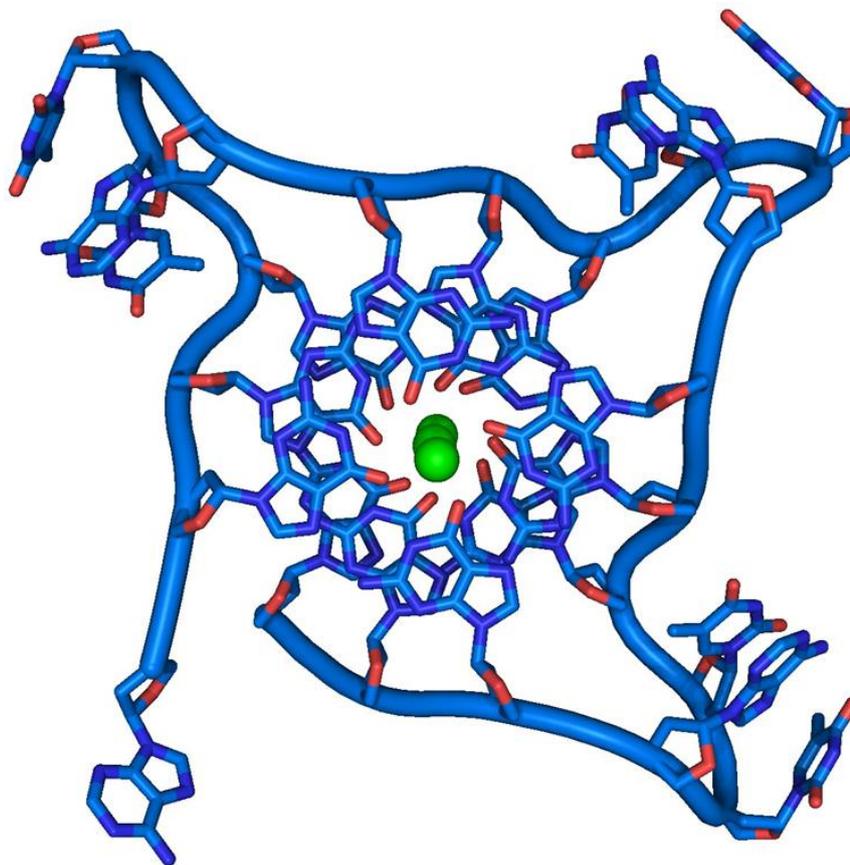




UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Facultad de Medicina
Dpto. Biología Molecular

“Motores moleculares que interaccionan con estructuras G-quadruplex en el DNA”



Eric Amado Begines
Santander, 2017

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



“Motores moleculares que interaccionan con estructuras G-quadruplex en el DNA”

Eric Amado Begines

2017

La **Dra. María Elena Cabezón Navarro**, Profesora Titular de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

CERTIFICA:

Que el Licenciado Eric Amado Begines ha realizado bajo su dirección, el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado MOTORES MOLECULARES QUE INTERACCIONAN CON ESTRUCTURAS G-QUADRUPLEX EN EL DNA.

Considero que este trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al grado de doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Santander, a de de 2017

Fdo. María Elena Cabezón Navarro

El presente trabajo ha sido realizado entre el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y el Departamento de Microbiología y Genómica del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) bajo la dirección de la Doctora María Elena Cabezón Navarro y gracias a una beca predoctoral de la UC.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Gobierno de Cantabria y a la Universidad de Cantabria, la oportunidad que me han brindado, apostando por una nueva generación de investigadores.

Mi camino ha sido fácil, he hecho lo que más me gusta, investigar. He disfrutado cada experimento, cada bache, me gusta luchar, y sin ellos, no habría aprendido.

Me gustaría alentar a los que vengan detrás de mí. Investigar sí se puede compaginar con una vida personal sana y saludable. Sí, puede conciliarse con una vida familiar plena. Porque ser disciplinado y respetar un horario no limita la creatividad, ni te hace un pésimo investigador. El miedo, la inestabilidad laboral, sí. No es un entorno acostumbrado a respetar los mínimos del marco legal laboral, pero se debe tomar conciencia. Cada hora trabajada por uno de nosotros tiene un valor incalculable. Me gustaría alentar a quien viene detrás a que se considere un trabajador altamente cualificado, hasta este punto, cualquiera de nosotros ha demostrado pasión y devoción por lo que hacemos. Cada vez que acepte trabajar sin cobrar, sumar horas presentistas para satisfacer a un jefe o gestor, estará devaluando la profesión. Devaluando el valor de nuestro trabajo.

Gracias a las Becas de Investigación de la Universidad de Cantabria, de todo corazón. Gracias al magnífico equipo administrativo, es un equipo profesional y humano. Gracias.

A la Universidad de Cantabria, a Cantabria, a mis hijos Hector y Diego

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	005
1.1. Motores implicados en transferir DNA a través de membranas biológicas	005
1.1.1. Motores moleculares implicados en conjugación bacteriana	007
1.1.1.1. Conjugación bacteriana a través de un Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS): TrwB del plásmido R388	008
1.1.1.2. Conjugación bacteriana en <i>Streptomyces venezuelae</i> : TraB del plásmido pSVH1	014
1.1.2. Motores moleculares implicados en división bacteriana: FtsK	017
1.1.3. Motores moleculares implicados en esporulación: SpoIIIE	021
1.2. Motores moleculares implicados en la resolución de estructuras G-quadruplex en el DNA	023
1.2.1. Estructuras G-quadruplex	023
1.2.2. I-motifs	026
1.2.3. Secuencias potencialmente capaces de formar estructuras G-quadruplex y programas de predicción de estas estructuras	028
1.2.4. RecQ: un motor molecular que resuelve estructuras G-quadruplex	029
2. OBJETIVOS	033
3. MATERIALES Y METODOS	036
3.1. Cepas bacterianas	036
3.2. Plásmidos	036
3.3. Medios de cultivo	037
3.4. Oligonucleótidos	037

3.5. Técnicas de Biología Molecular	040
3.5.1. Clonaje y amplificación de DNA por PCR	040
3.5.2. Formación de los diferentes sustratos de DNA	042
3.5.2.1. DNA doble cadena	042
3.5.2.2. DNA G-quadruplex intramolecular	042
3.5.2.3. DNA G-quadruplex intermolecular	042
3.5.3. Análisis de estructuras de DNA	042
3.6. Técnicas de Microbiología	043
3.6.1. Ensayos de crecimiento bacteriano	043
3.6.2. Preparación de células electrocompetentes	044
3.6.3. Electroporación de células competentes	044
3.6.4. Ensayos de conjugación	045
3.7. Técnicas Bioquímicas	045
3.7.1. Purificación de proteínas	045
3.7.1.1. Purificación de TrwA-His	046
3.7.1.2. Purificación de TrwB Δ N70	046
3.7.1.3. Purificación de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79	047
3.7.2. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-PAGE	047
3.7.3. Cuantificación de proteínas	047
3.7.3.1. Método colorimétrico (BCA)	048
3.7.3.2. Método espectrofotométrico	048
3.7.4. Ensayos de filtración en gel	048
3.7.5. Ensayos de actividad ATPasa	048
3.7.6. Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)	049
3.7.7. Ensayos de translocación	050
3.7.8. Ensayos helicasa	051
3.8. Técnicas de Análisis Estructural	052
3.8.1. Ultracentrifugación analítica	052
3.8.2. Ensayos de cristalización	052
3.8.3. Microscopia electrónica	053
4. RESULTADOS	056

4.1. Caracterización bioquímica de TraB	056
4.1.1. Sobreexpresión y Purificación de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79	057
4.1.2. Análisis de la actividad ATPasa	059
4.1.2.1. Actividad ATPasa dependiente de DNA	059
4.1.2.2. Actividad ATPasa dependiente del valor de pH	060
4.1.2.3. Actividad ATPasa dependiente de Mg ²⁺ y otras sales	061
4.1.2.4. Actividad ATPasa dependiente de la secuencia y estructura del DNA	063
4.1.3. Ensayos de unión a diferentes sustratos de DNA	066
4.1.4. Ensayos de translocación sobre diferentes sustratos de DNA	076
4.2. Caracterización estructural de TraB	082
4.2.1. Análisis del estado oligomérico	082
4.2.1.1. Filtración en gel de TraB Δ N270	082
4.2.1.2. Ultracentrifugación analítica de TraB Δ N270	086
4.2.2. Análisis estructural	088
4.2.2.1. Ensayos de cristalización de TraB Δ N270	088
4.2.2.2. Microscopía electrónica de TraB Δ N270	089
4.3. Análisis comparativo de la actividad de TraB frente a otros motores moleculares implicados en translocar DNA	091
4.3.1. Análisis de la actividad ATPasa de TrwB Δ N70 con sustratos G-quadruplex	092
4.3.2. Análisis de la actividad ATPasa de TrwB Δ N70 con sustratos G-quadruplex en presencia de TrwA	093
4.3.3. Análisis de la actividad ATPasa de RecQ con estructuras G-quadruplex	094
4.3.4. Ensayos de translocación de TrwB Δ N70	096
4.3.5. Ensayos de translocación de TrwC	101
4.4. Estructuras G-quadruplex y su implicación en motores moleculares que translocan DNA	102
4.4.1. Búsqueda de secuencias del tipo G-quadruplex en plásmidos de interés utilizando herramientas bioinformáticas	102
4.4.1.1. Análisis de secuencias en el plásmido R388	102

4.4.1.2. Análisis estadístico en relación a la significancia de los datos obtenidos sobre las secuencias G-quadruplex en R388	103
4.4.1.3. Análisis de secuencias en el plásmido pSVH1	105
4.4.2. Análisis de la capacidad de secuencias localizadas en R388 y pSVH1 para formar estructuras G-quadruplex	107
4.4.2.1 Análisis con secuencias del plásmido R388	107
4.4.2.2 Análisis con secuencias del plásmido pSVH1	108
4.4.3. Análisis del efecto <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de compuestos que se unen a estructuras G-quadruplex	110
4.4.3.1. Efecto del compuesto N-Metil-Mesoporfirina en el crecimiento de <i>E.coli</i>	110
4.4.3.2. Efecto del compuesto N-Metil-Mesoporfirina en la conjugación bacteriana	112
4.4.3.3. Efecto del compuesto N-Metil-Mesoporfirina en la actividad ATPasa de TrwB dependiente de G4-DNA	113
5. DISCUSIÓN	117
6. CONCLUSIONES	127
7. BIBLIOGRAFÍA	131

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

μF	Microfaradios
μg	Microgramos
μM	Micromolar
μl	Microlitros
A	Adenina
Å	Angström
aa	aminoácidos
ADP	Adenosine diphosphate (adenosina difosfato)
A _p	Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa	Actividad adenosina trifosfatasa
BCA	Bicinconinic acid (ácido bicinconínico)
BSA	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
C	Citosina
clt	Cis locus for transfer (locus de transferencia en cis)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxorribonucleotid acid (ADN, ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidad óptica
dsDNA	Double strand DNA (ADN doble cadena)
dtr	DNA transfer and replication (transferencia y replicación de ADN)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacetico
G	Guanina
g	Gramos
G4 DNA	DNA G-quadruplex (ADN G-quadruplex) Helicase and RNase-D C-terminal (dominio C-terminal de helicasa de RNAasa D)
HRDC	
I	Intensidad
incP	Incompatibility group P (grupo de incompatibilidad P)
incW	Incompatibility group W (grupo de incompatibilidad W)
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (isopropiltiogalactopiranosido)
K ⁺	Potasio
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
K _M	Constante de Michaelis Menten
KOPS	FtsK orienting polar sequence (secuencias de orientación de FtsK)
kV	Kilovoltios
l	Litros

LB	Luria-Bertani
LD	Lactato deshidrogenasa
m/v	Masa/volumen
mAU	Miliabsorbance units (miliunidades de absorbancia)
MDa	Megadalton
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mpf	Mating pair formation (formación del par de acoplamiento)
N	Nucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
NTP	Nucleótido trifosfato
N _x	Ácido nalidíxico
o/n	Over night
°C	Grados Celsius
oriC	Origin of replication
oriT	Origen de transferencia
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de polimerasa)
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenglicol
PEP	Phosphoenolpyruvate (fosfoenolpiruvato)
pH	Potencial de Hidrogeno
P _i	Fosfato
pI	Punto Isoeléctrico
PK	Piruvato kinasa
Pm	Peso molecular
R _f	Rifampicina
RPM	Revoluciones por minuto
Rto	Rendimiento
SDS	Sodium dodecyl sulphate (dodecil sulfato sódico)
Sm	Streptomycin
<i>S. venezuelae</i>	<i>Streptomyces venezuelae</i>
spd	Spread (propagación)
ssDNA	Single strand DNA (ADN de cadena simple)
SRS	SpoIIIE recognition sequence (secuencia de reconocimiento de SpoIIIE)
T	Timina
T4SS	Type 4 secretion system (sistema de secreción tipo 4)
T ^a	Temperatura

TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
ter	Termination region (región de terminación)
t-KOPS	Triple KOPS
tra	Trasferencia región (región de transferencia)
TRS	TraB Recognition Sequence (secuencia de reconocimiento de TraB)
U	Unidades de actividad enzimática
UFC	Unidades formadoras de colonia
UTR	Untranslated región (región no transcrita)
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
Vmax	Constante velocidad máxima
wHTH	Winged helix turn helix (dominio hélice giro hélice)
Ω	Ohmios

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. Motores implicados en transferir DNA a través de membranas biológicas.

El principal grupo de motores moleculares estudiados durante el desarrollo de esta tesis comprende a proteínas localizadas en la membrana bacteriana cuya función es garantizar la correcta transferencia de DNA a través de ella. Son máquinas moleculares pertenecientes a la superfamilia de motores moleculares RecA/AAA⁺, cuyos miembros acoplan la energía obtenida a partir de la hidrólisis de ATP a la producción de un trabajo mecánico (J. Wang, 2004). Las proteínas de esta familia, a pesar de no compartir una homología de secuencia significativa, presentan una estructura tridimensional similar en el dominio motor, indicando un origen evolutivo común (Iyer et al., 2004) (Pena et al., 2012). Están involucradas en multitud de funciones biológicas diferentes y presentes en todos los tipos de células, desde procariotas hasta eucariotas (Hwang et al., 2013). Presentan dos motivos de unión a nucleótidos trifosfato denominados Walker A y B, ubicados en la zona de interacción entre monómeros adyacentes del hexámero; una característica que les permite coordinar la hidrólisis de nucleótidos entre varios monómeros (Enemark et al., 2008) (Medagli & Onesti, 2013). Es un proceso secuencial que permite acoplar la energía liberada en la hidrólisis a la producción de un trabajo mecánico: plegamiento y desplegamiento de proteínas, transporte de toxinas, transporte de DNA a través de membranas, empaquetamiento de DNA en virus etc.

Las translocasas de DNA son motores moleculares que acoplan la hidrólisis del ATP a un movimiento direccional sobre DNA de cadena sencilla o doble. Muchas de estas proteínas están además asociadas a una actividad helicasa y producen translocación a la vez que separación de cadenas. Entre la familia de proteínas que transloca DNA, cabe destacar un subgrupo de proteínas capaces de translocar DNA a través de membranas biológicas. Estas proteínas realizan una actividad esencial en el reparto del DNA entre células, en procesos tales como la división, esporulación o la conjugación bacteriana. Ejemplos de este tipo de motores son TrwB, una proteína que transloca ssDNA entre bacterias durante el proceso de la conjugación (Tato et al., 2005), FtsK, implicada en el proceso de translocación del cromosoma bacteriano a la célula hija en el momento de la división (May et al., 2015) y SpoIIIE, implicada también en translocar dsDNA y permitir el correcto reparto cromosómico entre bacterias durante la esporulación (Burton et al., 2007). Por último, el motor molecular TraB en el que se ha centrado este trabajo, está implicado en conjugación de bacterias gram positivas del género *Streptomyces*, pero a diferencia de otros mecanismos conjugativos basados en sistemas de secreción tipo IV, TraB transloca dsDNA a través de un poro de membrana constituido por la misma proteína TraB (Thoma et al., 2012) y el proceso sólo requiere este motor y la secuencia plasmídica que se transloca (Thoma et al., 2015). En conjunto, todas estas proteínas encargadas de translocar DNA a través de membranas bacterianas comparten un origen filogenético común, centrado en su dominio motor y cuya función es bombear DNA. A continuación, presentamos un análisis más exhaustivo de cada uno de estos motores moleculares, así como de los procesos biológicos de los que son parte esencial.

