.

El diseño de los mutantes, que coincidió temporalmente con la realización del modelado de mRepA sobre mRepE54, nos permitió estimar distancias no sólo sobre el dímero (dRepA) sino también sobre la conformación monomérica (mRepA). En el siguiente cuadro quedan reflejadas las distancias estimadas entre el triptófano único de la proteína (Trp94) y cada uno de los residuos mutantes de cisteína (medidas entre carbonos β de las cadenas laterales) en los estados dimérico y monomérico.

Dímero (dRepA)		Monómero (mRepA)		Dif. Dist. (Å)	ΔE (Å)
Residuo	Distancia (Å)	Residuo	Distancia (Å)		
S9C	12.08	S9C	13.46	1.38	-0.04
C29	12.80	C29	13.59	0.79	-0.03
K85C	24.64	K85C	21.79	2.85	+0.15
C106	19.39	C106	20.81	1.42	-0.11
K124C	16.05	K124C	24.10	8.05	-0.54
S128C	17.59	S128C	19.47	1.88	-0.14
C160	42.89	C160	22.04	20.85	+0.35

Tabla 10. Distancias existentes según nuestro modelado entre el triptófano único de la proteína (Trp94) y cada uno de los residuos mutados, en el estado dimérico y monomérico. Se muestran también las diferencias entre las distancias para un mismo par en estado dimérico y monomérico. ΔE es la variación estimada de la eficiencia de transferencia de energía, asumiendo un valor de R_0 (Trp-Aceptor) = 20 Å.

Según el modelado anterior, de los siete mutantes de cisterna propuestos, sólo dos de ellos, el C160 y el K124C, presentarían cambios superiores al 20% (asumiendo un valor de R_0 = 20 Å) en la eficiencia de transferencia de energía

Trp-cys-acceptor, en la transformación conformacional dímero (dRepA disolución)-monómero (complejo mRepA-1DR), por lo que hemos centrado nuestro estudio FRET en estos dos mutantes.

4.11.2 Obtención y purificación de los mutantes de cisteína C160 y K124C

Estos mutantes fueron transformados en estirpes bacterianas distintas (clpXP- y CAG629) para ver en cuál de ellas se expresaban mejor. Los mejores resultados de inducción para ambas fueron los obtenidos en la estirpe bacteriana CAG629.

Cuando se crecieron a gran escala las bacterias y se lisaron para obtener las proteínas se observó que solamente el mutante C160 se mantenía en la fracción soluble mientras que la proteína K124C aparecía en la fracción insoluble.

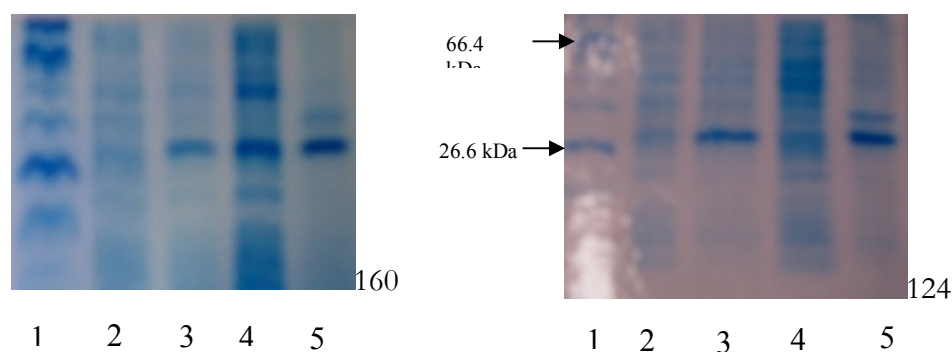


Figura 28. Geles de inducción a gran escala de las proteínas mutantes RepA-C160 y RepA-K124C. Los ensayos fueron realizados a 28° C de temperatura. En los geles se visualizan las muestras estudiadas en cada carril: 1) marcador de proteínas; 2) clon sin inducir; 3) clon inducido durante 16h.; 4) lisado; 5) fracción agregada insoluble.

Tras estos resultados nos dispusimos a purificar la proteína soluble según el protocolo descrito por (Giraldo, R. y col., 1998). La proteína C160 se pudo obtener con un alto grado de pureza y a una concentración de 16 μ M. De esta manera se procedieron a realizar los siguientes experimentos con esta proteína, C160.

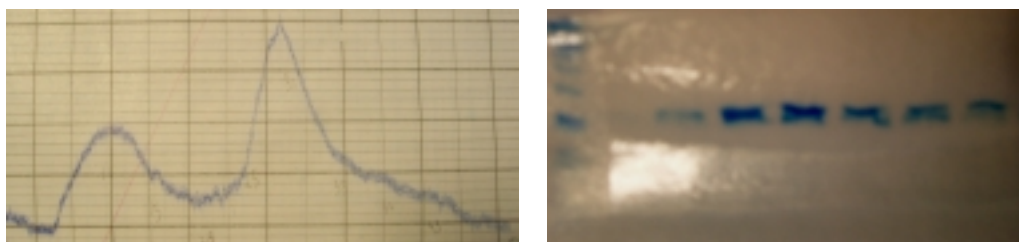


Figura 29. Cromatograma Ni-IMAC correspondiente a la purificación de la proteína RepA-160C (A). El gradiente se llevó a cabo en el tampón: 1M KCl, 50-300 mM imidazol pH 8. (B) Gel correspondiente a las fracciones de proteína RepA-160C obtenidas en la purificación.

4.11.3 Estudio de la estructura de la proteína mutante C160. Comparación con la proteína nativa RepA-WT

Antes de realizar medidas de FRET se hacía necesario hacer un estudio de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas RepA-WT y RepA-C160 para comprobar que la segunda no había sufrido cambio aparente tras la introducción de dos mutaciones en ella.

4.11.3.1 Ensayos de dicroísmo circular: estructura secundaria de la proteína y estabilidad térmica

La espectroscopia de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (250-190 nm) nos permite estimar la composición promedio en estructura secundaria de proteínas purificadas. El espectro para una estructura principalmente α -helicoidal muestra un doble mínimo de elipticidad a valores de 222 y 208 nm y un máximo a 195

nm, mientras que una alta proporción de β -lámina se refleja en un espectro cuyo mínimo de elipticidad se encuentra alrededor de 215 nm con un máximo a 200 nm.

Los espectros de dicroísmo circular de la proteína mutante C160 y la proteína nativa RepA se muestran en la fig. 30.

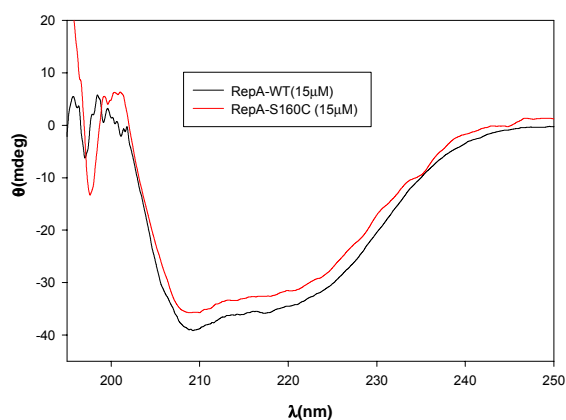


Figura 30. Espectros de CD en el ultravioleta lejano de las proteínas RepA-WT y RepA-R93C en tampón sulfato amónico 0.5M, 50mM acetato amónico pH6.0, 10mM β -mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, 10% glicerol a la concentración de 15 μ M. La medida fue realizada a 5°C.