1.1.1. Motores moleculares implicados en conjugación bacteriana

La conjugación es el proceso mediante el cual se transfiere DNA desde una célula donadora a una célula receptora a través del contacto directo entre ambas (Costa et al., 2015) (Juhas, 2015). El proceso se extiende entre todo tipo de bacterias, y puede darse entre especies filogenéticamente muy alejadas (Bhatty et al., 2013). El DNA transferido (el plásmido), es autónomo y no precisa de la existencia de un fenómeno de recombinación ulterior para ser estabilizado en la célula receptora.

La conjugación es el mecanismo más habitual por el que se diseminan los genes de resistencia a antibióticos y, por tanto, conocer su mecanismo es una herramienta eficaz para atacar este fenómeno en un futuro (Lopatkin et al., 2016) (Cabezón et al., 2015) (Revilla et al., 2008).

1.1.1.1. Conjugación Bacteriana a través de un Sistema de Secreción tipo IV (T4SS): TrwB del plásmido R388

En bacterias gram negativas, el canal de secreción tipo T4SS empleado para conjugar atraviesa la cobertura bacteriana como un conducto para el paso de sustratos (Durand et al., 2010) (Gonzalez-Rivera et al., 2016). Existe una gran variabilidad de T4SS, cada uno de ellos codificado por su propio plásmido conjugativo (Cascales & Christie, 2003) (Wallden et al., 2010). A pesar de esta diversidad, es posible afirmar que un sistema de secreción funcional necesita al menos 11 proteínas, además de una proteína acopladora que conecta el relaxosoma al sistema de secreción. Estas 12 proteínas pueden clasificarse en tres grupos. El primero lo constituyen las tres ATPasas citoplasmáticas asociadas a la membrana interna, VirB4, VirB11 y VirD4 (proteína acopladora). Proporcionan energía para la transferencia de sustratos y el ensamblaje del sistema (Tato et al., 2005) (Atmakuri, 2004). El segundo grupo está constituido por las proteínas del propio canal, VirB7, VirB9 y VirB10, además de otras asociadas, VirB3, VirB6 y VirB8 que formarían la base del canal. El tercer grupo, lo constituyen VirB2 y VirB5, encargadas de polimerizar para formar el pilus anclado a la membrana externa.

La nomenclatura de este sistema adopta de los nombres del sistema modelo, el T4SS de *Agrobacterium tumefaciens* (VirB). Sin embargo, en esta tesis hemos utilizado como sistema modelo el plásmido R388, por lo que nos referiremos a este grupo de proteínas como TrwA-N.

La conjugación de R388 comienza cuando las células donadora y receptora establecen contacto físico a través de una estructura multiproteica llamada pilus. Entonces, el relaxosoma, constituido por TrwA y TrwC y el plásmido, emplea a su relaxasa TrwC para el corte de una de las hebras del dsDNA plasmídico en una región llamada origen de transferencia (*oriT*) (Moncalian et al., 1999). De forma simultánea al corte, la relaxasa, queda covalentemente unida al extremo 5' de la hebra. TrwC, a través de una actividad helicasa, desenrolla ambas cadenas del plásmido mientras que el complejo relaxasa-DNA es transferido a la célula receptora a través del T4SS. El DNA de cadena simple que llega a la célula receptora, es recircularizado y replicado. Posteriormente, la célula receptora expresa en superficie los determinantes de exclusión de superficie, impidiendo que la célula receptora inicie otro proceso conjugativo con células que porten el mismo plásmido.

El plásmido R388 es un plásmido conjugativo del grupo IncW, un grupo de plásmidos autotransmisibles de pequeño tamaño, entre 30 y 30 kb (Fernández-López et al., 2006). Este grupo genera un pilus conjugativo rígido y grueso que les habilita para conjugar en medio sólido y con un amplio rango de huéspedes.

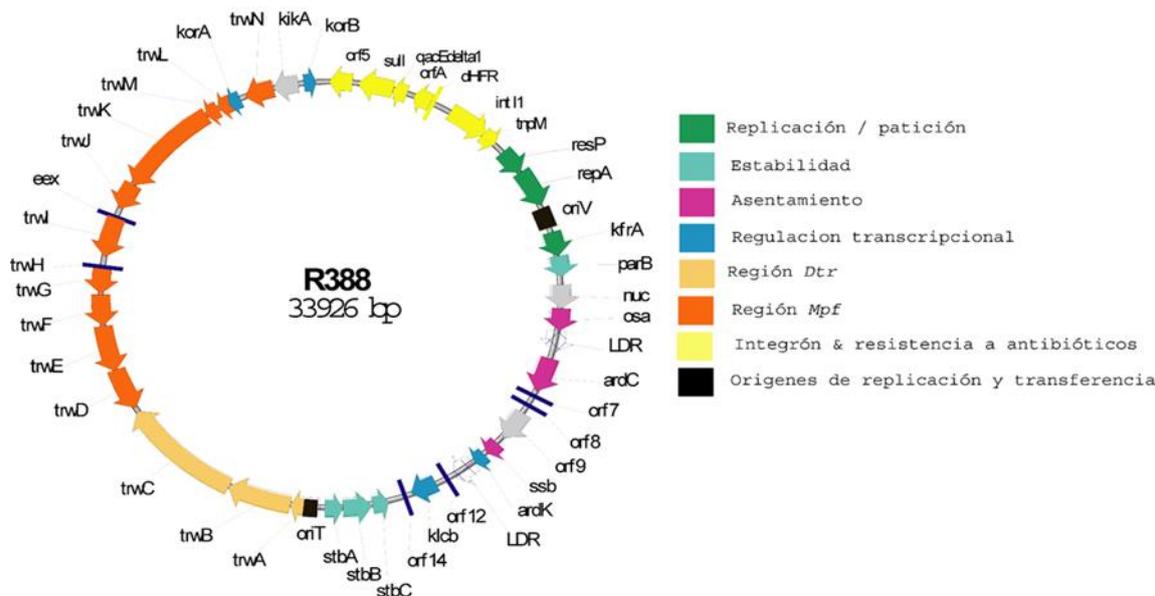


Figura 11. Plásmido conjugativo R388. Se detallan las diferentes funciones que desempeña el plásmido. Cada grupo de genes involucrados en una misma función aparece representado con un mismo color. Los colores naranja representan los genes involucrados en el proceso conjugativo. Figura tomada de Fernández-López et al., (2006).

El plásmido R388 posee una región TraW, que supone casi la mitad del tamaño del plásmido y que codifica los genes responsables de la conjugación (Fernández-López et al., 2006). Esta región se divide en otras 2: la región Dtr y la región Mpf. La región Dtr comprende el origen de transferencia u *oriT* y codifica las proteínas que forman parte del relaxosoma: TrwA, TrwB y TrwC.

La región Mpf o PIL, codifica los genes responsables de la formación del T4SS. Este grupo de genes al completo son: *trwD*, *trwE*, *trwF*, *trwG*, *trwH*, *trwI*, *trwJ*, *trwK*, *trwL*, *trwM*, *trwN* y *trwO*. Todos estos genes, salvo *trwN*, están involucrados en la formación del canal de secreción y el pilus, siendo indispensables para la conjugación. A pesar de su importancia, esta región no ha sido objeto de estudio de esta tesis y por tanto, no entraré en más detalles en su descripción. Por el contrario, me centraré en la región Dtr o MOB.

La región Dtr de TraW, posee un tamaño aproximado de 5,2 kb y comprende el *oriT* y el operón *trwABC*. Este operón codifica las proteínas TrwA, o proteína accesoria del relaxosoma, TrwB, o proteína acopladora, y la proteína relaxasa TrwC. TrwA y TrwC, constituyen el relaxosoma, responsable del procesamiento del DNA para ser transferido a través del T4SS. TrwB es la proteína acopladora y bombea el DNA desde la célula donadora, hasta la receptora.

TrwA es una proteína tetramérica de un tamaño aproximado de 13 kDa constituida por 121 aa (Moncalián et al., 2004). Está formada por 2 dominios: un dominio N-terminal de unión a DNA, y un dominio C-terminal responsable de interaccionar con TrwB y activar su actividad ATPasa (Tato et al., 2007). En su dominio N-terminal dispone de una serie de residuos polares muy conservados. Esta característica es común en la familia de proteínas ribbon-helix-helix a la que pertenece. En su dominio C-terminal, posee una cremallera de leucinas y ésta parece mediar la interacción proteína-proteína necesaria para la oligomerización. TrwA reconoce específicamente dos secuencias en el *oriT*: *sbaA* y *sbaB*, con una afinidad unas diez veces superior por el sitio *sbaA*. Es necesaria la unión a ambas, sólo así se obtienen tasas más altas en las frecuencias de conjugación. TrwA actúa también como represor transcripcional del operon *trwABC*, regulando la expresión de las tres proteínas (Llosa et al., 2007)

TrwC es la proteína relaxasa de R388, responsable de iniciar y terminar el procesamiento de DNA durante la conjugación del plásmido (Grandoso et al., 1994). Está compuesta por 966 aa, y posee un dominio N-terminal con actividad relaxasa y un dominio C-terminal con actividad helicasa (Llosa et al., 1996). La presencia de ambos dominios es imprescindible para que exista conjugación. El dominio relaxasa produce el corte de cadena simple en el sitio nic de *oriT* durante la conjugación. De forma simultánea al corte, TrwC queda covalentemente unida al extremo 5' de la hebra cortada. La estructura tridimensional del dominio relaxasa ha sido resuelta por cristalografía de rayos X en complejo con la secuencia de DNA donde se produce el corte (Guasch et al., 2003).

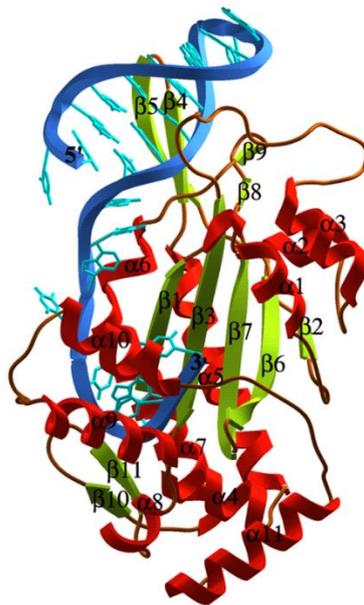


Figura I2. Estructura del dominio relaxasa de TrwC junto al origen de transferencia de R388 (*oriT*). En verde, se muestran las hojas beta, en rojo las hélices alfa, y en azul, el DNA. Figura tomada de Guasch et al., (2003) (pdb: 1OSB).

Los aminoácidos comprendidos desde el 192 hasta el 966 conformarían el dominio helicasa. Este dominio es responsable de desenrollar la cadena sencilla que va a ser transferida a la célula receptora, utilizando para ello la energía liberada de la hidrólisis de ATP. Esta actividad helicasa se lleva a cabo en dirección 5' - 3'. Dispone de 7 motivos característicos de la familia Rep helicasas, además de los motivos Walker A y Walker B, necesarios para la actividad ATPasa. Esta actividad ATPasa es dependiente de la presencia de DNA de cadena sencilla, ATP y Mg^{2+} . TrwC no es capaz de desenrollar DNA de cadena doble con extremos romos, es decir, necesita un fragmento de cadena sencilla para procesar el DNA. La proteína se purifica como un dímero, pero no se descartan otras formaciones oligoméricas durante el procesado del DNA. TrwC finalmente atraviesa el T4SS, probablemente de forma desplegada, dado el tamaño del canal de secreción.

TrwB es la proteína acopladora del T4SS del plásmido R388. Hidroliza ATP (Tato et al., 2005), obteniendo energía que emplea en el bombeo de DNA desde la célula donadora a la receptora. Es una proteína básica ($pI = 10$), de un peso molecular de 56 kDa. Se estructura en 2 dominios (Gomis-Rüth et al., 2001). Por una parte consta de un dominio N-terminal de unión a membrana constituido por 2 α -hélices; a través de este dominio la proteína se ancla a la membrana interna bacteriana. Además, posee un dominio motor en el que se encuentran los motivos Walker A y B de unión a nucleótidos. TrwB interactúa con el T4SS y de forma más específica con el relaxosoma. Como proteína integral de membrana, los estudios *in vitro* presentan una dificultad añadida. Por ello, en esta tesis, en los ensayos de actividad se ha empleado el dominio globular TrwB Δ N70, que carece de los dos segmentos transmembrana.

La estructura de TrwB Δ N70 fue resuelta por cristalografía de rayos X (Gomis-Rüth et al., 2001)(Figura I3). Muestra una proteína hexamérica, donde cada subunidad presenta los dos dominios mencionados anteriormente. TrwB Δ N70 se ensambla como un hexámero de forma casi esférica, con unas dimensiones de 110 Å de diámetro y 90 Å en el eje longitudinal. Posee un canal central que podría conectar el citoplasma con el periplasma. La entrada del canal está cerrada por un anillo de residuos de asparragina, que reduce el diámetro del canal hasta 8 Å en esa región. El resto del canal tiene un diámetro de unos 20 Å. En el modelo de translocación propuesto, TrwB se encargaría de translocar ssDNA (una de las cadenas del plásmido R388) utilizando para ello la energía derivada de la hidrólisis de ATP.

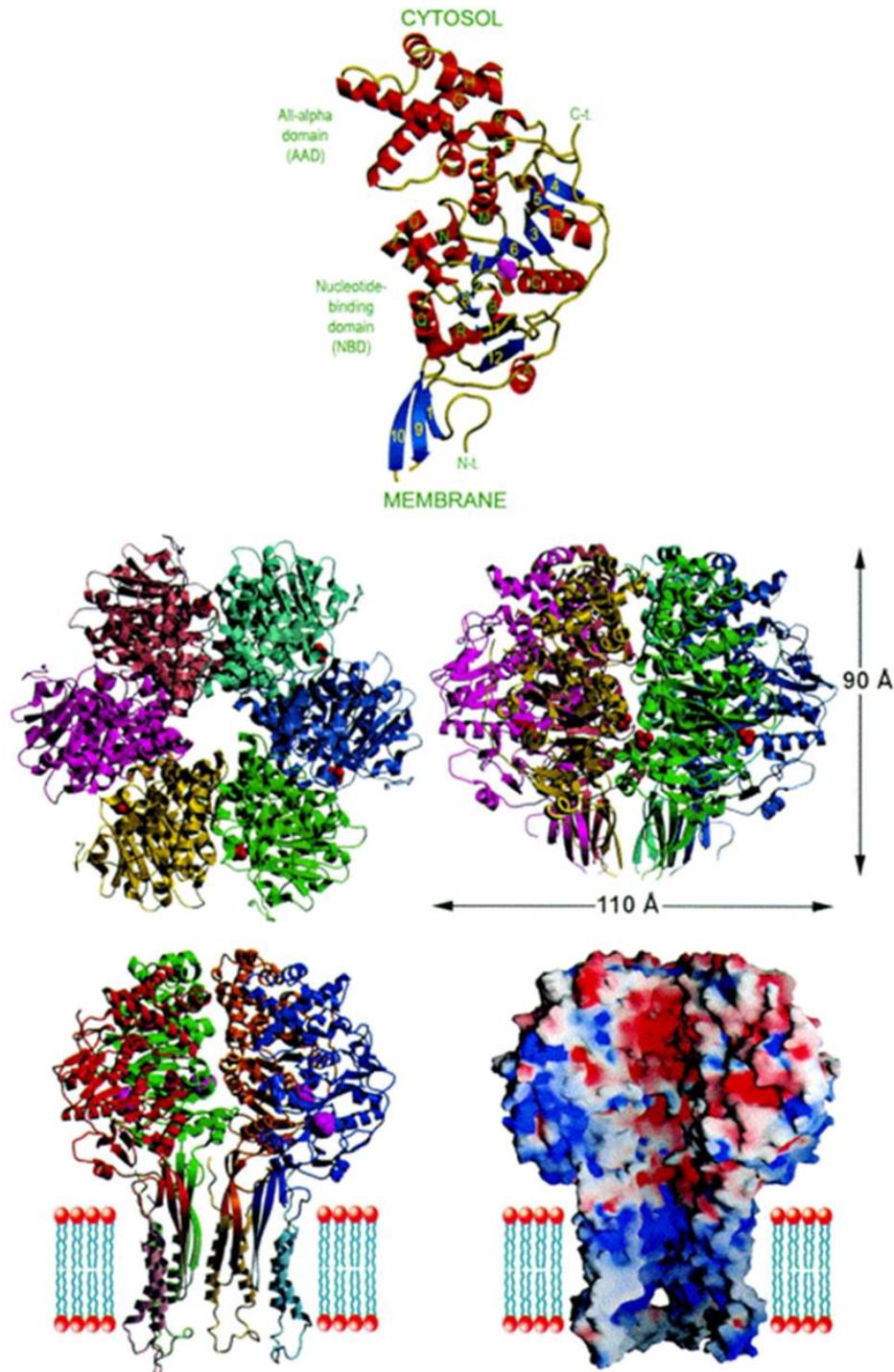


Figura 13. Características estructurales de TrwB. En el dibujo superior, está representado el diagrama del monómero de TrwB Δ N70, donde se señalan el extremo C-terminal con un dominio todo α y el dominio de unión a nucleótidos. Las dos figuras centrales representan la vista superior y lateral del hexámero de TrwB Δ N270. Las dos figuras inferiores, representan la vista lateral del hexámero de TrwB embebido en la membrana citoplasmática. En la figura inferior izquierda además aparece representado el modelado de las hélices transmembrana. Para finalizar, en la figura inferior derecha se muestra la superficie electrostática correspondiente a la figura inferior izquierda. Figura tomada de Gomis-Rüth et al., (2001) (pdb: 1E9S).

La similitud estructural de TrwB con otros motores moleculares bien conocidos tales como F1-ATPasa o la helicasa del fago T7, sugiere que TrwB actúa bombeando DNA a través de su canal central gracias a la energía liberada en la hidrólisis de ATP. La actividad ATPasa es activada en presencia de DNA de cadena sencilla o de cadena doble (Tato et al., 2005). También puede ser activada en presencia de TrwA (Tato et al., 2007), que se une específicamente al origen de transferencia del plásmido y, de esta forma, facilita el ensamblaje de TrwB en torno al DNA. TrwA no sólo facilita el ensamblaje de TrwB; además, potencia la actividad ATPasa de TrwB en presencia de DNA, llegando a multiplicarla unas diez veces (Tato et al., 2007). El sistema TrwA/TrwB, recuerda otros motores moleculares dependientes de DNA, como el sistema de recombinación RuvA/RuvB, que requiere también estructuras de DNA específicas para ensamblarse. Ensayos previos de retardo en gel indican que TrwB Δ N70, como proteína de unión a DNA, tiene preferencia por sustratos con estructura secundaria, especialmente por estructuras del tipo G-quadruplex (Matilla et al., 2010). TrwB Δ N70 no sólo presenta preferencia por una estructura G-quadruplex, sino que, además, precisa este tipo de estructuras para hexamerizar (Matilla et al., 2010).

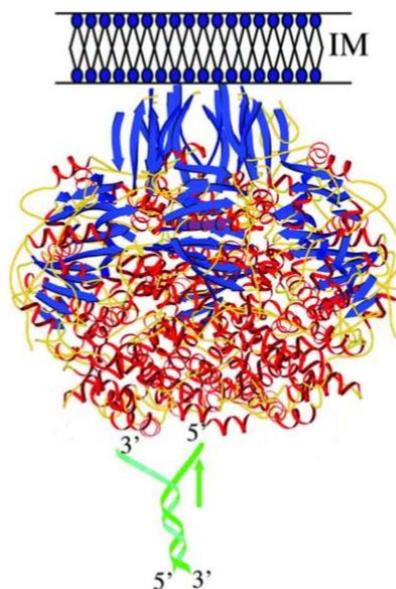


Figura I4. Modelo de Interacción de TrwB con DNA. Se han excluido del modelo a las hélices α de los dominios N-terminales de TrwB. Las láminas β y las hélices α aparecen coloreadas en azul y rojo respectivamente. El DNA se representa en verde, con sus extremos 5' y 3' bien indicados. En este modelo, TrwB se uniría al extremo 5' del DNA a través de la interacción de éste con el canal central de TrwB, el cual sólo permitiría la interacción con una sola de las hebras del dsDNA, de forma que se excluiría a la hebra 3'. La separación de las hebras no tendría por qué llevarse a cabo gracias a TrwB directamente, esta disociación podría llevarse a cabo en un paso previo, quizás mediante la asociación con la helicasa TrwC. Figura tomada de Tato et al., (2005).

1.1.1.2. Conjugación bacteriana en *Streptomyces venezuelae*: TraB del plásmido pSVH1

Los estreptomicetos son bacterias gram positivas del suelo. Son grandes productoras de antibióticos y presentan un sistema conjugativo único. Mientras que los procesos conjugativos clásicos, basados en un T4SS, emplean un sistema multiproteico muy complejo, *Streptomyces* emplea una sola proteína (Thoma et al., 2015).

Los plásmidos conjugativos de *Streptomyces*, sólo precisan una proteína codificada en ellos, TraB, que cataliza la transferencia plasmídica desde el donador hasta el recipiente. TraB, interactúa en *cis* con el locus *clt*: una pequeña región de menos de 200 pb necesaria también para la conjugación (Thoma et al., 2012). Esta interacción se debe a una secuencia específica de 8 pb, la secuencia TRS (GACCCGGA) cuya presencia se repite hasta 9 veces en el locus *clt* (Muth et al., 2012). La delección del locus *clt*, reduce drásticamente la frecuencia de conjugación (Thoma et al., 2012). Tras reconocer el locus *clt*, TraB se ensambla al dsDNA y lo transloca hasta la célula receptora (Reuther et al., 2006). No se tiene constancia de que los plásmidos de *Streptomyces* codifiquen para un sistema de acoplamiento entre células que garantice el contacto. La transferencia plasmídica ocurre sólo en agar sólido, durante el crecimiento del micelio vegetativo (Thoma et al., 2015). El crecimiento expansivo de los extremos de sus hifas con múltiples brazos aumenta la probabilidad de contacto con una célula receptora (Figura I6).

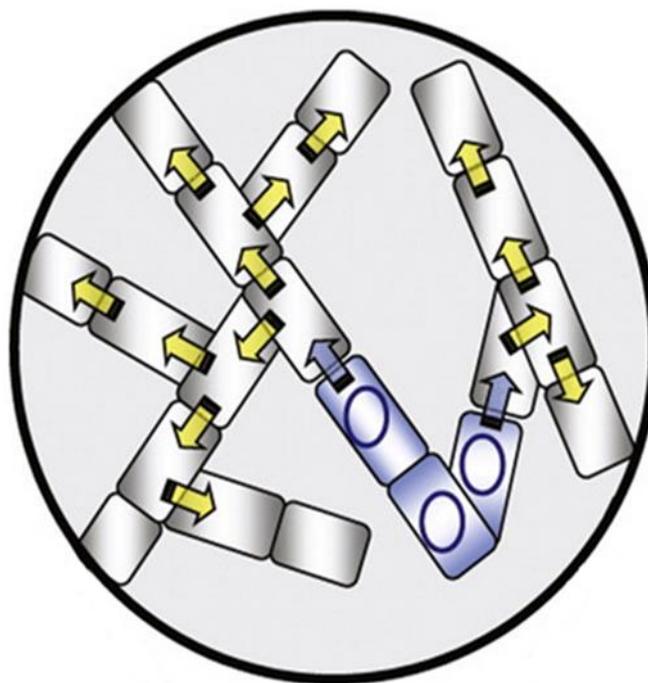


Figura I6. Esquema de conjugación en *Streptomyces venezuelae*. Se observa por una parte micelio vegetativo creciendo expansivamente sin plásmido. Por otra parte, destacado en azul, se observa cómo se transfiere de forma horizontal al plásmido a través del contacto entre micelios. Figura tomada de Thoma et al., (2015)

Durante la conjugación el plásmido debe atravesar las membranas y peptidoglicano tanto del donador como del receptor. Y esto debe hacerlo a pesar de que sólo unos pocos plásmidos de *Streptomyces* codifican para transglicosilasas líticas. Después de la fusión de las paredes de peptidoglicano, TraB podría también dirigir la fusión de las membranas del donador y recipiente. Una proteína de la familia de TraB, SpoIIIIE (proteína de *B. Subtilis* que transloca el cromosoma hacia esporas recién formadas), se ha demostrado experimentalmente que está implicada en el proceso de fusión de membranas (Yen Shin et al., 2015). El ensamblaje de TraB como hexámero en torno a la secuencia *clt* aporta una estructura en forma de poro en la membrana que facilitaría la translocación del DNA.

En esta tesis se ha empleado TraB de *Streptomyces venezuelae*, codificada por el plásmido pSVH1, cuya secuencia aparece representada a continuación (Reuther et al., 2006)(Figura I7):

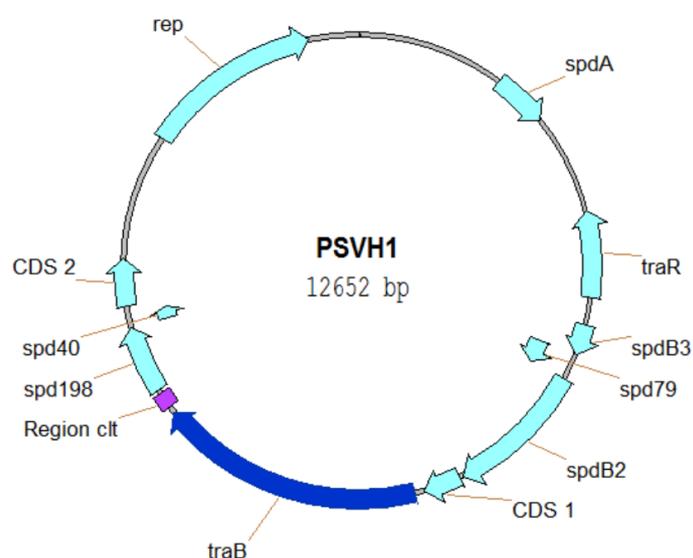


Figura I7. Plásmido pSVH1 de *Streptomyces venezuelae*. Se ha destacado la secuencia del gen *traB*, en azul, y la región plasmídica *clt*, en púrpura.

TraB posee tres dominios: un dominio N-terminal de unión a membrana, un dominio motor ATPasa de alta homología con el dominio motor de toda la familia de RecA/AAA+ ATPasas y, por último, un dominio “winged hélix-turn-helix” (WHTH) o dominio γ de reconocimiento de la secuencia GACCCGGA (Vogelmann et al., 2011). Debido a la dificultad de trabajar con una proteína integral de membrana, en esta tesis se ha construido un mutante con el dominio N-terminal deletado, TraB Δ N270, de un tamaño de 56 KDa.

TraB además de presentar similitudes estructurales con TrwB fundamentalmente a nivel del dominio motor, también lo hace con FtsK (Peña et al., 2012). FtsK es la enzima responsable del correcto reparto cromosómico durante la división bacteriana en *Escherichia coli*. Reconoce dsDNA de forma direccional y así bombea el DNA cromosómico sólo en un sentido (Sivanathan et al., 2009). La arquitectura de los dominios de TraB y FtsK es idéntica. Poseen una región N-terminal de anclaje a la membrana. Esta región está implicada en la localización y está conectada al dominio translocasa mediante una región linker. En TraB se especula que la región linker, sea la responsable de la hexamerización. El dominio C-terminal de TraB es un dominio de tipo wHTH cuya función es similar a la de FtsK. Este dominio ayudaría en el reconocimiento de secuencias específicas. Ambas proteínas reconocen una secuencia de 8 pb empleando su dominio de reconocimiento. TraB reconoce la secuencia TRS a través de la hélice $\alpha 3$ de su dominio wHTH. Cambiando cualquiera de los 13 aa de la hélice $\alpha 3$ se modifica la especificidad de reconocimiento (Vogelmann et al., 2011). En la estructura resuelta del dominio γ de FtsK unida a la secuencia KOPS (Löwe et al., 2008) aparecen sólo tres dominios γ unidos al DNA. Si la estructura refleja el mecanismo de unión al DNA *in vivo*, aún queda por responder qué estructura adquieren los tres dominios γ restantes del hexámero.

Además de las similitudes estructurales, estos motores presentan una serie de semejanzas funcionales. TraB, al igual que FtsK, transloca dsDNA y, al igual que TrwB, bombea DNA durante la conjugación. Las similitudes tanto estructurales como funcionales de TraB FtsK y TrwB son el producto de un historial filogenético común (Peña et al., 2012). Durante el proceso evolutivo, TraB ha soportado tres adaptaciones básicas con respecto a FtsK (Sepulveda et al., 2011). La primera es la localización, emplazándose en los polos bacterianos al igual que TrwB (Segura et al., 2014). FtsK lo hace en el septo formado en la división bacteriana. La segunda es que mientras que TraB reconoce específicamente una secuencia dentro de una región plasmídica, FtsK reconoce una secuencia, KOPS, distribuida por todo el cromosoma. La tercera adaptación está relacionada con el momento de su expresión. FtsK se expresa durante el comienzo de la esporulación, y TraB durante el crecimiento del micelio vegetativo.

Como se ha mencionado previamente, FtsK reconoce específicamente secuencias de dsDNA de 8 bases ricas en GC's denominadas KOPS, (GGG[C/A]AGGG) y que están diseminadas a lo largo de todo el cromosoma (Sivanathan et al., 2006). Al igual que FtsK, TraB reconoce específicamente un segmento de 8 bases, GACCCGGA, ensamblándose como un hexámero en torno a él. Una vez ensamblada, TraB comenzaría a bombear DNA. Esta actividad debe estar acoplada a un proceso de hidrólisis de ATP responsable de suministrar la energía necesaria para ello (Figura I8).

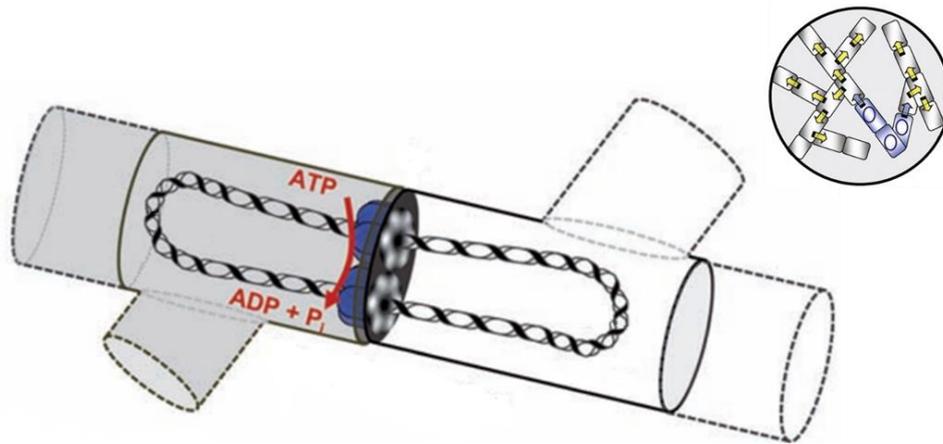


Figura 18. TraB translocando el plásmido pSVH1 durante la conjugación de *Streptomyces venezuelae*. En la figura superior derecha se observa la diseminación plasmídica entre 2 hifas distintas. En la figura de la izquierda se observa a TraB, hexamerizado en torno a pSVH1, bombeando DNA doble cadena a través de la pared bacteriana. Se observa el consumo de ATP acoplado a la translocación de DNA de cadena doble. Figura tomada de Sepulveda et al., (2011).

TraB se une al locus *clt* de forma no covalente sin procesar el plásmido. Esto lleva a una duda lógica ¿Cómo es capaz de translocar una molécula de DNA circular? En el caso de FtsK, durante la división celular el cromosoma está ya dispuesto en el septo, en proceso de cerrarse, permitiendo al motor ensamblarse en torno a KOPS en cada brazo del cromosoma. TraB por el contrario debe translocar DNA a través de la membrana intacta (May et al., 2015). La translocación de una molécula de DNA circular en estas condiciones es muy improbable, por lo que se postula la interacción con otras proteínas, topoisomerasas, como sucede con FtsK, que interactúa con la topoisomerasa IV. Otra posibilidad consistiría en la fusión de dos hexámeros de TraB, como en el modelo descrito para la transferencia del cromosoma durante la esporulación en *B. subtilis* (Sepulveda et al., 2011).