Los espectros fueron tomados en la zona del ultravioleta lejano (195 nm-250 nm). Puede apreciarse que no se observan variaciones significativas al comparar los espectros de ambas proteínas. Esto es indicativo de que nuestro mutante C160 presenta la misma composición promedio en elementos de estructura secundaria que la proteína nativa.

Se llevaron a cabo análisis de desnaturalización térmica de ambas proteínas mediante espectroscopia CD. En estos ensayos se determina la variación de la

elipticidad a una longitud de onda determinada con la temperatura. Las curvas que se obtienen proporcionan información sobre las temperaturas a las cuales las proteínas despliegan su estructura. El valor que se recoge es la temperatura correspondiente a una pérdida de estructura secundaria del 50% (T_m). Este parámetro nos permite comparar la estabilidad de las dos proteínas.

Los datos se recogieron a 222nm, una longitud de onda a la que es posible detectar la variación en la composición de hélice α de las proteínas. Las medidas de elipticidad se realizaron para ambas proteínas en un rango de temperaturas de 5 a 90° C.

Los espectros de desnaturalización térmica quedan reflejados en la figura siguiente:

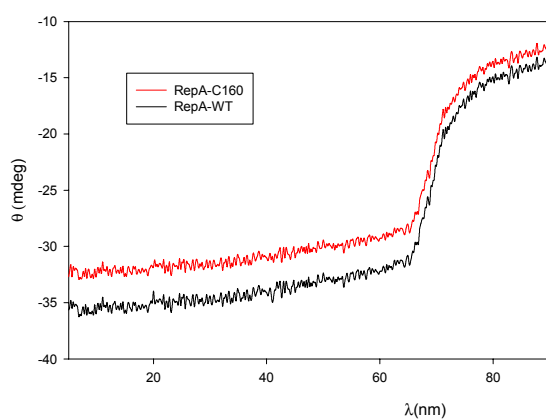


Figura 31. Espectro de desnaturalización térmica de las proteínas RepA-WT y RepA-C160

Desde el punto de vista del valor T_m de desnaturalización ambas proteínas presentan una estabilidad semejante.

4.11.3.2 Estudios sobre la estructura terciaria de RepA-C160 y RepA-WT: Espectros de emisión de fluorescencia y medidas de anisotropía de fluorescencia

Para poder comprobar si el entorno del residuo de Trp94 en la proteína RepA-C160 presentaba alguna variación en su estructura terciaria con respecto a la proteína silvestre, se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia de la proteína y se comparó con el de la proteína nativa. Ambos espectros fueron adquiridos a las mismas concentraciones a las que se realizarían los ensayos de FRET (1 μ M). Para obtener los espectros se excitó a la longitud de onda que absorbe específicamente el triptófano (295 nm) y se observó su emisión en el intervalo 300-450 nm. La posición del máximo del espectro de emisión del Trp en la proteína es muy sensible a cambios en la polaridad del entorno, por lo que resulta una herramienta muy útil para detectar cambios conformacionales en las proteínas

En la siguiente figura aparecen representados los espectros de emisión para ambas proteínas.

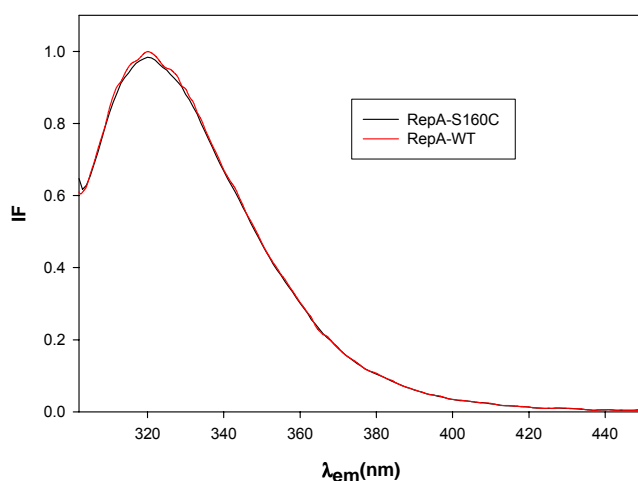


Figura 32. Espectros de emisión de las proteínas RepA-WT y RepA-R93C en el tampón sulfato amónico 0.5M, 50mM acetato amónico pH6.0, 10mM β -mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, 10% glicerol. La medida fue realizada a 5°C. La longitud de onda de excitación fue 295nm.

No se observan cambios en la posición del máximo ni en la forma del espectro de emisión, por lo que al menos, en el entorno del Trp, las dos proteínas presentan una conformación semejante.

La anisotropía de fluorescencia recogida a las longitudes de onda de 295 nm excitación/345 nm emisión para la proteína mutante es la misma que para la proteína silvestre lo que confirma la no variación sustancial en estructura terciaria en el mutante.

4.11.3.3 Determinación del estado de asociación del mutante RepA-C160 y análisis comparativo con la proteína RepA-WT

De acuerdo con la información disponible, la introducción de dos mutaciones en la proteína C160 (C29S y C106S) no debería producir una variación en el estado

de asociación de la proteína en comparación con RepA-WT, dado que ninguna de estas mutaciones se localiza en la superficie de dimerización. Esta predicción se evaluó mediante experimentos de equilibrio de sedimentación en una ultracentrífuga analítica.

Estos experimentos de equilibrio de sedimentación se realizaron a las concentraciones a las cuales la proteína iba a ser utilizada en los ensayos de FRET (1 μ M). Las velocidades de centrifugación empleadas fueron 13000 y 15000 rpm, y una temperatura de 5° C.

En la fig. se muestran las distribuciones de los valores de absorbancia en el equilibrio para las distintas proteínas.

El perfil de sedimentación de ambas proteínas corresponde al de una forma dimérica. (Diaz-Lopez, T. y col., 2003)

4.11.4 Caracterización espectroscópica del marcaje fluorescente de RepA-C160 con el fluoróforo extrínseco IAEDANS

Se eligió esta sonda por presentar el par donador-aceptor Trp-IAEDANS un valor de R_0 en torno a 20 Å, adecuado a las distancias que nos proponemos medir en este trabajo.

4.11.4.1 Marcaje de la proteína C160

Los marcajes covalentes realizados en esta Tesis son de tipo específico sobre los grupos tioles (-SH) del residuo único de cisteína de la proteína C160. La C160 ha resultado ser muy poco reactiva

Debido al bajo grado de incorporación del fluoróforo extrínseco que se observa en el espectro de absorción de C160 unido al IAEDANS, no podemos saber si la

incorporación de éste a la proteína mutante provoca cambios en sus propiedades espectroscópicas. En el espectro de absorción de RepA-IAEDANS, se observa una banda ancha, poco definida, con una contribución muy pequeña en torno a 340 nm.

4.11.4.2 Cálculo del R_0

La distancia de Förster se calcula utilizando las propiedades espectroscópicas del par donador (trp) / aceptor (IAEDANS) que se ha estimado según la ecuación (3.11).

El valor de R_0 publicado en la bibliografía para el par donador-aceptor Trp-IAEDANS en otras proteínas es del orden de 20Å (B.W.Van der Meer, g Coker III, SY. S.Chen (1994) en “Resonance Energy Transfer”. Theory Data. VCH Publishers, Inc. NY).