1.1.2. Motores moleculares implicados en división bacteriana: FtsK

FtsK es una proteína de translocación involucrada en la segregación cromosómica durante la división bacteriana (Keller et al., 2016).

El cromosoma de *E. coli* está polarizado, siendo ésta la forma de organizar espacialmente al cromosoma durante la replicación. Una estructura esta polarizada cuando sus 2 márgenes opuestos están bien diferenciados. En un margen del cromosoma de *E. coli* aparece ubicado el origen de replicación, *oriC*, desde donde comienza a replicar el cromosoma de forma bidireccional. Exactamente en el margen opuesto se haya dispuesto el sitio *Ter*, que marca el final de la replicación y posee en su secuencia los sitios *dif*. A lo largo del cromosoma se encuentran unas secuencias de 8 pb llamadas KOPS, GGG[C/A]AGGG (Sivanathan et al., 2006). Se hallan siempre sobre la hebra líder, orientadas en dirección 5' - 3', desde el *oriC* hasta los sitios *dif*. Además, la concentración de secuencias KOPS aumenta a medida que se aproxima el sitio *Ter* pudiendo hablar de un gradiente de densidad de KOPS. Gracias a esta forma de organización, FtsK es capaz de bombear dsDNA en una sólo dirección. FtsK bombea dsDNA mientras encuentra secuencias KOPS orientadas correctamente. De esta forma, se reparte el DNA cromosómico correctamente entre ambas células en división (Sivanathan et al., 2009).

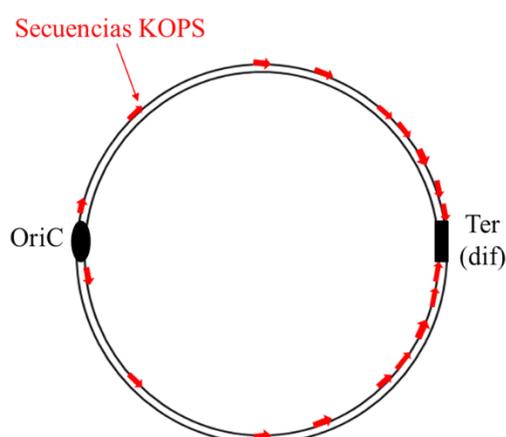


Figura 19. Representación del cromosoma de *Escherichia coli* polarizado. Se observa sobre el cromosoma al sitio *OriC*, y en el margen opuesto, el sitio *Ter*. Además, se detallan en rojo las secuencias KOPS sobre la hebra líder.

FtsK emplea la secuencia KOPS como punto de carga. Sin su presencia, el motor puede ensamblarse pero el producto final del proceso será probablemente una segregación cromosómica anómala. FtsK une DNA de forma más eficientemente en presencia de KOPS en la orientación adecuada (Löwe et al., 2008). La enzima une con mayor afinidad una secuencia que se denominó t-KOPS ó triple KOPS, consistente en tres secuencias KOPS solapadas, GGG[C/A]AGGG[C/A]GGG[C/A]GGG. El empleo de t-KOPS supone un aumento en la eficacia del proceso de recombinación (Sivanathan et al., 2006). En el cromosoma de *E. coli* no existe una secuencia t-KOPS. Aparecen secuencias muy similares a t-KOPS en las proximidades de *Ter*, cuando la concentración de KOPS aumenta. t-KOPS es un candidato perfecto para formar estructura G-quadruplex intramolecular. Sólo basta con comparar la secuencia consenso G-quadruplex $[G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}]$ con t-KOPS $[GGG[C/A]AGGG[C/A]GGG[C/A]GGG]$. Es posible que estas estructuras de DNA estén presentes en el mecanismo de acción de estos motores moleculares.

Si durante la replicación no ha existido recombinación homóloga, el producto de la misma serán dos cromosomas idénticos. Por el contrario, si durante el proceso de replicación ha habido replicación homóloga, aparecerá una estructura de dímero cromosómico (Figura I10). Por pseudo-difusión simple, encontraremos al dímero desorganizado espacialmente. FtsK debe reorganizarlo espacialmente para ser procesado y resuelto en dos cromosomas idénticos. Estos dos fenómenos pueden observarse a continuación, en la Figura I10:

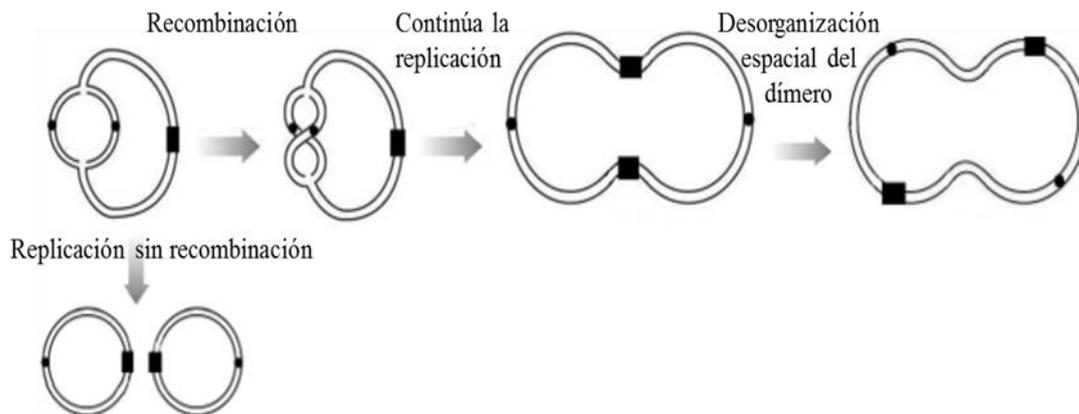


Figura I10. Proceso de replicación cromosómica de *E. coli*. La replicación puede adoptar dos vías. La primera está representada por la flecha vertical hacia abajo. En ella no hay recombinación y el producto son dos cromosomas idénticos. La segunda posibilidad sucede cuando existe recombinación durante la replicación. En este caso se genera un dímero cromosómico. Figura tomada de Ghosh et al., (2006).

Según el mecanismo propuesto para FtsK, en el momento de la división, cuando se está formando el septo, FtsK se dispone en él. FtsK se ensambla como un hexámero en torno a KOPS en la orientación adecuada. Ensamblarse en la orientación adecuada permite el bombeo direccional hacia el sitio *Ter*. Una vez ensamblada sobre el DNA, FtsK bombea DNA doble cadena hasta llegar a la región *Ter*. Una vez dispuestos el DNA, *Ter* y FtsK en el septo, las enzimas resolvasas XerC y XerD interactúan con FtsK. En este momento, se forma en el septo un complejo tetravalente de DNA, FtsK y XerCD. Al ocluirse el septo, el espacio se reduce y el encuentro entre dos complejos tetravalentes activa la resolvasa XerCD (May et al., 2015). De esta forma se resuelve el dímero cromosómico, dando lugar a dos cromosomas idénticos (Figura I11).

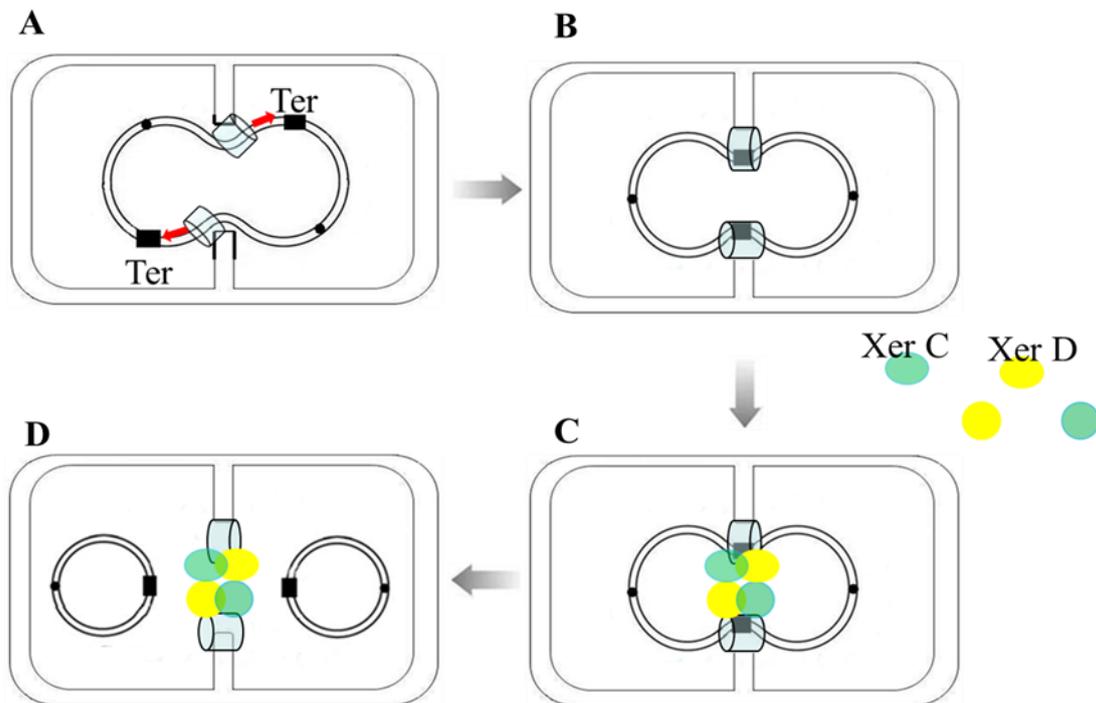


Figura I11. Resolución del dímero cromosómico. En el Panel A se observa a FtsK bombeando DNA en dirección 5'- 3' hacia *Ter*. En el Panel B, aparecen *Ter* Y FtsK dispuestos en el septo. El panel C representa cómo interactúa FtsK con XerC y XerD para dar lugar a un complejo tetra valente. Finalmente, en el Panel D, aparece representado cómo dos complejos tetra valentes convergen y activan a XerCD de modo que es resuelto el dímero cromosómico y da lugar a dos cromosomas idénticos.

La presencia de FtsK se extiende a casi todas las bacterias. Es una proteína multi-dominio, con varias funciones diferentes durante el fenómeno de división celular (May et al., 2015)(Keller et al., 2016). Tal y como se ha explicado en secciones anteriores, al igual que TraB posee 3 dominios: un dominio N-terminal transmembrana que convierte a la proteína en una enzima integral de membrana, un dominio motor (Figura I12) de alta homología estructural con los dominios motores de TraB y TrwB (Peña et al., 2012)(Sepulveda et al., 2011) y, por último, dispone de un dominio γ en el extremo C-terminal .

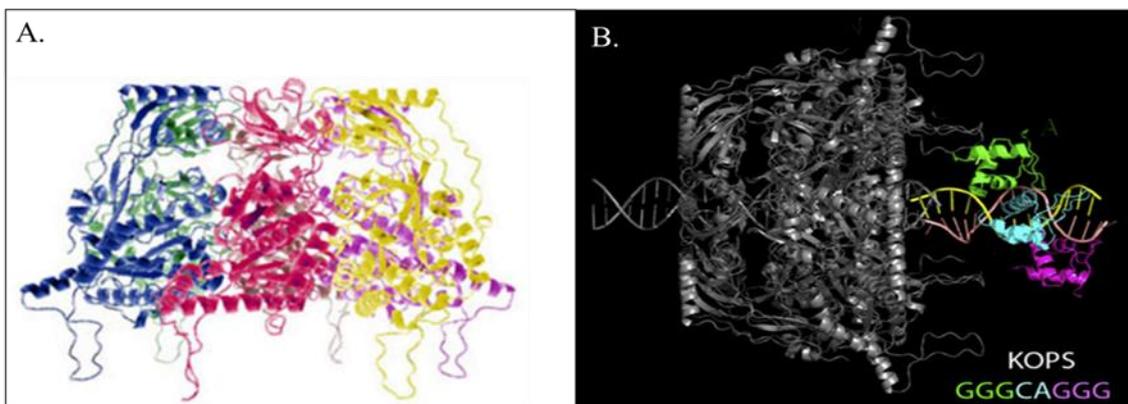


Figura I12. Dominio motor y dominio γ de FtsK. El panel A muestra una vista lateral del hexámero de dominios motores de FtsK. Cada monómero aparece representado con un color diferente (pdb: 2IUU). En el panel B se muestra una composición de la estructura del dominio γ , con tres subunidades unidas a DNA de doble cadena (pdb 2VE9) sobre la que se ha superpuesto la estructura del dominio motor. El dsDNA del panel B, como se indica en la figura, está diseñado con la secuencia KOPS. Figuras tomadas de Löwe et al., (2008).

1.1.3. Motores moleculares implicados en esporulación: SpoIIIE

Como respuesta a la falta de nutrientes en el medio, *Bacillus subtilis* desarrolla una ruta metabólica que deriva en la formación de esporas, un tipo de célula capaz de resistir al estrés (Piggot et al., 2004). Al esporular, el septo divide de forma asimétrica a la célula madre, dando lugar a una célula larga (célula madre) y una pequeña (preespora). Al principio, ambas células descansan la una junto a la otra pero poco después de la división polar las membranas de la célula madre migran en torno a la preespora generando una célula dentro de otra célula. Una vez que la espora está madura se libera al medio mediante la lisis de la célula madre (Marquis et al., 2008).

Como sucede en la división bacteriana, el septo va cerrándose en torno al cromosoma y se necesita la implicación de un motor con actividad ATPasa que transloque hacia la preespora el DNA que todavía no se ha segregado. Esta proteína es SpoIIIE (Errington et al., 2001) (Figura I13). Sin la contribución de SpoIIIE sólo el 30 % del cromosoma de la preespora quedaría en su compartimento. Esto dejaría un 70% del cromosoma en el compartimento de la célula madre.

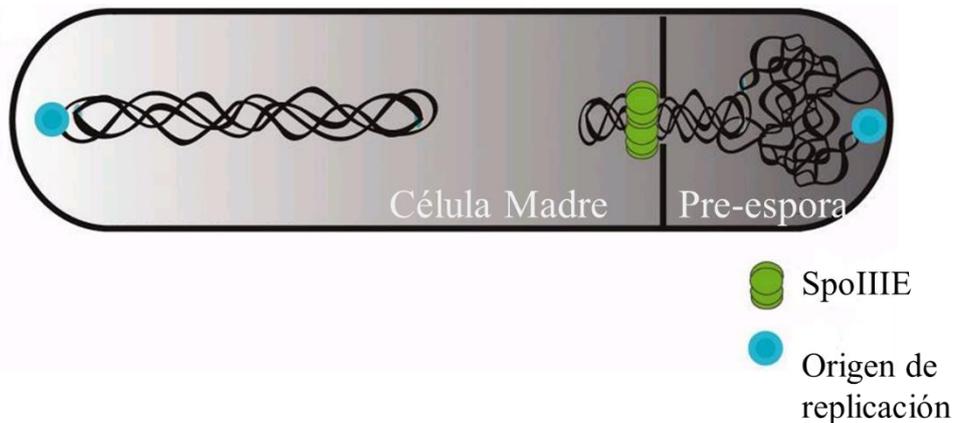


Figura I13. Representación de la esporulación en *Bacillus subtilis* mediada por SpoIIIE. SpoIIIE bombea el cromosoma hacia la preespora a través del septo bacteriano. Figura tomada de Cattoni et al., (2014).

En la estructura de SpoIIIE se distinguen tres regiones (Cattoni et al., 2014). Primero, un dominio N-terminal transmembrana compuesto por 4 subdominios. Este dominio es necesario y suficiente para que SpoIIIE se ubique en el septo (Errington et al., 1997). En segundo lugar, una región linker pobremente conservada y poco estructurada. SpoIIIE interactúa con otras proteínas implicadas en la esporulación gracias a esta región. Y por último, un dominio C-terminal responsable de translocar dsDNA. Este dominio incluye el dominio motor y el dominio γ . Este dominio γ es similar al dominio γ de FtsK y TraB y está implicado en la unión al DNA, interactuando específicamente con secuencias de 8 pares de bases dispuestas a lo largo del cromosoma de *B subtilis* (secuencias SRS, SpoIIIE recognition sequence, GAGAAGGG). De esta forma, el motor es capaz de orientarse en la dirección adecuada sobre el DNA (Bose et al., 2016). Las secuencias SRS, del mismo modo que las secuencias KOPS y TRS reconocidas por FtsK y TraB respectivamente, poseen una longitud de 8 bases y son ricas en GC's, con grupos de 3 o más guaninas seguidas.