Hemos determinado su valor en este trabajo (ver materiales y métodos) a partir de los parámetros presentados en la tabla:

Φ_{Trp94}	n	K2	$J(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{mm}^4)$	$\epsilon_{\text{IAEDANS}}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
0.03 ± 0.01	1.4	2/3	1.08×10^{14}	5700

Tabla 11. Parámetros espectroscópicos empleados en la obtención del valor de R_0 . El rendimiento cuántico del Trp94 (Φ_{Trp94}) es relativo al NATA.

En la figura 33 podemos visualizar el área de solapamiento de los espectros para el par Trp-IAEDANS en nuestra proteína RepA-C160.

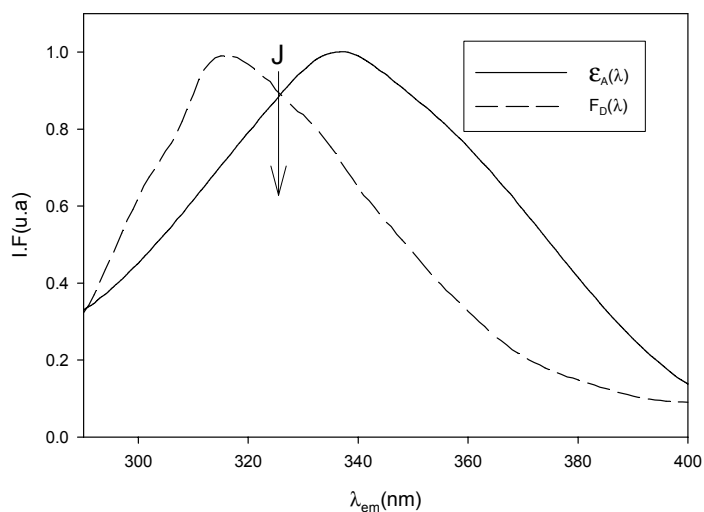


Figura 33. Representación de los espectros de emisión del trp94 de la proteína RepA-C160 y del espectro de absorción de la sonda IAEDANS. Se señala la zona de solapamiento de ambos espectros.

De esta manera R_0 para el par Trp94-IAEDANS corresponde con el valor de 19\AA (± 2).

4.11.5 Cálculo de la eficiencia de transferencia de energía y valor de la distancia (R)

En la figura 34 se presentan los espectros de emisión (longitud de onda de excitación 295 nm) de la proteína RepA-C160 ($1\ \mu\text{M}$) marcada con IAEDANS sola y en presencia de las secuencias IR ($5\ \mu\text{M}$) o 1DR ($10\ \mu\text{M}$).

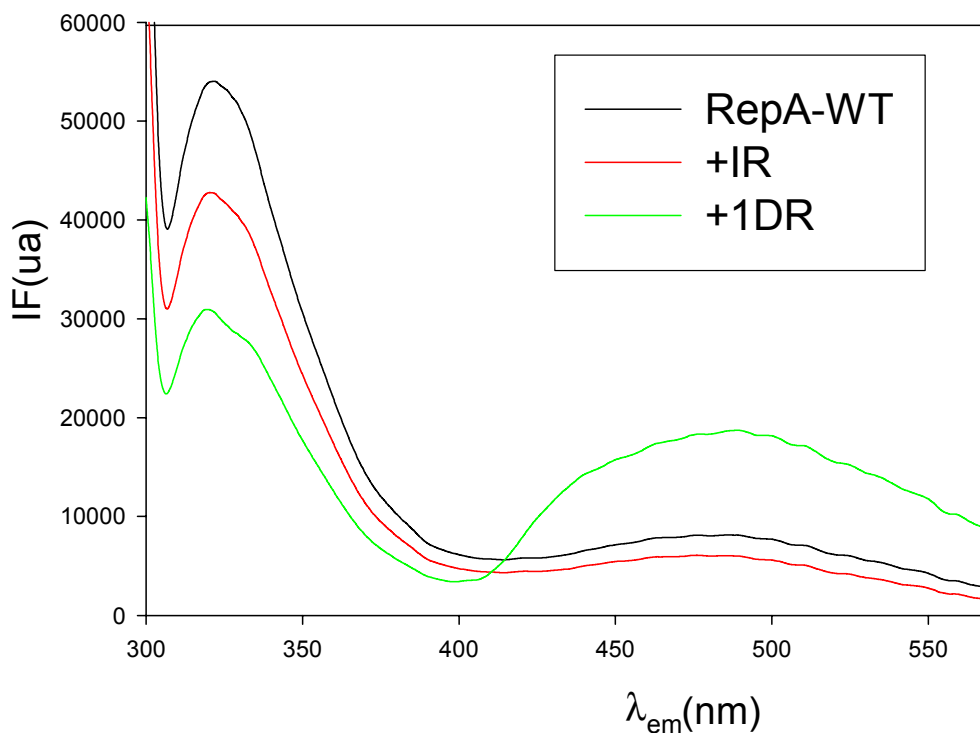


Figura 34. Espectros de emisión de fluorescencia corregidos de RepA-WT marcada con IAEDANS a la concentración de $1 \mu\text{M}$ y con las secuencias IR y 1DR. El espectro de emisión presenta un máximo a 327 nm y otro a 490 nm para todas las muestras. La longitud de onda de excitación para los espectros de emisión fue de 295 nm .

Según la ecuación (3.9) la eficiencia de la transferencia de energía para el par trp94-C160-IAEDANS en presencia de 1DR es:

$$E = 1 - I_{DA} / I_D \quad (3.9)$$

Sustituyendo en ella los valores de I_{DA} y I_D obtenidos del espectro de emisión de fluorescencia (fig. anterior) obtenemos que $E = 1 - 40000 / 50000 = 0.2$.

Sustituyendo en la ecuación (3.10) los valores E y R_0 , obtenemos una distancia $R = 25.19 \text{ \AA}$.

En la unión con IR no existe FRET.

Para comprobar que no existía variación en los espectros de emisión cuando se excitaba únicamente a la sonda IAEDANS se obtuvieron los espectros de emisión para la proteína RepA-WT marcada con IAEDANS sólo y en presencia de las secuencias de DNA. En ellas se puede apreciar que no hay prácticamente variación en la emisión de fluorescencia.

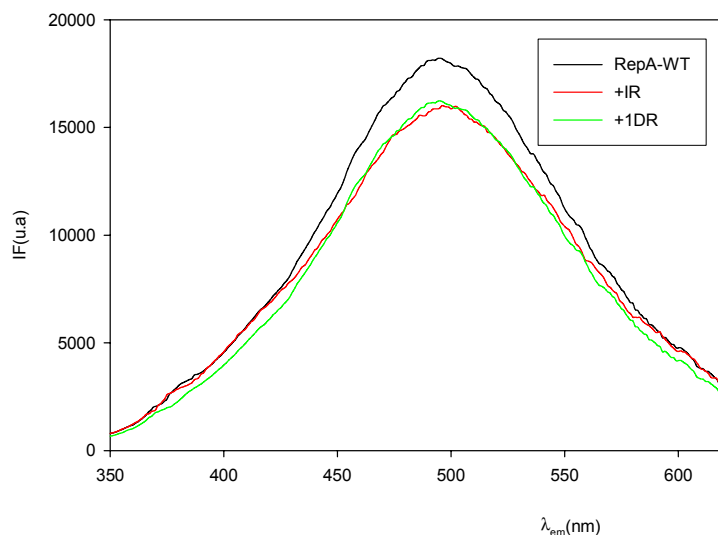


Figura 35. Espectros de emisión de fluorescencia corregidos de RepA-WT marcada con IAEDANS a la concentración de $1 \mu\text{M}$ sólo y en presencia de las secuencias IR y 1DR. El espectro de emisión presenta un máximo a 490 nm para todas las muestras. La longitud de onda de excitación para los espectros de emisión fue de 336 nm .