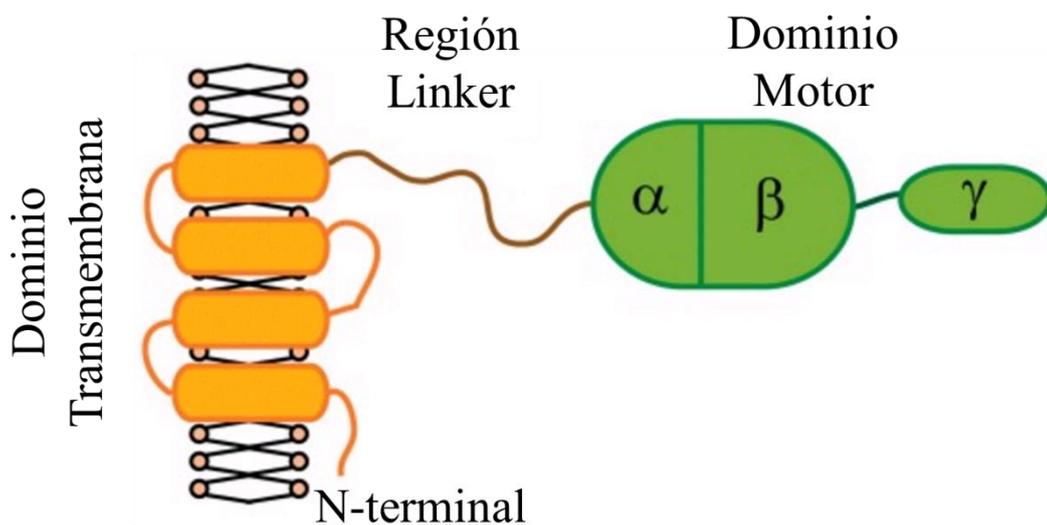


Figura I14. Representación de la estructura de SpoIIIE. En la Figura se representa el dominio N-terminal de unión a membrana con sus 4 subdominios transmembrana dibujados en color naranja. A continuación se observa la región linker y, por último, representado en color verde, se observa el dominio motor dividido en sus 2 subdominios α, β , y el dominio γ en el extremo C-terminal del motor. Figura tomada de Cattoni et al., (2014)

SpoIIIE se organiza como un hexámero (10 nm de diámetro) (Cattoni et al., 2014), translocando dsDNA a través de su canal central (2,5 nm de diámetro) de forma direccional. De esta forma, la translocación se produce en un único sentido, hacia la preespora. Es probable que al menos 2 complejos hexaméricos de SpoIIIE se coordinen para transferir el DNA, ya que ambos brazos del cromosoma se transfieren de forma simultánea. El modelo más aceptado propone que SpoIIIE transfiere el DNA a través de las dos membranas del septo antes de finalizar la citocinesis (Burton et al., 2007).

1.2. Motores moleculares implicados en la resolución de estructuras G-quadruplex en el DNA

1.2.1. Estructuras G-quadruplex

El DNA G-quadruplex es una estructura secundaria del DNA en la que cuatro hebras se disponen en paralelo. Tiende a aparecer en regiones donde su secuencia es rica en guaninas. Para su formación, el DNA debe replegarse sobre sí mismo y de esta forma 4 segmentos de una misma hebra se disponen en paralelo gracias a la interacción entre sus guaninas (Stegle et al., 2009).

Las cuatro hebras de DNA (con 3 o más guaninas consecutivas por cada hebra), dispuestas en paralelo, se estabilizan gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre 4 guaninas contiguas. Las 4 guaninas pueden contemplarse como los vértices de un plano, y entre dos de estos planos se dispone un catión preferentemente monovalente que contribuye a estabilizar la estructura (Figura I15). Este ion suele ser K^+ o Na^+ .

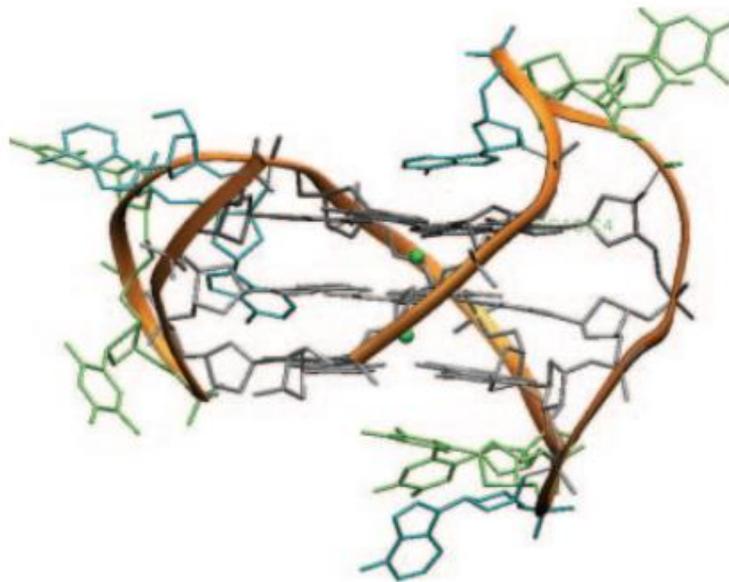


Figura I15. Estructura de un G-quadruplex procedente de telómero humano. La estructura consta de 4 segmentos de una misma hebra de DNA y dos iones potasio dispuestos entre ellas. Figura tomada de Burge et al., (2006) (pdb: 2KGU).

No todos los cationes contribuyen a estabilizar la estructura G4 con la misma efectividad. Estudios previos han demostrado la eficiencia de diferentes cationes, obteniéndose el mejor rendimiento mediante el empleo de K^+ y Na^+ (Smargiasso et al., 2008).

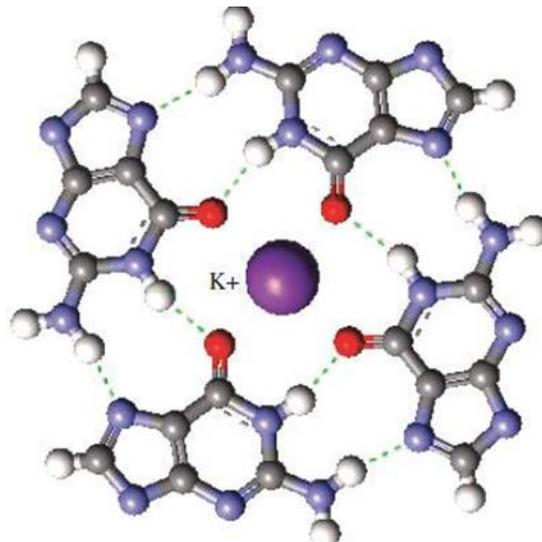


Figura I16. 4 Guaninas formando puentes de hidrógeno de un G-quadruplex estabilizado mediante un catión K^+ . En el margen superior de la imagen se observan 4 guaninas formando puentes de hidrógeno y un ion potasio dispuesto en el medio. En el margen inferior de la figura se observan diferentes cationes, dispuestos por orden de eficacia en el rendimiento de formación de G4. Figura tomada de Bugaut & Balasubramanian, (2012).

El estudio de diversos genomas ha revelado infinidad de potenciales secuencias G-quadruplex y, su localización, lejos de ser aleatoria, se correlaciona con regiones importantes de regulación génica (Todd et al., 2005).

En el genoma humano empezaron detectándose 370.000 potenciales estructuras G4 mediante métodos bioinformáticas. Actualmente, son hasta 710.000 (Chambers et al., 2015)(Huppert et al., 2005). Habitualmente se localizan cerca de orígenes de replicación; de hecho, la mayoría de los 250.000 orígenes de replicación humanos poseen secuencias potenciales G4 (Todd et al., 2005). También están presentes en la región promotora de numerosos genes, interviniendo en la regulación de su transcripción (Huppert et al., 2007)(Figura I17). Ejemplos de estos genes son la β -globina aviar, la ubiquitina-ligasa RFP2 humana y proto-oncogenes, tales como c-MYC, bcl-2, VeGF, H-ras o N-ras etc.

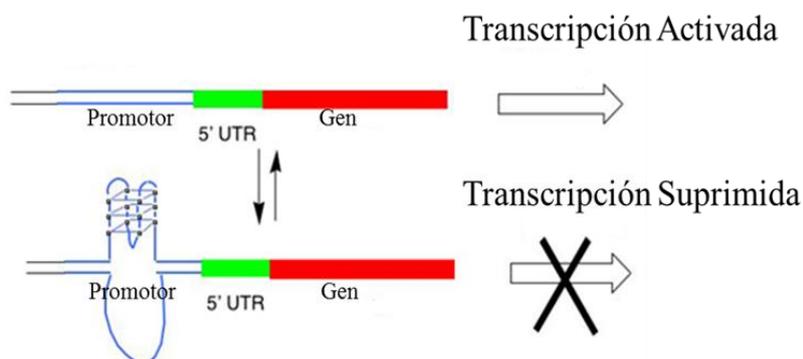


Figura 17. Modelo de formación de un G-quadruplex cerca de un promotor. En este modelo, cuando la región promotora adopta estructura G4 se suprime la transcripción del gen. Figura tomada de Bugaut & Balasubramanian, (2012).

Además de estar presente en el origen de replicación o en la región promotora de multitud genes, el G4 DNA desempeña un papel importante a nivel estructural en los telómeros (Xu et al., 2008). Las secuencias teloméricas consisten en la repetición de la secuencia d(GGGTTA) un elevado indeterminado de veces. La repetición consecutiva de dicha secuencia cumple con la secuencia consenso de formación de G4. De hecho, la formación de un G4 inmerso en la secuencia del telómero favorece la estructuración del G4 siguiente y así sucesivamente. De ahí que la estructura del telómero en condiciones fisiológicas se encuentre en forma de muchos G-quadruplex consecutivos. Dicha estructura ha sido descrita como inhibidora de la enzima telomerasa, responsable del mantenimiento de la longitud de los telómeros. Esto tiene importantes aplicaciones en el diseño y descubrimiento de fármacos, por sus implicaciones en cáncer y envejecimiento celular. La presencia de estas estructuras no es exclusiva del DNA nuclear, también se encuentran dentro del DNA mitocondrial humano (Bharti et al., 2014).

Los algoritmos bio-informáticos empleados detectan potenciales G-quadruplex gracias al empleo de la secuencia $G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}$ (Kikin et al., 2006), que implica un mínimo de tres guaninas contiguas y al menos cuatro repeticiones de este motivo para poder formar la estructura. Estos programas son capaces de rastrear esta secuencia por todo el genoma. El tipo de G4 DNA intramolecular formado depende del número de guaninas repetidas, la longitud de los loops que interconectan las guaninas y, además, del catión que esté presente en el G4 (Smargiasso et al., 2008). De esta forma, cuando el catión presente es K^+ y el tamaño del loop tiende a 1 base, el DNA tiende a estructurarse como un G4 paralelo. Un G4 paralelo es aquel en el que el sentido de todas sus hebras es el mismo. Por otro lado, cuando el tamaño del loop es grande, por ejemplo de 7 bases, y el catión presente es Na^+ , el G4 tiende a ser antiparalelo. Un G4 antiparalelo es aquel en el que el sentido de dos hebras adyacentes es distinto.

La secuencia $G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}$ es una buena herramienta tanto para el rastreo de DNA como para diseñar oligonucleótidos que formen G4 intramolecular *in vitro* (Stegle et al., 2009). La estructura G-quadruplex intermolecular, a diferencia de la estructura intramolecular, está formada por cuatro hebras de DNA. Para su formación se emplean oligonucleótidos de cadena corta con la secuencia consenso $N_{(n)}G_{(3+)}N_{(n)}$, es decir, oligonucleótidos de DNA con 3 o más de 3 guaninas seguidas. La diferencia es que, en este caso, la presencia de un único motivo GGG es suficiente, ya que permite la unión de 4 oligonucleótidos que porten esta secuencia. A diferencia del G-quadruplex intramolecular, la estructura G4 intermolecular es estable, y el rendimiento de formación es próximo al 100 %. Por el contrario, la formación de G4 intramolecular *in vitro* no es sencilla. La existencia del G4 intramolecular convive con otras estructuras en un equilibrio cinético muy sensible dependiente de muchos factores; entre ellos temperatura, pH, concentración y tipo de sal. Por tanto, en muchos casos el rendimiento de formación es bajo y se encuentran conviviendo en disolución más de una especie de DNA. Por este motivo, ante estas complicaciones, hemos empleado el G-quadruplex intermolecular como modelo de estudio en esta tesis.

Es posible inducir y estabilizar la estructura G-quadruplex mediante proteínas y algunos ligandos. De hecho, existen proteínas que interactúan con el G4 DNA para realizar funciones de índole diversa. Algunas se encargan de disociar la estructura cuando es preciso, como es el caso de las helicasas de la familia RecQ (ver sección 1.2.4.).

La estructura G-quadruplex está involucrada en tantos procesos biológicos que su estudio es de vital importancia. Deben descubrirse las condiciones y mecanismos implicados en su formación, mantenimiento y resolución. Es la vía para encontrar en un futuro herramientas que permitan interferir en todos esos procesos. Esta tesis persigue ahondar en el conocimiento de motores moleculares esenciales en diferentes procesos biológicos que utilizan este tipo de estructuras G-quadruplex para unirse al DNA.

1.2.2. I-motifs

El DNA i-motif es un tipo especial de estructura quadruplex constituída por 4 hebras de DNA ricas en citosinas dispuestas en paralelo (Kendrick et al., 2010). En la actualidad, se sabe que el DNA puede adoptar muchas estructuras secundarias alternativas al DNA doble cadena, como las estructuras tríples, o G-quadruplex. Como hemos mencionado, las secuencias con potencial para estructurarse como un G4 están muy presentes en telómeros y en regiones promotoras de genes y allí donde hay una secuencia rica en guaninas hay una secuencia complementaria rica en cisteínas. Estas secuencias pueden formar también estructuras quadruplex conocidas como i-motifs (Day et al., 2014)(Figura I18), pero se conocen mucho menos. Esto es debido a que su prevalencia *in vivo* es menor y, del mismo modo, también es menor su potencial para actuar como diana de agentes químicos para modular procesos biológicos.

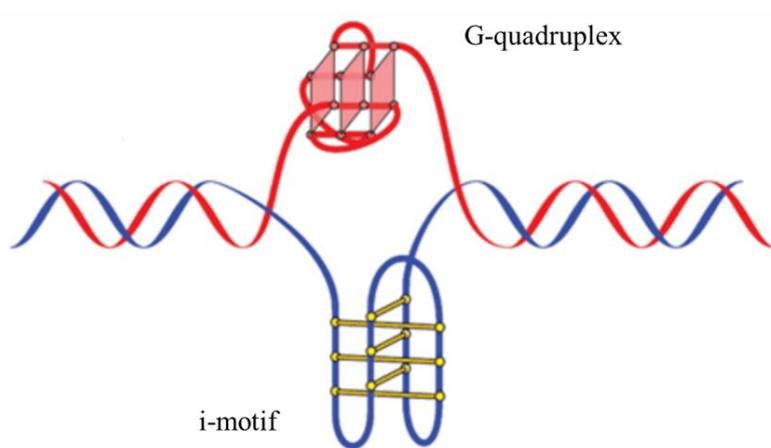


Figura I18. Hebras de dsDNA estructuradas como G-quadruplex e i-motif. Molécula de dsDNA abierta dando lugar a dos subestructuras de DNA secundarias, la superior, un G-quadruplex, y la inferior, un i-motif. Figura tomada de Brooks et al., (2010).