Espectro de excitación

Otra forma de observar el fenómeno FRET es mediante los espectros de excitación de la proteína marcada sólo o en presencia del IR y del 1DR. Como ya se comentó en la sección de materiales y métodos, la variación en la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación para una longitud de emisión fija constituye el espectro de excitación. Es muy útil en situaciones en

las que queremos saber la longitud de onda de excitación de un fluoróforo que nos está emitiendo a una longitud de onda determinada. En nuestro caso dejamos fija la longitud de onda de emisión a 500 nm y obtuvimos el espectro de excitación para las muestras.

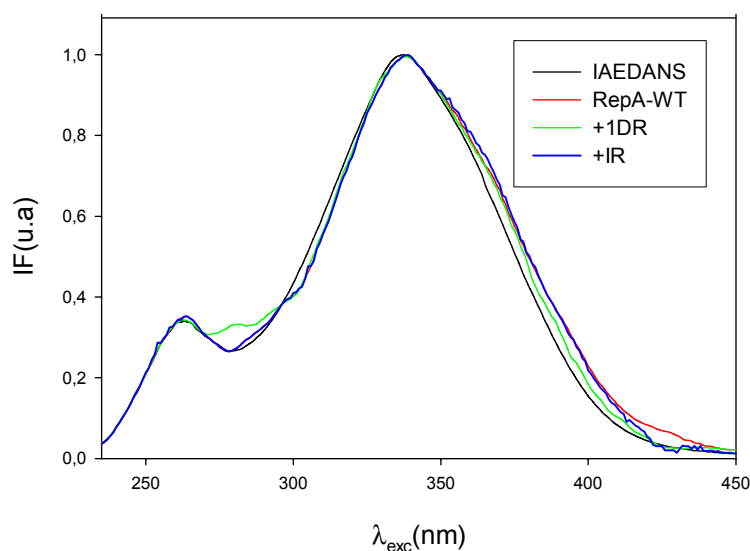


Figura 36. Espectros de excitación de fluorescencia (no corregidos) de RepA-WT marcada con IAEDANS a la concentración de 1 μ M y con las secuencias IR y 1DR. El espectro de excitación presenta un máximo a 336 nm para todas las muestras y a 280 nm para la muestra con 1DR. La longitud de onda de emisión para los espectros de excitación fue de 500nm

Para las muestras RepA-WT sólo y con la secuencia del IR se observa un máximo de emisión en torno a 336 nm correspondiente a la sonda IAEDANS. En el caso de la muestra con el iterón podemos observar además una pequeña contribución a 280 nm de excitación debida a la transferencia de energía del triptófano 94 de la proteína RepA-WT a la sonda IAEDANS unida covalentemente al residuo C160.

Los estudios de FRET llevados a cabo a través del marcaje del residuo C160 en el dímero de RepA con IAEDANS nos muestran una variación en la distancia C160-Trp94 compatible con la generación de la forma monomérica inducida por la secuencia del iterón. Estos estudios se ven apoyados por el distinto acoplamiento existente entre el Trp y los aromáticos vecinos dependiendo del estado de asociación de la proteína.

5.-DISCUSIÓN

A. ESTUDIOS DE LA FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DEL ÚNICO RESÍDUO DE Trp (Trp94) DE LA PROTEÍNA RepA-WT

El máximo del espectro de emisión del Trp94 nos indica que está localizado en una zona muy poco polar de la proteína, ya que presenta un espectro muy desplazado al azul. Su rendimiento cuántico es muy bajo ($\Phi=0.03$), por lo que su uso como sonda espectroscópica va a estar limitado a concentraciones $\geq 1\mu\text{M}$ de RepA. Por otra parte, los movimientos de rotación de RepA-WT libre, en disolución, y de los complejos proteína-ADN son mucho más lentos que el tiempo de vida media de fluorescencia del Trp94 (tiempo de vida media promedio en torno a 2.6 ns, por lo que no se van a poder realizar estudios hidrodinámicos precisos con esta sonda. Sin embargo, nos ha parecido importante hacer el estudio de decaimientos de anisotropía de fluorescencia del Trp94 para la proteína libre, en disolución y en presencia de las secuencias del operador y de un iterón, como control inicial del estudio de la interacción. Aunque los tiempos de correlación rotacional determinados presentan un error de hasta el 20% para los complejos de mayor tamaño, se observa un incremento de los tiempos de correlación rotacional de la proteína, compatible con la formación de los correspondientes complejos.

B. BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA REPA-WT CON LAS SECUENCIAS ESPECÍFICAS DEL OPERADOR Y DE UN ITERÓN DEL ORIGEN

La anisotropía de fluorescencia ha mostrado ser una metodología muy sensible para estudios cuantitativos de interacciones proteína-ADN en disolución. Además, permite estudiar la formación de estos complejos sin necesidad de separar especie libre de unida, como sucede, por el contrario, en técnicas utilizadas más frecuentemente, tales como EMSA.

Previamente se había observado mediante geles EMSA, que la constante de disociación de la proteína RepA-WT al operador era del orden de 50nM y la correspondiente para la unión con un iterón era de muy baja afinidad ($K_{dapp} = 5 \mu\text{M}$) (Giraldo, R. y col., 1998).

En nuestro caso, y gracias al marcaje específico de DNA con la sonda fluorescente Cy3, hemos podido estudiar la interacción de RepA-WT con las secuencias del operador y de un iterón del origen a concentraciones fijas de 10 y 20 nM, respectivamente.

Gracias a estos estudios en solución llevados a cabo mediante la técnica de anisotropía de fluorescencia, hemos podido ajustar la curva de unión de RepA-WT+IR a un modelo de dos estados con una constante de disociación de $K_D \leq 1\text{nM}$. El perfil de la curva nos pone de manifiesto la alta afinidad de la proteína por esta secuencia.

Sin embargo, la curva de unión de la proteína a la secuencia de un iterón, presenta un perfil típico de una transición en tres estados, que interpretándolos de acuerdo con el modelo estándar sobre la activación de RepA (derivado de nuestros estudios anteriores) probablemente correspondan a : I) la unión primera de un dímero al extremo 3' del iterón, a través de uno de sus dos dominios C-terminales (WH2); II) la disociación subsiguiente del dímero, permaneciendo una de sus subunidades unida transitoriamente como monómero al DNA a través de WH2; III) la interacción posterior del dominio WH1 libre con el extremo 5' del iterón. Este modelo queda reflejado en la figura 36.

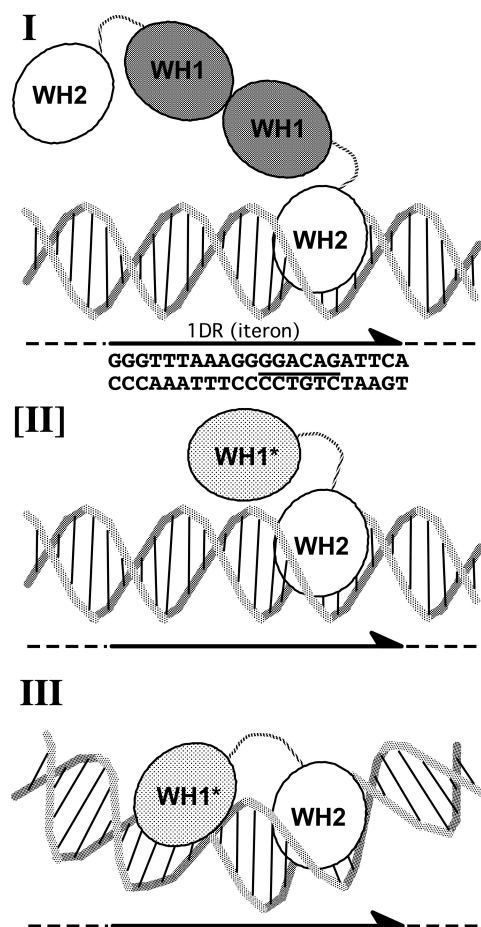


Figura 36. Modelo propuesto para explicar el perfil de tres estados obtenido en la curva de unión de la proteína RepA-WT a un iterón. En el paso III destacamos la curvatura del DNA como consecuencia de presentar la proteína dos puntos de interacción con la secuencia del primero.

Esta interpretación nuestra del posible modelo de interacción entre RepA-WT y 1DR, con la presencia de una especie intermedia de transición en la curva de unión, se ve apoyada por lo ya publicado por (Poujol, N. y col., 2003), en donde se justifica la presencia de un hombro en la curva de titulación, mediante anisotropía de fluorescencia, de un complejo de proteínas receptoras para el ácido

retinoico con la secuencia de un DNA específico, como debida a la existencia de una especie intermediaria en la unión.

La posibilidad de que la existencia de este hombro se deba a la formación del complejo final RepA-WT+1DR, y que la tercera meseta fuese el resultado de la unión no específica de proteína al iterón (formación de complejo no específico) no resulta posible, ya que a las concentraciones de proteína a las que se da no son suficientes para que se produzca la formación de un complejo no específico.

Además, los resultados obtenidos para las muestras de las distintas secuencias de DNA libre y en presencia de máxima concentración de proteína, y también para la muestra de proteína a la concentración de este intermediario unida al 1DR, nos pusieron de manifiesto que al no existir una variación significativa de las vidas medias entre muestras sin y con proteína, el incremento en la anisotropía durante la titulación es debido a la formación de los distintos complejos.

En su conjunto, los resultados de la primera sección de esta Tesis constituyen la primera caracterización en disolución realizada, para una proteína iniciadora del tipo Rep, de la asociación con sus secuencias específicas reguladoras (operador) e iniciadora (iterón). Además, nuestros estudios aportan los primeros datos experimentales de la existencia de un intermediario en la unión de RepA a esta última que, si bien era esperable dentro del modelo estándar de activación de RepA (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004), no había sido obtenido con anterioridad

La curva de unión de la proteína RepA-WT con el 1DR marcado con Cy3 nos mostró la presencia de un posible intermediario [II] en la curva de unión. Al no ser posible hacer un estudio de decaimientos de anisotropía de fluorescencia para obtener información de la forma del complejo por la corta vida media del Cy3, pensamos en hacer esta misma curva de unión pero titulando con un mutante

monomérico de RepA-WT (RepA-R93C) y así poder obtener más detalles acerca de dicho posible paso intermedio en la formación del complejo RepA-WT+1DR.

Como se comentó en la sección de resultados, la proteína RepA-R93C es un mutante monomérico de la proteína nativa, que aumenta el número de copias en *Pseudomonas* hasta siete veces más que la proteína RepA-WT y presenta una mayor afinidad por la secuencia de los iterones que la silvestre.

Los resultados obtenidos nos muestran un perfil de unión de RepA-R93C+1DR ajustable a dos estados y con una ligera mejora de la afinidad por la secuencia del iterón al compararla con la de la silvestre. Al comenzar la titulación del 1DR con la proteína en estado monomérico, el intermediario de transición desaparecería, ya que ya no sería necesario el cambio estructural de la proteína para poder unirse a esta secuencia de DNA. Estos resultados son consistentes con la mencionada existencia de un intermediario de transición en la curva de unión de RepA-WT al iterón.

C. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AGENTES AGLOMERANTES EN LA AFINIDAD DE REPA-WT POR LA SECUENCIA DE UN ITERÓN

La unión de la proteína RepA-WT a la secuencia 1DR en condiciones ideales es de baja afinidad (Giraldo, R. y col., 1998); y esta Tesis)

Sin embargo, dichas interacciones de baja afinidad, se encuentran favorecidas *in vitro* en presencia de aditivos proteicos a concentraciones elevadas (140 mg/ml).

Es importante destacar a este nivel, que en dichas condiciones de aglomeración macromolecular se mantiene la presencia del intermediario de transición que aparece en la curva de titulación en condiciones ideales. Este dato apoya nuestro modelo de tres estados, discutido en la sección anterior.

En conjunto, los experimentos de EMSA en condiciones aglomerantes, junto con los aquí presentados de anisotropía de fluorescencia, constituyen la primera aproximación realizada hasta el momento al efecto de condiciones que simulan el entorno intracelular para el estudio de la asociación de una proteína de la familia de RepA con secuencias específicas de DNA.

En principio, si bien la asociación inicial de RepA con la secuencia del iterón presenta baja afinidad, está caracterizado que su interacción con las otras tres repeticiones contiguas de dicha secuencia en el origen de replicación de pPS10, resulta en una asociación cooperativa de gran eficiencia (Diaz-Lopez, T. y col., 2003). Las condiciones intracelulares aglomeradas no harían sino facilitar esa primera interacción, disparando el proceso de asociación.

En diversos sistemas homólogos (proteínas Rep de plásmidos P1, F, R6K y RK2) se ha descrito el requerimiento de chaperonas (bien sea de la familia DnaK-J-GrpE o ClpA/X) para la disociación activa de sus dímeros *in vivo* (Sozhamannan, S. y Chattoraj, D.K., 1993); (Wickner, S. y col., 1994). Nuestros resultados, que apoyan un papel más activo de las secuencias diana de DNA en dicho proceso de

disociación y cambio conformacional (Díaz-López, T. y col., 2003), sugieren más bien un segundo papel para las chaperonas, que justifica su requerimiento *in vivo* : al unirse a regiones hidrofóbicas de las proteínas Rep, transitoriamente exponen tras el cambio conformacional asociado a su disociación, para así evitar los procesos de agregación característicos de los monómeros de estas proteínas (Díaz-López, T. y col., 2003)

D. PROCESOS DE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA NO RADIATIVA (FRET)

5.1 Transferencia de energía no radiativa entre residuos aromáticos de la proteína RepA-WT

Los experimentos realizados a este nivel nos han permitido estudiar variaciones en la intensidad de fluorescencia de fenómenos de transferencia de energía no radiativa entre los residuos de tirosina y el único triptófano de la proteína RepA-WT cuando la proteína se encuentra en forma dimérica y en forma monomérica. En los espectros obtenidos tanto para la proteína en forma dimérica como monomérica, podemos observar la fuerte contribución que el Trp94 presenta. Una significativa parte de esta contribución al espectro es debida a las tirosinas presentes en la proteína. Si observamos la contribución de estas en el espectro de emisión de la proteína dimérica observamos que es ligeramente más pequeña que la contribución de las mismas cuando la proteína se encuentra en forma monomérica, sugiriendo así que en el estado monomérico el acoplamiento existente entre los residuos de Tyr y el Trp es distinto (reflejado en una menor contribución de FRET) al que se presenta en forma dimérica

5.2 Transferencia de energía no radiativa entre el Trp94 de la proteína RepA-WT y la sonda IAEDANS localizada en posición 160

Como ya se ha comentado en la introducción de esta Tesis, los procesos FRET se pueden definir como interacciones dependientes de la distancia que se producen en el estado excitado y en los cuales la emisión de un fluoróforo está acoplada a la excitación de otro. Esta relación con la distancia concede a esta técnica la capacidad de ser empleada en aquellos estudios, como los aquí presentados sobre RepA del plásmido pPS10, en los que se desee obtener información acerca de los cambios estructurales (medibles a través de la variación en la distancia) que experimenta una proteína al interactuar con distintas secuencias específicas de DNA.