En 1993, Gehring, Leroy y Gueron revelaron que algunas secuencias ricas en citosinas bajo un pH ácido eran capaces de formar una estructura de 4 hebras paralelas de DNA (Gehring et al., 1993), estabilizada gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre citosinas. Fueron ellos quienes bautizaron la estructura como i-motif. Gracias a variaciones en el pH podían revertir la estructura, lo que según ellos confería al i-motif posibles aplicaciones en nanotecnología. Por ejemplo, se podrían ensamblar nanomáquinas para que funcionaran como operadores lógicos, o como sensores de pH en células vivas.

Los primeros ensayos para el estudio del i-motif se llevaron a cabo sobre la secuencia sintética TCCCC. Las secuencias se asociaban y estabilizaban para formar un quadruplex intermolecular (Day et al., 2014) (figura I19). A pesar de que la formación de puentes de hidrógeno entre citosinas estaba descrita, su aplicación para formar estructuras de DNA complejas de tipo quadruplex era novedosa.

También se diseñaron secuencias con potencial para formar i-motif intramolecular, y ofrecer un modelo de estudio de los i-motif del medio biológico. Los enlaces entre cisteínas de dos hebras se intercalaban a través de los enlaces entre cisteínas de otras dos hebras en una curiosa estructura quadruplex (Figura I19). Estos enlaces eran capaces de revertirse *in vitro* y volverse a reorganizar entre dos hebras diferentes. Se trataba, por lo tanto, de una estructura bastante versátil pero menos estable.

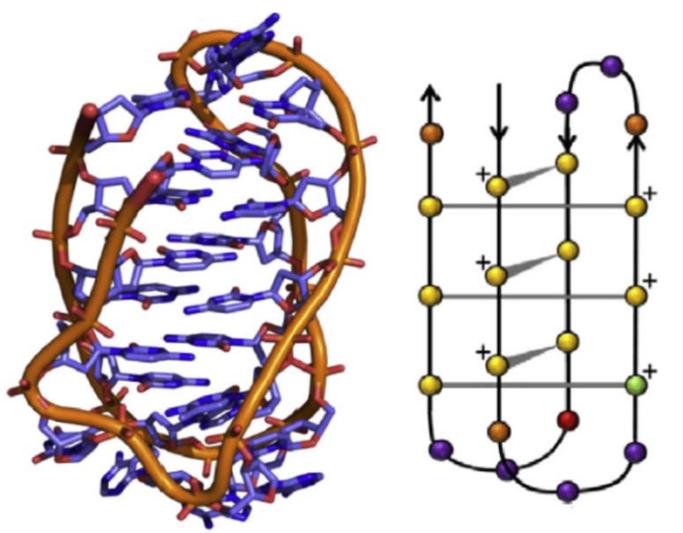


Figura I19. i-motif intramolecular formado a partir de la secuencia CCCTAACCCTAACCCUAACCCT. A la izquierda se puede observar la reconstrucción tridimensional de la molécula. A la derecha, se observa un esquema que refleja las interacciones entre guaninas. Figura tomada de Day et al., (2014) (pdb: 1el2).

Esta tesis se ha centrado en la estructura G-quadruplex pero no se puede obviar la posibilidad de también surjan estas estructuras. El i-motif está potencialmente presente cada vez que aparece un G-quadruplex en el medio biológico.

1.2.3. Secuencias potencialmente capaces de formar estructuras G-quadruplex y programas de predicción de estructura

Las herramientas bioinformáticas encargadas de la predicción de estructura G-quadruplex suelen consistir en servidores que generan información detallada acerca de la composición y distribución de posibles motivos de DNA G-quadruplex a partir de secuencias suministradas por el usuario o presentes en el NCBI. Tal y como se ha explicado en la sección anterior, sus algoritmos de búsqueda y análisis emplean la secuencia $G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}$ para identificar posibles secuencias G-quadruplex así como para analizar el potencial de éstas para estructurarse.

El programa empleado en esta tesis, QGRS (Quadruplex G-rich Sequence) es capaz de predecir la capacidad que tiene una secuencia de nucleótidos para formar estructuras G-quadruplex (Kikin et al., 2006). El usuario puede definir el número mínimo de tétradas, la longitud máxima del motivo G-quadruplex, así como el tamaño y composición de los loops entre tétradas. El análisis se realiza a partir del archivo en formato FASTA. Este método puede ser empleado para el análisis de secuencias genómicas, regiones promotoras o teloméricas, así como para secuencias de RNA. También es útil para predecir la capacidad de un oligonucleótido para estructurarse como un G-quadruplex. De forma alternativa, el programa presenta opciones para realizar búsquedas sobre NCBI, RefSeq y GenBank para analizar secuencias depositadas, así como el RNA transcrito que pueda derivarse de ellas. Es una herramienta muy potente para estudiar la relevancia de la estructura G-quadruplex en la regulación de la expresión génica.

Tal y como se ha explicado, el programa predice potenciales G4 DNAs mediante el siguiente motivo;



En esta secuencia, el valor x representa el número de guaninas presentes en la tétrada. Los códigos y1, y2 e y3 representan la longitud de los loops entre tétradas. La secuencia debe contener al menos dos guaninas para cada tétrada, considerándose que 3 o más ofrece mayor estabilidad a la estructura. QGRS considera que secuencias mayores de 30 nucleótidos no deben tenerse en cuenta pero ofrece la posibilidad de estudiar secuencias hasta una longitud de 45 bases. También debe tenerse en cuenta que loops de una longitud superior a 6 nucleótidos harían improbable la estructuración de una secuencia como un G-quadruplex, siendo óptimo un tamaño de 1-4 nucleótidos.

El programa ofrece una herramienta para evaluar la probabilidad de que un potencial G-quadruplex encontrado adopte estructura. Esta herramienta se llama G-score, y su puntuación será mayor cuando los loops sean pequeños y tiendan a ser de igual tamaño y cuanto mayor sea el número de tétradas seguidas.

1.2.4. RecQ: un motor molecular que resuelve estructuras G-quadruplex

RecQ es el miembro más representativo en bacterias de la familia de las proteínas RecQ helicasas, presentes tanto en procariotas como en eucariotas (Qin et al., 2014). Estas helicasas comparten un dominio motor y los motivos Walker A y B, que les confieren la habilidad de unir e hidrolizar ATP. Entre los miembros más estudiados de esta familia de helicasas se encuentran las proteínas RecQ de *E. coli* (Harami et al., 2015), Sgs1p de *Saccharomyces cerevisiae* (Huber et al., 2002), Rqh1 de *Schizosaccharomyces pombe* (Osman et al., 2016) y las enzimas humanas BLM (Tangeman et al., 2016), WRN (Goddard et al., 1996) y RECQL4 (W. Jin et al., 2008). La familia de las helicasas RecQ posee un gran interés debido a la importancia en el mantenimiento de la estabilidad genómica. En humanos, la ausencia de actividad de la helicasa BLM provoca el síndrome de Bloom, una enfermedad genética caracterizada por unos niveles elevados de intercambio entre cromátidas hermanas e inicio temprano de procesos malignos derivados de inestabilidad genómica (Ellis et al., 1995). Deficiencias en la actividad de WRN provoca el síndrome de Werner, una enfermedad caracterizada por deleciones y translocaciones cromosómicas que derivan en un envejecimiento prematuro (Yu et al., 1996). Las deficiencias en RECQL4 se han relacionado con el síndrome de Rothmund-Thomson (W. Jin et al., 2008), caracterizado por mosaïcismo cromosómico, desarrollo de osteosarcomas y otros síntomas que incluyen la telangiectasia. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que portan mutaciones en Sgs1 aumentan su recombinación mitótica, segregación cromosómica deficiente, reducen su capacidad proliferativa y acumulan círculos de rDNA extracromosómico, un rasgo que en humanos deficientes para WRN provoca además envejecimiento prematuro (Sinclair et al., 1997). Esta familia de helicasas se encarga de forma primordial de resolver estructuras de DNA como el G-quadruplex. Para ello, presentan un dominio de unión a G4 DNA y una afinidad muy alta por este tipo de estructuras (Huber et al., 2006). Este último rasgo presente en esta familia de proteínas nos llevó al estudio de la proteína RecQ de *E. coli*; el miembro más representativo y estudiado de la familia de helicasas RecQ.

En RecQ de *E. coli* se diferencian dos regiones: la región N-terminal de 59 kDa y la región C-terminal, más pequeña, de unos 9 kDa (Bernstein et al., 2003). La región N-terminal posee actividad helicasa y ATPasa. Es la región catalítica e incluye los dominios helicasa y RecQ-Ct (RecQ-conserved). La región C-terminal, por otro lado, está relacionada con la capacidad asociativa de la proteína al DNA e incluye el dominio HRDC (Helicase-and-RNaseD-C-terminal).

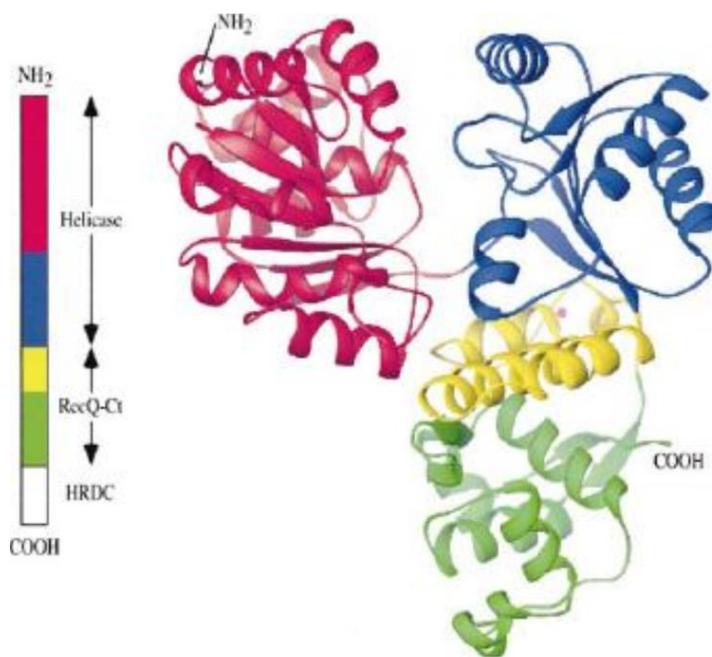


Figura I20. Diagrama esquemático y estructura de RecQ. Los diferentes dominios de RecQ se han representado en diferentes colores cuya descripción se detalla en el margen izquierdo de la figura. Se muestra al dominio helicasa con 2 subdominios coloreados en rojo y azul, al dominio RecQ-Ct con sus dos subdominios coloreados en amarillo y verde y finalmente, el dominio HRDC en blanco. Figura tomada de Bernstein et al., (2003) (pdb: 1OYW).

El dominio responsable de interactuar con estructuras no canónicas es la región RecQ-Ct (Bernstein et al., 2003). Esta región está bien conservada y une de forma autónoma y con muchísima afinidad la estructura G-quadruplex. El dominio HRDC, representado en la figura I20 en color blanco, une preferentemente Holliday junctions y ssDNA. HRDC también une en ocasiones horquillas de DNA y G-quadruplex pero de forma no comparable a RecQ-ct.

Una vez que RecQ se une al DNA, transloca ssDNA mediante la obtención de energía procedente de la hidrólisis de ATP. RecQ transloca y resuelve DNA estructurado capaz de afectar a la integridad genómica. El dominio HRDC no sólo está involucrado en la interacción de RecQ con el DNA, además, modula la translocación del DNA y la actividad ATPasa asociada, inhibiéndola en presencia de ssDNA no estructurado o dsDNA, evitando así el gasto innecesario de energía (Harami et al., 2015).

La resolución del G4 DNA en esta familia de enzimas está bien caracterizada (Mendoza et al., 2016). Requiere fundamentalmente la interacción entre el DNA estructurado y el dominio RecQ-Ct. Es un proceso que requiere ATP y que avanza en dirección 3' - 5' para desnaturalizar el G4 DNA. Este fenómeno se estudió sobre sustratos G-quadruplex intermoleculares y sobre algunos de los sustratos biológicos de esta familia de enzimas capaces de estructurarse como DNA G-quadruplex intramolecular (Liu et al., 2010)(Q. Wang et al., 2011). En esta tesis, se ha caracterizado la actividad ATPasa de esta enzima frente a sustratos de DNA G-quadruplex, comparándola con otros sustratos: ssDNA y dsDNA.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterización bioquímica de TraB.
2. Caracterización estructural de TraB.
3. Análisis comparativo de la actividad de TraB frente a otros motores moleculares implicados en translocar DNA.
4. Estructuras G-quadruplex y su implicación en motores moleculares que translocan DNA

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas.

Tabla M1. Cepas de *E. coli* utilizadas en esta tesis.

Cepa	Genotipo	Referencia
C41	F dcm ompT hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻) gal I(DE3) Nx ^r supE44 DlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96	(Miroux & Walker, 1996)
DH5 α	thi -1 relA1	(Grant et al., 1990)
D1210	Sm ^r recA hspR hsdM rpsI laq1 ^a	(Sandler & Clark, 1990)
UB1637	Sm ^r F lys his trp rpsL recA 56	(de la Cruz & Grinsted, 1982)

3.2. Plásmidos.

Tabla M2. Plásmidos empleados en esta tesis.

Plásmido	Descripción	Fenotipo	Referencia
pET28a	Vector de Expresión	Km ^r , Rep (pMB8)	(Y. Jin et al., 2002)
pMEC17	pET28a::TraB Δ N270	Km ^r , Rep (pMB8)	Este trabajo
pMEC19	pET28a::TraB Δ N270 Δ C79	Km ^r , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSU1547	pET22::TrwA	Ap ^r ,Rep(pMB8)	(Moncalián et al., 2004)
pSU4637	pET3a::TrwB Δ N70	Ap ^r ,Rep(pMB8)	(Moncalian et al., 1999)
pEB211	Fusión pSVH1 y pK18	Km ^r	(Reuther et al., 2006)
R388	Plásmido conjugativo IncW	Tp ^r	(Datta & Hedges, 1972)

3.3. Medios de cultivo

Para el crecimiento de bacterias en medio líquido se utilizó el medio Luria-Bertani Broth (LB), cuya composición es 10 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl.

Cuando se precisó de un medio de crecimiento sólido, se suplementó el medio líquido LB con 1,5 % (m/v) de agar.

En los casos en que fue necesario un medio de crecimiento selectivo, se incluyeron en el medio los antibióticos precisos para cada cepa o plásmido bacteriano. A continuación, en la Tabla M3, se detallan los antibióticos empleados para cada cepa bacteriana, con su concentración de antibiótico empleada, y en la Tabla M4, los antibióticos empleados para cada plásmido y la concentración de antibiótico empleada:

Tabla M3. Tabla de resistencia a antibióticos de las cepas empleadas en esta tesis, con la concentración de antibiótico necesaria para su selección en medio de cultivo.

Cepa Bacteriana	Resistencia Antibiótico	Concentración Antibiótico
C41	No tiene resistencia	
DH5 α	Ácido Nalidíxico (Nx)	25 μ g/ml
D1210	Estreptomicina (Sm)	300 μ g/ml
UB1637	Estreptomicina (Sm)	300 μ g/ml

Tabla M4. Tabla de resistencia a antibióticos de los plásmidos empleadas en esta tesis, con la concentración de antibiótico necesaria para su selección en medio de cultivo.

Plasmidos	Resistencia Antibiótico	Concentración Antibiótico
pEB211	Kanamicina (Km)	25 μ g/ml
R388	Trimetropim (Tp)	10 μ g/ml
pET3a y derivados	Ampicilina (Ap)	100 μ g/ml
pET28a y derivados	Kanamicina (Km)	50 μ g/ml
pET22 y derivados	Ampicilina (Ap)	100 μ g/ml

3.4. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos empleados en esta tesis fueron encargados a Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich).

Tabla M5. Oligonucleótidos utilizados para formar los diferentes sustratos de DNA empleados durante el desarrollo de esta tesis.