Desde el principio, decidimos buscar un fluoróforo que formara un par donador-aceptor con el Trp94 intrínseco de la proteína, es decir, cuyo valor de R_0 fuera adecuado para estimar las distancias en nuestra proteína.

Los mutantes de RepA-WT fueron diseñados para situar, en los elementos que estimábamos sufrían un mayor cambio estructural en la monomerización de ésta (Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E., 2004), un único residuo de Cys en la proteína que pudiera ser derivatizable con el fluoróforo elegido (IAEDANS). Por los motivos comentados en la sección de resultados, el mutante soluble que presentaba una variación en la distancia adecuada para ser medida mediante la técnica FRET era RepA-C160. En la figura 37 se muestran las distancias existentes entre el Trp94 y el residuo de cisteína C160 en estado dimérico y monomérico.

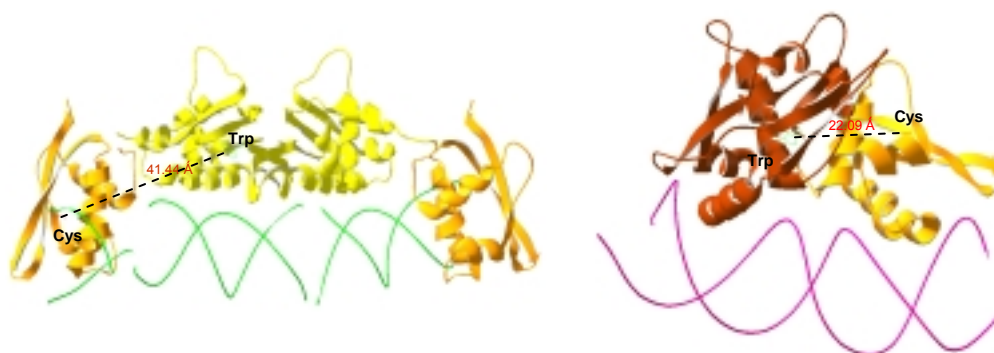


Figura 37. La figura muestra los modelos del dímero de RepA de pPS10 (dRepA, izq.) y del monómero (mRepA, drcha), unidos al operador (verde) o a un iterón (rosa). Se muestran las distancias existentes entre el Trp94 y el residuo C160 en ambas conformaciones.

Además, los experimentos realizados mediante técnicas espectroscópicas (CD y fluorescencia) y ultracentrifugación analítica pusieron de manifiesto que ambas

proteínas, silvestre y mutada, no presentaban cambios significativos en sus estructuras, con lo cual, las variaciones en la distancia obtenidas para el mutante serían atribuibles también a la proteína nativa.

El estudio de FRET se llevó a cabo mediante:

1. Espectro de emisión excitando a la longitud de onda del Trp94 donador (295 nm) y estudiando la emisión del donador y del aceptor.
2. Espectro de emisión del aceptor
3. Espectro de excitación estudiado a la longitud de onda (500 nm) del aceptor y adquirido en un rango de longitudes a las que se excitan el donador y el aceptor.

1. Espectro de emisión excitando a la longitud de onda del Trp94 donador (295 nm) y estudiando la emisión del donador y del aceptor.

Este espectro (fig.34) refleja cómo la intensidad del donador (Trp94) disminuye al interactuar con 1DR a medida que aumenta la intensidad del aceptor en el mismo proceso FRET. En el espectro para el complejo con IR, si bien existe una disminución en la emisión del Trp94, no se observa un aumento proporcional asociado al espectro de emisión para el IAEDANS. Este resultado pone de manifiesto que el espectro obtenido para la muestra RepA-WT+IR nos sirve como control para eliminar el efecto de filtro interno en la medida debido al propio DNA. Este efecto se observa en los resultados de vidas medias obtenidos para la proteína RepA-WT libre y en presencia de IR y 1DR utilizando como sonda el Trp94 (ver sección resultados). En ellos observamos una ligera disminución en las vidas medias de las muestras con DNA con respecto a la muestra con sólo proteína. Esta disminución en el tiempo de vida media de fluorescencia por la presencia del DNA, se traduce en una disminución de la intensidad de fluorescencia, que observamos en nuestro espectro para la muestra RepA-WT+IR.

2. Espectro de emisión del aceptor

Por medio de este espectro podemos observar que, prácticamente, no existen variaciones en la forma del espectro de emisión del aceptor cuando excitamos directamente al mismo. Un resultado opuesto sería indicativo de que la sonda, presenta variaciones espectrales al interactuar con las distintas secuencias de DNA, independientemente del proceso FRET, con lo cual la sonda empleada no habría sido adecuada para el estudio. Sin embargo, también podemos apreciar que disminuye ligeramente la intensidad de fluorescencia en las muestras con DNA atribuibles al mismo efecto de filtro interno observado en el espectro de emisión del Trp94.

3. Espectro de excitación estudiado a la longitud de onda (500 nm) del aceptor y adquirido en un rango de longitudes a las que se excitan el donador y el aceptor.

En este espectro el rasgo a destacar radica en la contribución a 280 nm de excitación del Trp94 cuando ponemos a la proteína en presencia del iterón. Este hecho refleja la energía transferida desde el Trp94 a la longitud de onda de 280nm hasta el IAEDANS (en posición 160) cuando observamos a éste último a una longitud de onda a la que sólo él emite. Las demás situaciones (proteína sola y unida al operador) no presentan esta contribución.

Todos estos resultados apuntan a la existencia de transferencia de energía en condiciones de unión al iterón (estado monomérico) y de no transferencia de energía en la unión de la proteína a IR y de la proteína sola (estado dimérico).

En su conjunto, la aplicación (novedosa en una proteína del tipo Rep) de la metodología FRET, nos ha permitido el corroborar uno de los postulados esenciales del modelo estándar de activación conformacional de RepA, inducido por la secuencia específica del iterón. Un cambio en la compacidad relativa entre los dominios WH1 y WH2 de la proteína, que adoptan sus respectivas “cabezas

lectoras de DNA” (motivos HTH) al distinto espaciado de sus dianas en el DNA (más próximas en el iterón y más distantes en el operador). Hasta el presente, los estudios de mayor resolución sobre dicho proceso se basaban en los estudios cristalográficos de los dominios WH1 del dímero de RepA y del monómero de una proteína homóloga (RepE) (Giraldo, R. y col., 2003) y a técnicas espectroscópicas promedio (CD) o a estudios hidrodinámicos (Díaz-López, T. y col., 2003) sobre la proteína completa.

6.-CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Se ha podido caracterizar, por primera vez en disolución, las interacciones entre la proteína RepA-WT y las secuencias de operador (IR) y de un iterón (1DR) mediante la técnica de espectroscopia de fluorescencia. Estos experimentos nos han permitido identificar un posible intermediario en la formación del complejo RepA-WT+1DR.
2. La afinidad de la proteína RepA-WT por la secuencia 1DR se ve mejorada en condiciones de aglomeración macromolecular. La curva de unión mantiene el mismo perfil de tres estados obtenido en condiciones ideales.
3. Se han caracterizado los cambios en la organización de los aromáticos vecinos del Trp94 en el dominio WH1, asociados al cambio estructural sufrido en la formación del complejo RepA-WT+1DR, a partir de medidas de transferencia de energía no radiativa (FRET) Tirosina→Triptófano y de anisotropía de fluorescencia.
4. Las propiedades espectroscópicas del único residuo de Trp intrínseco de la proteína RepA-WT (Trp94) no sufren grandes cambios al formarse los complejos proteína-ADN, por lo que éste residuo resulta ser un donador óptimo en estudios FRET de determinación de distancias intramoleculares en RepA-WT
5. Los estudios de FRET realizados en la proteína RepA-WT, entre el donador Trp94 (dominio WH1) y el aceptor IAEDANS, unido covalentemente a la Cys160 (dominio WH2), nos han permitido caracterizar la variación en la distancia interdominios existente entre los distintos estados de asociación de la proteína.

7.-BIBLIOGRAFÍA

- Abhyankar, M., Zzaman, S. y Bastia, D. (2003) Reconstitution of R6K DNA Replication in Vitro Using 22 Purified Proteins. *J. Biol. Chem.*, **278**, 45476-45484.
- Abril, A.M., Salas, M., Andreu, J.M., Hermoso, J.M. y Rivas, G. (1997) Phage phi29 protein p6 is in a monomer-dimer equilibrium that shifts to higher association states at the millimolar concentrations found in vivo. *Biochemistry*, **36**, 11901-11908.
- Beechem, J.M. (1992) Global analysis of biochemical and biophysical data. *Methods Enzymol*, **210**, 37-54.
- Birks, J. y Munro, I. (1967) The fluoresce lifetimes of aromatic molecules. *Progress in react. kin.*, 239-303.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bramhill, D. y Kornberg, A. (1988a) Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the E. coli chromosome. *Cell*, **52**, 743-755.
- Bramhill, D. y Kornberg, A. (1988b) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell*, **54**, 915-918.
- Cañadas, O. (2002) Tesis Doctoral, Univ. Alcalá.
- Cantor, C. y Schimmel, P. (1980) *Biophysical Chemistry*, **Editado por Freeman WH y Co. San Francisco**.
- Chattoraj, D.K., Ghirlando, R., Park, K., Dibbena, J.A. y Lewis, M.S. (1996) Dissociation kinetics of RepA dimers: implications for mechanisms of activation of DNA binding by chaperones. *Genes Cells*, **1**, 189-199.
- Chattoraj, D.K., Snyder, K.M. y Abeles, A. (1985) P1 plasmid replication: multiple functions of RepA protein at the origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 2588-2592.
- Cruickshank, J., Shire, K., Davidson, A.R., Edwards, A.M. y Frappier, L. (2000) Two domains of the Epstein-Barr virus origin DNA-binding protein,

- EBNA1, orchestrate sequence-specific DNA binding. *J Biol Chem*, **275**, 22273-22277.
- DasGupta, a., Mukhopadhyay, G., Papp, P.P., Lewis, M.S. y Chatteraj, D.K. (1993) Activation of DNA binding by the monomeric form of the P1 replication initiator RepA by heat shock proteins DnaJ and DnaK. *J Mol Biol*, **232**, 23-24.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. y Diaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 434-464.
- Díaz-López, T. (2004) Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid.
- Diaz-Lopez, T., Lages-Gonzalo, M., Serrano-Lopez, A., Alfonso, C., G., R., Diaz-Orejas, R. y Giraldo, R. (2003) Structural changes in RepA, a plasmid replication initiator, upon binding to origin DNA. *J Biol Chem*, **278**, 18606-18616.
- Dibbens, J.A., Muraiso, K. y Chatteraj, D.K. (1997) Chaperone-mediated reduction of RepA dimerization is associated with RepA conformational change. *Mol.Microbiol.*, **26**, 185-195.
- Dodson, M., Roberts, J., McMacken, R. y Echols, H. (1985) Specialized nucleoprotein structures at the origin of replication of bacteriophage lambda: complexes with lambda O protein and with lambda O, lambda P, and Escherichia coli DnaB proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4678-4682.
- Fernández-Tresguerres, M.E., Martín, M., García de Viedma, D., Giraldo, R. y Díaz-Orejas, R. (1995) Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *Journal of Bacteriology*, **177**, 4377-4384.
- Filutowicz, M., McEachern, M.J. y Helinski, D.R. (1986) Positive and negative roles of an initiator protein at an origin of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9645-9649.

- Gajiwala, K., S. y Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 110-116.
- García de Viedma, D., Giraldo, R., Rivas, G., Fernández-Tresguerres, M.E. y Díaz-Orejas, R. (1996) A leucine zipper motif determines different functions in a DNA replication protein. *The EMBO Journal*, **15**.
- García de Viedma, D., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Lurz, R. y Díaz-Orejas, R. (1995) Transcription of *repA*, the gene of the initiation protein of the *Pseudomonas* plasmid pPS10, is autorregulated by interactions of the RepA protein at a symmetrical operator. *J.Mol.Biol.*, **247**, 211-223.
- Germino, J. y Bastia, D. (1983) Interaction of the plasmid R6K-encoded replication initiator protein with its binding sites on DNA. *Cell*, **34**, 125-134.
- Giraldo, R. (1991) Tesis Doctoral Univ. Complutense (Madrid).
- Giraldo, R. (2003) Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, 533-554.
- Giraldo, R., Andreu, J.M. y Diaz-Orejas, R. (1998) Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *The EMBO Journal*, **17**, 4511-4526.
- Giraldo, R. y Diaz, R. (1992) Differential binding of wild-type and a mutant RepA protein to oriR sequence suggests a model for the initiation of plasmid R1 replication. *J Mol Biol*, **228**, 787-802.
- Giraldo, R., Fernández-Tornero, C., Evans, P.H., Díaz-Orejas, R. y Romero, A. (2003) A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat Struct Biol*, **10**, 565-571.
- Giraldo, R. y Fernandez-Tresguerres, M.E. (2004) Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid*, **52**, 69-83.

- Giraldo-Suarez, R., Fernandez-Tresguerres, E., Diaz-Orejas, R., Malki, A. y Kohiyama, M. (1993) The heat-shock DnaK protein is required for plasmid R1 replication and it is dispensable for plasmid ColE1 replication. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5495-5499.
- Gottesman, S. y Stout, V. (1991) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol*, **5**, 1599-1606.
- Grinvald, A. (1976) The use of standards in the analysis of fluorescence decay data. *Anal Biochem*, **75**, 260-280.
- Grinvald, A. y Steinberg, I.Z. (1974) On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Anal Biochem*, **59**, 583-598.
- Hames, B.D. (1981) Gel electrophoresis of proteins, a practical approach. In Ed. Hames, B.D.R., D. (ed.), Oxford, pp. 1-91.
- Hoskins, J.R., Kim, S.Y. y Wickner, S. (2000a) Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J Biol Chem*, **275**, 35361-35367.
- Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R. y Wickner, S. (2000b) Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8892-8897.
- Ingmer, H., Fong, E.L. y Cohen, S. (1995) Monomer–dimer Equilibrium of the pSC101 RepA Protein. *J.Mol.Biol.*, **250**, 309-314.
- Ishiai, M., Wada, C., Kawasaki, Y. y Yura, T. (1994) Replication Initiator Protein RepE of Mini-F Plasmid: Functional Differentiation Between Monomers (Initiator) and Dimers (Autogenous Repressor). *PNAS*, **91**, 3839-3843.
- Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M.R. y Steven, A.C. (2001) Translocation pathway of protein substrates in ClpAP protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4328-4333.
- Jablonski, A. (1957) Decay of photoluminescence of solutions. *Acta Phis.Polon.*, **26**, 471.
- Jen-Jacobson, L., Engler, L.E. y Jacobson, L.A. (2000) Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins. *Structure Fold Des*, **8**, 1015-1023.