Oligo-nucleótido	Longitud	Secuencia 5' - 3'
A	18-mer	CCGTTTGCAGGGGGTTTCT
B	22-mer	ATTTCCGTTTGCAGGGGGTTTCT

C	29-mer	TTATTTTCATTTCCGTTTGC GGGGGTTTCT
D	35-mer	AGAACGGGGGACGTTTCGCCGTTTGCTTTCTGCG A
E	45-mer	AAGGACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCACTA CAATATTGCCGC
F*	45-mer	[Flc]AAGGACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCA CTACAATATTGCCGC
G*	45-mer	[Flc]AAGGACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCA CTACAATATTGCCGC[Biot]
H	45-mer	GCGGCAATATTGTAGTGGCATAAACTACACAG GTTTTCGTCCTT
I*	45-mer	[Flc]GCGGCAATATTGTAGTGGCATAAACTACA CAGGTTTTTCGTCCTT
J	45-mer	GACCGGGCCCCGACCCGGACGCCGGAGTGCCCG ACCCGGACGCC
K*	45-mer	[Flc]GACCGGGCCCCGACCCGGACGCCGGAGTGC CCGACCCGGACGCC
L	45-mer	GGGCGTCCGGGTCGGGCACTCCGGCGTCCGGGT CGGGGCCCGGTC
M*	45-mer	[Flc]GGGCGTCCGGGTCGGGCACTCCGGCGTCCG GGTCCGGGGCCCGGTC
N	45-mer	ATGCCACTACAATATTGCCGCGACCCGGAGACC CGGAGACCCGGA
O*	45-mer	[Flc]ATGCCACTACAATATTGCCGCGACCCGGAG ACCCGGAGACCCGGA
P	45-mer	TCCGGGTCTCCGGGTCTCCGGGTCCGGCAATA TTGTAGTGGCAT
Q	45-mer	ATGCCACTACAATATTGCCGCTCCGGGTCTCCGG GTCTCCGGGTC
R*	45-mer	[Flc]ATGCCACTACAATATTGCCGCTCCGGGTCTC CGGGTCTCCGGGTC
S	45-mer	GACCCGGAGACCCGGAGACCCGGAGCGGCAAT ATTGTAGTGGCAT
T*	45-mer	A[Biot]GGACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCAC TACAATATTGCCGC[Flc]
U	45-mer	TCGCCACGTTTCGCCGTTTGC GGGGGTTTCTGCG AGGAACTTTTGG
V*	45-mer	[Flc]TCGCCACGTTTCGCCGTTTGC GGGGGTTTCT GCGAGGAACTTTTGG
W*	45-mer	[Flc]TCGCCACGTTTCGCCGTTTGC GGGGGTTTCT GCGAGGAACTTT[Biot]G
X	50-mer	ATACGTTATTGAATCTCTAACTCTAACTCTAACT CTCATTATGAAGTTAG
Y	50-mer	ATCGTGCGCGAGGGCTTGGGAACGGCAGGGAA GGGCATCGAGTTCGATAT
Z*	50-mer	[Flc]ATCGTGCGCGAGGGCTTGGGAACGGCAGGG AAGGGCATCGAGTTCGATAT[Biot]
AA*	50-mer	[Flc]CTAACTTCATAATGAGGGTTAGGGTTAGGG TTAGGGATTCAATAACGTAT[Biot]

BB	55-mer	CTGCATCATTGTAGCACCATCATAGCATTATAGT TGCATCATTGCTGCACGATAA
CC	55-mer	TTATCGTGCAGCAATGATGCAACTATAATGCTAT GATGGTGCTACAATGATGCAG
DD	65-mer	ACGAAAACCTGTGTAGTGTTAAGGACGAAAACC TGTGTAGTGTTATGCCACTACAATATTGCCGC
EE*	65-mer	[Flc]ACGAAAACCTGTGTAGTGTTAAGGACGAAA ACCTGTGTAGTGTTATGCCACTACAATATTGCCG C
FF	65-mer	GCGGCAATATTGTAGTGGCATAAACTACACAG GTTTTTCGTCCTTAACACTACACAGGTTTTTCGT
GG*	65-mer	[Flc]GCGGCAATATTGTAGTGGCATAAACTACA CAGGTTTTTCGTCCTTAACACTACACAGGTTTTTCG T
HH	65-mer	GACCGGGCCCCGACCCGGACGCCGGAGTGCCCG ACCCGGACGCCCGCGTCCGGGTCGGGCCCCGA
II*	65-mer	[Flc]GACCGGGCCCCGACCCGGACGCCGGAGTGC CCGACCCGGACGCCCGCGTCCGGGTCGGGCCCCG GA
JJ	65-mer	TCCGGGCCCCGACCCGGACGCCGGGCGTCCGGGTC GGGCACTCCGGCGTCCGGGTCGGGGCCCCGGTC
KK*	65-mer	[Flc]TCCGGGCCCCGACCCGGACGCCGGGCGTCCGG GTCGGGCACTCCGGCGTCCGGGTCGGGGCCCCGG TC
LL	65-mer	ACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCACTACAAT ATTGCCGCGACCCGGAGACCCGGAGACCCGGA
MM*	65-mer	[Flc]ACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCACTAC AATATTGCCGCGACCCGGAGACCCGGAGACCCG GA
NN	65-mer	TCCGGGTCTCCGGGTCTCCGGGTCGCGGCAATA TTGTAGTGGCATAAACTACACAGGTTTTTCGT
OO	65-mer	ACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCACTACAAT ATTGCCGCTCCGGGTCTCCGGGTCTCCGGGTC
PP*	65-mer	[Flc]ACGAAAACCTGTGTAGTGTTATGCCACTAC AATATTGCCGCTCCGGGTCTCCGGGTCTCCGGGT C
QQ	65-mer	GACCCGGAGACCCGGAGACCCGGAGCGGCAAT ATTGTAGTGGCATAAACTACACAGGTTTTTCGT
RR	65-mer	ACGTTTTCGCCGTTTGCTTTCTGCGAACGTTTCGC CGTTTGCTTTCTGCGAAATTGGGGGAGAAC

*Los oligonucleótidos marcados con Fluoresceína y Biotina se indican como [Flc] y [Biot] respectivamente en la posición señalada.

Tabla M6. Oligonucleótidos empleados para clonar.

Oligo-nucleótido	Longitud (bases)	Secuencia 5' - 3'
X1	20-mer	TAATACGACTCACTATAGGG
X2	20-mer	CTAGTTATTGCTCAGCGGTG
X3	33-mer	ATTAAACA TATGGGGGGCGCGTTCGTCGGTCG C
X4	35-mer	ATTAAG AATTCTCAGGCGGTAAGCCCGAATCG GTC
X5	39-mer	ATTAAAA AGCTTTCATCACTCGAGGACGGCGG CCAGGAG

En la tabla se ha resaltado en gris y negrita las secuencias dianas de las enzimas de restricción empleadas en esta tesis. Los oligonucleótidos X3, X4 y X5 disponen de secuencias dianas para los enzimas de restricción *NdeI*, *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. Además de las secuencias diana se ha marcado el sitio de corte mediante una barra vertical en negrita.

3.5. Técnicas de Biología Molecular

3.5.1. Clonaje y amplificación de DNA por PCR

Las técnicas detalladas a continuación forman parte del protocolo que se empleó para amplificar los genes *traB Δ N270* y *traB Δ N270 Δ C79*, procedentes del plásmido conjugativo pEB211, y clonarlos en el vector de expresión pET28a.

El plásmido pEB211 consistió en una fusión de todo el plásmido pSVH1, procedente de *Streptomyces venezuelae*, con el plásmido pK18 (Reuther et al., 2006). La fusión con pK18 permitió al plásmido pSVH1 replicar en *Escherichia coli*.

Extracción y purificación de DNA: para las extracciones de DNA, se emplearon los kits comerciales de la casa Sigma Aldrich. Para la extracción de DNA plasmídico, se empleó el kit GenElute Plasmid Miniprep (Quiagen). Para la extracción de DNA de geles de agarosa, se empleó el kit GenElute Gel Extraction. Y, finalmente, para limpiar el DNA se empleó el kit GenElute PCR Clean-Up. Para la determinación de la concentración de DNA, se utilizó un equipo NanoDrop200 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Amplificación por PCR: Las mezclas de reacción para la amplificación de fragmentos de DNA (genes *traBAN270* y *traBAN270ΔC79*) se hicieron en un volumen final de 50 μl. En el caso de *traBAN270*, dicha mezcla contenía los oligonucleótidos X3 y X4 de la Tabla M6 a una concentración de 10 pmol/μl, DNA molde (50 ng del plásmido pEB211), 200 μM de mezcla de desoxinucleótidos (dNTPS), 1U de polimerasa Phusion High-Fidelity (New England Biolabs), 1X del tampón de la polimerasa y agua destilada. La amplificación de *traBAN270ΔC79* se llevó a cabo de la misma forma utilizando los oligonucleótidos X3 y X5 de la Tabla M6.

Digestión Enzimática: los vectores de clonación e insertos fueron digeridos con sus enzimas de restricción correspondientes en un volumen final de 20 μl. La mezcla de digestión contenía 500 ng de DNA, 1U de enzimas de restricción (ThermoFisher Scientific) (*NdeI* y *EcoRI* en el caso de *traBAN270*) (*NdeI* y *HindIII* en el caso de *traBAN270ΔC79*), 1X del tampón comercial recomendado por el fabricante (“O Buffer” para *traBAN270*) (“R buffer” para *traBAN270ΔC79*) y agua destilada. Las digestiones se incubaron durante 2 horas a 37°C.

Defosforilación de DNA: para aumentar la eficacia de ligación y disminuir la aparición de falsos positivos, se defosforilaron los extremos libres del vector (pET28a) digiriéndolo con fosfatasa alcalina (Fermentas). Se siguieron las indicaciones del fabricante, incubando la reacción durante 30 minutos a 37°C. La reacción finalizó al inactivar el enzima mediante la incubación de la mezcla a 65°C durante 20 minutos.

Ligación: Las reacciones de ligación se llevaron a cabo empleando una relación vector:inserto 1:5. Las mezclas de reacción para la ligación contenían 10-15 ng de vector (pET28a digerido y defosforilado), 50-75 ng de inserto (amplificaciones digeridas de *traBAN270* y *traBAN270ΔC79*), 5 U de ligasa del fago T4 (Fermentas), 1X del tampón comercial proporcionado por Fermentas, y agua destilada hasta un volumen final de 20 μl. Las mezclas de reacción se incubaron a 16 °C o/n. Se emplearon las mismas reacciones sin inserto como control negativo.

Secuenciación de DNA: Los clones obtenidos mediante amplificación por PCR (plásmido pMEC17 con el gen *traBAN270* y pMEC19 con el gen *traBAN270ΔC79*), se enviaron al servicio de secuenciación de MACROGEN Inc. “DNA Sequencing Service” (Seoul, Korea). Las muestras enviadas contenían 500 ng de DNA molde (pMEC17 y pMEC19) y 25 pmol de cebadores (oligonucleótidos X1 y X2 de la Tabla M6, respectivamente, también denominados oligonucleótidos T7 y pT7 universales). El volumen final de las muestras fue de 10 μl, siguiendo las indicaciones del servicio de secuenciación.

3.5.2. Formación de los diferentes sustratos de DNA

3.5.2.1. Formación de sustratos de DNA de doble cadena (dsDNA)

Las muestras de dsDNA se prepararon a partir de 2 oligonucleótidos complementarios (40 μ M concentración final de cada uno). Se incubaron a 95°C durante 3 min en 50 μ l de buffer 20 mM TrisHCl pH 7,0, 150 mM NaCl y 0,1 mM EDTA. Posteriormente, la muestra se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente (aprox. durante 2 horas). La formación de dsDNA finalmente se confirmó por electroforesis en gel de acrilamida (10%). Las muestras se guardaron congeladas a -20°C.

3.5.2.2. Formación de sustratos G-quadruplex intramolecular

Para preparar DNA G-quadruplex intramolecular, se escogió un oligonucleótido cuya secuencia cumplía con la secuencia consenso $G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}N_{(1-7)}G_{(3-7)}$ (oligonucleótidos K, L, X, Y, GG y HH de la Tabla M5), y se disolvió en buffer 20 mM Pipes pH 6,2, 150 mM K^+ y 0,1 mM EDTA a una concentración final de 10 μ M. Esta preparación debe realizarse a baja concentración de oligonucleótido para evitar interacciones intermoleculares. La muestra se incubó a 95°C durante 3 min y posteriormente se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente (aprox. durante 2 horas). Finalmente, la formación de DNA G-quadruplex intramolecular, se confirmó por electroforesis en gel de acrilamida (10%). Las muestras se guardaron congeladas a -20°C.

3.5.2.3. Formación de sustratos G-quadruplex intermolecular

Para preparar DNA G-quadruplex intermolecular, se escogió un oligonucleótido con más de 3 guaninas contiguas dentro de su secuencia (oligonucleótidos A, B, C, D, U, V y PP de la Tabla M5) y se disolvió a una concentración final de 240 μ M en buffer 20 mM Pipes pH 6,2, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA y 5 % de Glicerol. La muestra se incubó a 60 °C durante 12 h, y posteriormente a 37°C durante otras 12h. Tras este periodo de incubación, la muestra se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente (aprox. durante 2 horas). Finalmente, la formación de DNA G-quadruplex intermolecular se confirmó por electroforesis en gel de acrilamida (10%) o filtración en gel. Las muestras se guardaron congeladas a -20°C.

3.5.3. Análisis de estructuras secundarias en el DNA

Tras someter los oligonucleótidos a un protocolo de formación de estructura secundaria (G-quadruplex), se analizaron para evaluar el rendimiento del proceso. Las dos técnicas empleadas para evaluar el rendimiento fueron filtración en gel y electroforesis en gel nativo.

Para analizar oligonucleótidos con Fluoresceína, se empleó preferentemente la técnica de electroforesis en gel nativo. Los oligonucleótidos se diluyeron hasta una concentración 20 nM en el buffer empleado para formar estructura y se mezclaron 10 µl de esta disolución con 10 µl de buffer de carga (20 mM Pipes pH 6,2, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 % (p/v) de Azul de Bromofenol y 10 % (v/v) de Glicerol). Posteriormente, se cargaron los 20 µl de muestra en un gel nativo de TBE al 10 % (p/v) de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V, 30 minutos. Finalmente, el gel se reveló en un equipo FUJIFILM FLA 5100. El escáner empleó una longitud de onda de excitación de 473 nm, y para la lectura de la emisión de fluorescencia se empleó un filtro LPB (510LP), que leía en la banda del azul. Con el programa ImageJ, se cuantificó la intensidad de las bandas resultantes. Para el cálculo del rendimiento de formación, se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = I_{\text{banda estructurada}} / (I_{\text{banda estructurada}} + I_{\text{banda sin estructurar}})$$

Para oligonucleótidos sin fluoresceína se empleó un análisis por filtración en gel. Las muestras fueron preparadas a una concentración 20 µM, diluidas en el buffer de formación de estructura. Se cargaron 30 µl de esta dilución en un “loop” de 30 µl de un HPLC Ettan LC (GE). Para resolver la muestra, se empleó el buffer de formación de estructura como buffer de carga, una columna Superdex 200/PC 3.2., y un flujo constante de 30 µl/min. El equipo se configuró para leer absorbancia a 260 nm. El resultado fue un perfil cromatográfico, con una o varias curvas, en función del rendimiento de formación. El cromatograma representaba en el eje X el volumen de elución y en el eje Y la absorbancia a 260 nM, por lo que el área que subyacía bajo cada una de las curvas era proporcional a la cantidad de oligonucleótido que había y, en términos relativos, se pudo aplicar la siguiente fórmula para obtener el rendimiento de formación:

$$\text{Rendimiento} = \text{Área oligo con estructura} / (\text{Área oligo con estructura} + \text{Área oligo sin estructura})$$

3.6. Técnicas de Microbiología

3.6.1. Ensayos de crecimiento bacteriano

Para la confección de curvas de crecimiento se inoculó una colonia puntual (de células DH5α ó D1210) en medio mínimo, y se incubó en agitación a 37°C o/n. El medio mínimo constaba de 1% (p/v), sales de M9, 0,5 % (p/v) de casaminoácidos, 0,4% (p/v) de Glucosa, 1 mM CaCl₂, 1 mM Tiamina, 1 mM MgSO₄ y, finalmente, 25 µg/ml de Ácido Nalidíxico en el caso de emplear células DH5α, o 300 µg/ml, en el caso de emplear células D1210.

Posteriormente, a partir de este cultivo se practicó una dilución 1:1000 en medio fresco. Una vez se dispuso de cultivo diluido de ambas cepas bacterianas, se pudieron someter a diferentes condiciones de estudio.