- Kawasaki, Y., Matsunaga, F., Kano, Y., Yura, T. y Wada, C. (1996) The localized melting of mini-F origin by the combined action of the mini-F initiator protein (RepE) and HU and DnaA of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 42-49.
- Kawasaki, Y., Wada, C. y Yura, T. (1990) Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. *Mol Gen Genet*, **220**, 277-282.
- Komori, H., Matsunaga, F., Higuchi, Y., Ishiai, M., Wada, C. y Miki, K. (1999) Crystal structure of a prokaryotic replication initiator protein bound to DNA at 2.6 Å resolution. *EMBO J.*, **18**, 4597-4607.
- Konieczny, I. y Helinski, D.R. (1997) Helicase delivery and activation by DnaA and TrfA proteins during the initiation of replication of the broad host range plasmid RK2. *J Biol Chem*, **272**, 33312-33318.
- Krüger, R., Rakowski, S.A. y Filutowicz, M. (2004) Isomerization and apparent DNA bending by pi, the replication protein of plasmid R6K. *Biochem Biophys Res Commun.*, **313**, 834-840.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature structural biology*, **227**, 680-685.
- Lakowicz, J. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. **2nd ed.**
- Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.*, **119**, 1072-1074.
- Lee, D.G., Makhov, A.M., Klemm, R.D., Griffith, J.D. y Bell, S.P. (2000) Regulation of origin recognition complex conformation and ATPase activity: differential effects of single-stranded and double-stranded DNA binding. *Embo J*, **19**, 4774-4782.
- Lefstin, J.A. y Yamamoto, K.R. (1998) Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature*, **392**, 885-888.

- Lima, L.M. y de Prat-Gay, G. (1997) Conformational changes and stabilization induced by ligand binding in the DNA-binding domain of the E2 protein from human papillomavirus. *J Biol Chem*, **272**, 19295-19303.
- Maestro, B., Sanz, J.M., Díaz-Orejas, R. y Fernández-Tresguerres, M.E. (2003) Modulation of pPS10 Host Range by Plasmid-Encoded RepA Initiator Protein. *J. Bacteriol.*, **185**, 1367-1375.
- Manen, D., Upegui-Gonzalez, L. y Caro, L. (1992) Monomers and Dimers of the RepA Protein in Plasmid pSC101 Replication: Domains in RepA. *PNAS*, **89**, 8923-8927.
- Masson, L. y Ray, D.S. (1986) Mechanism of autonomous control of the Escherichia coli F plasmid: different complexes of the initiator/repressor protein are bound to its operator and to an F plasmid replication origin. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 5693-5711.
- Minton, A.P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 34-39.
- Minton, A.P. (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem*, **276**, 10577-10580.
- Mukherjee, S., Patel, I. y Bastia, D. (1985) Conformational changes in a replication origin induced by an initiator protein. *Cell*, **43**, 189-197.
- Mukhopadhyay, G. y Chattoraj, D.K. (1993) Conformation of the Origin of P1 Plasmid Replication : Initiator Protein Induced Wrapping and Intrinsic Unstacking. *J.Mol.Biol.*, **231**, 19-28.
- Nieto, C., Giraldo, R., Fernandez-Tresguerres, E. y Diaz, R. (1992) Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for Pseudomonas isolated from Pseudomonas syringae patovar savastanoi. *J Mol Biol*, **223**, 415-426.
- Norman, D.G., Grainger, R.J., Uhrin, D. y Lilley, D.M. (2000) Location of cyanine-3 on double-stranded DNA: importance for fluorescence resonance energy transfer studies. *Biochemistry*, **39**, 6317-6324.

- Perrin, F. (1926) Polarisation de la lumiere de fluorescence. Vie moyenne des molecules dans l'état excité. *J.Phys. Radium V*, **7**, 390-401.
- Poujol, N., Margeat, E., Baud, S. y Royer, C. (2003) RAR antagonists diminish the level of DNA binding by the RAR/RXR heterodimer. *Biochemistry*, **42**, 4918-4925.
- Rivas, G., Ferrone, F. y Herzfeld, J. (2004) Life in a crowded world. *EMBO Rep*, **5**, 23-27.
- Rivas, G. y Minton, A.P. (1993) New developments in the study of biomolecular associations via sedimentation equilibrium. *Trends Biochem Sci.*, **18**, 284-287.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Schmid, F. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *Creighton, TE ed, Protein structure: A practical approach Oxford University press*, 261-297.
- Sozhamannan, S. y Chatteraj, D.K. (1993) Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiator binding to the origin. *J. Bacteriol.*, **175**, 3546-3555.
- Spencer, R.D. y Weber, G. (1970) influence of brownian rotations and energy transfer upon the measurements of fluorescence lifetimes. *j.Chem.Phys.*, **52**, 1654-1663.
- Spolar, R.S. y Record, M.T., Jr. (1994) Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science*, **263**, 777-784.
- Squire, P.G. y Himmel, M.E. (1979) Hydrodynamics and protein hydration. *Arch Biochem Biophys*, **196**, 165-177.
- Szabo, A.G. y Rayner, D.M. (1980) The time resolved emission spectra of peptide conformers measured by pulsed laser excitation. *Biochem Biophys Res Commun*, **94**, 909-915.
- Urh, M., Wu, J., Wu, J., Forest, K., Inman, R.B. y Filutowicz, M. (1998) Assemblies of replication initiator protein on symmetric and asymmetric

- DNA sequences depend on multiple protein oligomerization surfaces. *J.Mol.Biol.*, **283**, 619-631.
- van den Berg, B., Ellis, R.J. y Dobson, C.M. (1999) Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *Embo J*, **18**, 6927-6933.
- Viadin, H. y Aggarwal, A.K. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 889-895.
- Ware, W. (1971) Creation and detection of the excited state. *Ed. Lamola AA y Dekker M. New York*, 213-302.
- Weber, G. (1952) Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method. *Biochem J*, **51**, 145-155.
- Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K. y Maurizi, M.R. (1994) A Molecular Chaperone, ClpA, Functions Like DnaK and DnaJ. *PNAS*, **91**, 12218-12222.
- Wickner, S., Hoskins, J. y McKenney, K. (1991) Monomerization of RepA Dimers by Heat Shock Proteins Activates Binding to DNA Replication Origin. *PNAS*, **88**, 7903-7907.
- Wickner, S., Skowyra, D., Hoskin, J. y McKenney, K. (1992) DnaJ, DnaK, and GrpE Heat Shock Proteins are Required in oriP1 DNA Replication Solely at the RepA Monomerization Step. *PNAS*, **89**, 10345-10349.
- Wu, J., Sektas, M., Chen, D. y Filutowicz, M. (1997) Two forms of replication initiator protein: Positive and negative controls. *PNAS*, **94**, 13967-13972.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Yguerabide, J. (1972) Enzyme structure. *Methods in Enzymology*, **part C**, 498.
- Yguerabide, J. y Yguerabide, E. (1984) Optical techniques in biological research. **Cap.4**, 181-290.
- Zimmerman, S.B. y Minton, A.P. (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **22**, 27-65.