En esta tesis, se estudió el efecto de la molécula NMM (N-metil-mesoporfirina) sobre el crecimiento de las cepas bacterianas DH5α y D1210 (Tabla M1). Para ello, se añadieron concentraciones crecientes de NMM a cultivos diluidos de ambas cepas, sobre placas de 96 pocillos, y se observó cómo proliferaban. Las concentraciones de NMM ensayadas sobre ambas líneas celulares fueron 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 y 30 mM.

El crecimiento bacteriano se monitorizó cada 5 minutos, a partir de la lectura de DO (Densidad Óptica) sobre cada pocillo de la placa.

El equipo empleado, encargado de automatizar las lecturas de DO sobre los 96 pocillos, fue un equipo VICTOR™ 1420 MULTILABEL COUNTER (PERKIN ELMER) y el programa utilizado fue Wallac 1420 Workstation.

3.6.2. Preparación de células electrocompetentes

Con este protocolo, se prepararon células competentes de las cepas C41 y DH5 α de *E. coli* (Tabla M1).

A partir de un glicerol de la cepa seleccionada, se practicó un *restriking*, sobre una placa Petri con LB-agar (suplementada con Ácido Nalidíxico 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el caso de emplear DH5 α) y se incubó o/n a 37 °C. Posteriormente, se inoculó una colonia puntual en un matraz de 10 ml de LB, y se dejó de nuevo incubando en agitación, o/n, a 37 °C. El cultivo se diluyó en una relación 1:20, en un matraz de 200 ml con medio LB, y se incubó en agitación, a 37 °C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6.

A partir de este punto, todo el tratamiento posterior se desarrolló en baño de hielo.

Una vez alcanzada una DO de 0,6, las células se incubaron en baño de hielo durante 30 minutos y, posteriormente, se centrifugaron a 5.000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y el pellet resultante se resuspendió en 200 ml de agua destilada, estéril y fría. Este ciclo de lavado y centrifugación se repitió de nuevo. A continuación se resuspendieron las células en 200 ml de una mezcla de agua destilada y 10% (p/v) de glicerol. Finalmente, la muestra se centrifugó de nuevo, se eliminó el sobrenadante, y el pellet de células resultante se resuspendió en 1 ml de la mezcla de agua al 10 % (v/v) de Glicerol. El volumen final de células se distribuyó en alícuotas de 60 μL y se almacenaron a -80 °C.

3.6.3. Electroporación células competentes

El DNA con el que se debía transformar se dializó previamente en un filtro Millipore GS de 0,05 μm \varnothing de poro. El filtro se dispuso flotando sobre un lecho de agua destilada en una placa "Petri". Sobre el filtro se dispuso una gota de 10 μl con el DNA. La gota permaneció sobre el filtro durante aprox. 20-30 minutos. De este modo, se eliminaron las sales presentes en el buffer. El DNA dializado se recogió y se emplearon 5 μl de muestra en cada electroporación junto a 50 μl de células competentes. Para ello, la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación de 2 mm (Molecular BioProducts) refrigerada en baño de hielo. Para el pulso de electroporación se empleó un electroporador Micropulser™ (BioRad) a 2,5 kV, 25 μF y 200 Ω . Las células, tras ser electroporadas, se disolvieron en 1 ml de LB estéril y se incubaron a 37 °C en agitación. Finalmente, se sembraron 100 μL de estas células en una placa de LB-Agar, con el antibiótico de resistencia del plásmido empleado en la transformación.

3.6.4. Ensayos de conjugación

Las células donadoras y recipientes se dejaron crecer por separado, en agitación, o/n , a 37 °C y en medio LB. Donadoras y recipientes crecieron en presencia de su antibiótico correspondiente, hasta alcanzar fase estacionaria. Las células donadoras se diluyeron en una relación 1:20 y se dejaron crecer hasta una densidad óptica de 0,6. Posteriormente, se mezclaron 200 µL de donadoras, con 500 µL de recipientes en fase estacionaria. Se centrifugó la mezcla a 12.000 g, durante 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. Las células del pellet resultante se resuspendieron en 1 ml de medio LB y se volvieron a centrifugar, de modo que los restos de antibiótico fueron eliminados. El pellet resultante se resuspendió en un volumen de 100 µL y se dispuso en un filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm Ø de poro (Sartorius Stedim Biotech). El filtro se depositó sobre una placa de LB-Agar durante 60 minutos, a 37 °C. A continuación, los filtros se lavaron en 2 ml de medio LB, libre de antibiótico, y se agitaron con vórtex; realizando diluciones seriadas del lavado. Finalmente, se sembraron 100 µL de cada una de las diluciones en placas con los antibióticos necesarios para seleccionar transconjugantes y donadoras.

Se contó el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de cada dilución de transconjugantes y donadoras. Para obtener la frecuencia de conjugación, se aplicó la siguiente fórmula:

$$F_{\text{Conjugación}} = (\text{Transconjugantes} \times \text{Dilución}) / (\text{Donadores} \times \text{Dilución})$$

3.7. Técnicas Bioquímicas

3.7.1. Purificación de proteínas

Todas las proteínas empleadas en esta tesis se sobre-expresaron en la cepa C41 (Tabla M1). Para ello, C41 (DE3) fue transformada con el plásmido correspondiente y se creció el cultivo en 2-4 litros de LB, con antibiótico, a 37 °C y en agitación. Se dejó crecer hasta alcanzar una DO (Densidad Óptica) de 0,5. En ese momento, se indujo la sobreexpresión mediante la adición de IPTG (Isopropil-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1mM. El inductor IPTG es capaz de inducir el gen de la T7 RNA polimerasa presente en el cromosoma de C41, mediante su interacción con el promotor LacUV5 y, de esta forma, producir T7 RNA polimerasa capaz de reconocer la región promotora del plásmido donde se ha clonado la enzima a sobreexpresar (pET3a, pET28a ó pET22). El cultivo continuó incubándose a 37 °C, en agitación, durante un tiempo específico, dependiendo de la proteína que fuera a purificarse. Cada enzima purificada precisaba un tiempo específico para sobre-expresarse de forma óptima. Los tiempos de sobreexpresión para TrwA-His y TrwBN70 fueron de 6 y 5 horas, respectivamente. TraBAN270 y TraBAN270ΔC79 fueron sobre-expresadas durante 5 horas. Transcurrido ese tiempo, el cultivo se centrifugó a 6.000 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante fue conservado a -80 °C hasta el momento de su utilización.

3.7.1.1. Purificación de TrwA-His

Después de transformar el plásmido pSU1547 (Tabla M2.) en C41 y sobre-expresar TrwA-His en 2 litros de cultivo, el pellet resultante se congeló a -80°C . Tras un periodo de tiempo no inferior a 12 horas, se descongeló el pellet y se resuspendió en 40 ml de buffer de dilución (100 mM Tris-HCl pH 7,6, 500 mM NaCl y 0.001 % (p/v) PMSF), suplementado con 2,5 mM de Benzamidina. Las células fueron lisadas por sonicación y posteriormente, el lisado fue centrifugado a 40.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C . El sobrenadante se cargó en una columna cromatográfica HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare), equilibrada con buffer (100 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl y 0.001 % (p/v) PMSF). La proteína unida a la columna se eluyó en un gradiente de Imidazol de 50 ml, desde 0 hasta 500 mM. El buffer empleado para realizar el gradiente consistía en 100 mM Tris-HCl pH 7,6, 200 mM NaCl, 0,001% (p/v) PMSF y 500 mM Imidazol. Posteriormente, se escogieron las fracciones más puras, se reunieron en un mismo recipiente y se concentraron en un Centricon YM10 (Amicon) hasta un volumen final de 4 ml. El concentrado proteico fue cargado en una columna cromatográfica Superdex-75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare), equilibrada con buffer 50 mM Pipes-NaOH pH 6,2, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 0,1mM EDTA, 10 % (v/v) Glicerol y 0,001 % (p/v) PMSF. Se midió la concentración de fracciones de proteína seleccionadas mediante el método BCA (BCA Protein Assay Kit). Finalmente, las fracciones se guardaron a -80°C como alícuotas de 50 μl .

3.7.1.2. Purificación de TrwB Δ N70

Después de transformar el plásmido pSU4637 (Tabla M2) en C41 y sobre-expresar TrwB Δ N70 en 4 litros de cultivo, el pellet resultante se congeló a -80°C . Tras un periodo de tiempo no inferior a 12 horas, se resuspendió en 50 ml de buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 y 0,001% (p/v) PMSF), al que se le añadió 5 mM ATP, 10% (p/v) sacarosa, 0,8 mg/ml lisozima, 2,5 mM Benzamidina y una tableta de inhibidores de proteasas (ThermoFisher). Después de 30 minutos de incubación en baño de hielo, se añadieron 50 ml de buffer A suplementado con 0,5 % (p/v) de Triton X-100 y 1 M de NaCl. El lisado fue centrifugado a 40.000 g durante 30 minutos, a 4°C . El sobrenadante se diluyó con buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1mM EDTA, 2 mM MgCl_2 y 0,001% (p/v) PMSF), hasta una concentración final de NaCl de 0,15 M. Tras ser disuelto, el sobrenadante se cargó en una columna cromatográfica de Fosfocelulosa P11 (Whatman), equilibrada con buffer B y 0,15 M NaCl. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con buffer B y 1 M NaCl. Posteriormente, el eluido fue cargado en una columna HiTrap-SP de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada con buffer B, al que se le añadió 0,15 M de NaCl. Las proteínas se eluyeron en un gradiente de sal de 120 ml, desde 0,15 M de NaCl, hasta 1M. El eluido se concentró en un Centricon YM30 (Amicon), hasta un volumen final de 4 ml. Finalmente, el concentrado proteico se cargó en una columna Superdex-200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare), equilibrada con buffer que contenía 50 mM Pipes-NaOH pH 6,2, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol y 0,001% (p/v) PMSF. Las alícuotas seleccionadas, obtenidas en este último paso de purificación, se conservaron a -80°C y su concentración fue determinada mediante BCA (BCA Protein Assay Kit).

3.7.1.3. Purificación de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79

Después de transformar el plásmido pMEC17 (Tabla M2) o pMEC19 en C41, y sobreexpresar TraB Δ N270 o TraB Δ N270 Δ C79 en 4 litros de cultivo, el pellet resultante se congeló a -80°C. Tras un periodo de tiempo no inferior a 12 horas, se resuspendió en 100 ml de buffer de dilución (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,001% (p/v) PMSF y 5% Glicerol). Las células fueron lisadas mediante el empleo de French Press a 20.000 psi y posteriormente, el lisado fue centrifugado a 40.000 g durante 30 minutos, a 4 °C. Se cargó el sobrenadante en una columna cromatográfica HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare), equilibrada con buffer de dilución. La proteína unida a la columna se eluyó en un gradiente de Imidazol desde 0 hasta 500 mM. Las fracciones seleccionadas del gradiente se cargaron en una columna HiTrap-Q de 1 ml (GE Healthcare), con el fin de concentrar la muestra. Para eluir la proteína de la columna, se empleó un buffer 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 400 mM NaCl, 0,001% (p/v) PMSF y 5% Glicerol. La muestra se eluyó en un volumen de 5 ml, en un único paso sin gradiente con el fin de concentrarla en un volumen inferior a 1 ml. El concentrado proteico se cargó en una columna Superdex-200 HiLoad 16/60 previamente equilibrada en buffer de dilución. Posteriormente, se cuantificó el contenido proteico de las fracciones obtenidas mediante un equipo NanoDrop200 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific) y las fracciones se conservaron a -80°C en alícuotas de 50 μ l.

3.7.2. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-PAGE

Se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970), en geles al 12% de SDS-poliacrilamida para TrwB Δ N70, TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79 y al 15% para TrwA-His. A las muestras se les añadió buffer de carga (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % (p/v) SDS, 5 % Glicerol y 0,02% (p/v) Azul de Bromofenol) en una relación 5:1 (muestra:buffer). Posteriormente, las muestras se calentaron a 100 °C, durante 5 minutos, antes de cargarse en el gel. Como patrón de pesos moleculares, se empleó “Low Range” (BioRad Laboratories). Se cargaron 5 μ L de este patrón en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en una disolución con 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 200 mM glicina y 1% SDS. Posteriormente, los geles se tiñeron con una solución de 0,1% de azul brillante de Coomassie R-250 (Merck), 50 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) Ácido Acético Glacial, durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. Los geles se destiñeron mediante el empleo de una solución al 10% (v/v) en Metanol y 10 % (v/v) en Ácido Acético Glacial. Para archivar los resultados los geles podían deshidratarse y guardarse, o bien podían escanearse en un escáner convencional.

3.7.3. Cuantificación de Proteínas

3.7.3.1 Método colorimétrico (BCA)

Se empleó el método BCA (Ácido Bicinonínico) para cuantificar la concentración proteica. Se usó el kit comercial “BCA Protein Assay Kit” (Pierce).

El kit aprovecha la propiedad de las proteínas de reducir el ion cúprico (Cu^{2+}) a cuproso (Cu^{1+}). El kit se sirve del ácido Bicinonínico, de color morado, para reaccionar con el ion cuproso y dar un complejo verdoso, que es detectado por colorimetría. La cantidad de ion cuproso obtenido es dependiente de la concentración de proteína.

El primer paso consistió en confeccionar una curva de concentración standard con BSA (0-40 μg). Las muestras de proteína se mezclaron con el buffer en el que estaba disuelta la proteína, hasta un volumen final de 100 μl . A este volumen se le añadió un volumen de 900 μl de mezcla de disolución comercial A (BCA) y B (Sulfato Cúprico), en una relación A:B de 50:1. La reacción se incubó 30 minutos a 37 °C y posteriormente, se midieron las absorbancias de las muestras de la curva y de la proteína a determinar, a 562 nm, en un equipo espectrofotométrico Shimadzu UV-1630. La recta patrón se confeccionó gracias a los valores de concentración y absorción de las muestras de concentración conocida (con BSA). Finalmente, se interpolaron los valores de absorción de la muestra con el fin de obtener el valor de su concentración.

Este método fue el método habitual de cuantificación proteica, empleándose sólo el Nanodrop en aquellas condiciones en las que no era necesaria una gran exactitud.

3.7.3.2. Método Espectrofotométrico

Para este tipo de cuantificación, se empleó un equipo NanoDrop200 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). Antes de realizar las mediciones sobre las muestras, es necesario conocer la masa molecular y el coeficiente de extinción molar (E) de la proteína. Una vez se dispone de ambos parámetros, se debe utilizar como solución de referencia (“blanco”) el buffer final de dilución de enzima. Tras calibrar al equipo con esta solución de referencia, se realizaron las mediciones.

Éste fue el método elegido para cuantificar TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79. Las primeras cuantificaciones sobre ambas proteínas se realizaron mediante el método BCA, pero una vez comparada la eficiencia de ambos métodos (obteniéndose resultados similares), se eligió el uso del Nanodrop debido a su sencillez y rapidez. Los valores del coeficiente de extinción molar empleados en esta cuantificación para TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79 fueron 75.525 y 63.035 $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente.

3.7.4. Ensayos de filtración en gel

Para el estudio de formación de complejos proteína-proteína o proteína-DNA, las muestras se sometieron a filtración en gel. Se cargaron 30 μL de muestra a temperatura ambiente, a un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, en una columna Superdex-200 PC 3.2/30 (GE Healthcare). La columna se equilibró previamente con el buffer de dilución final de cada proteína y la absorbancia se monitorizó a 260 y 280 nm para detectar DNA y proteína respectivamente.

3.7.5. Ensayos de actividad ATPasa

En los ensayos de actividad ATPasa se cuantificó la hidrólisis de ATP mediante el ensayo enzimático acoplado descrito por Kreuzer y Jongeneel (Kreuzer & Jongeneel, 1983) (Figura M1), con algunas modificaciones (Tato et al., 2005).



Figura M1. Esquema representativo de un ensayo enzimático acoplado. El ensayo, está basado en el método descrito por Kreuzer y Jongeneel (Kreuzer & Jongeneel, 1983) en el que están integradas dos reacciones acopladas, la de regeneración de ATP, y la de oxidación de NADH.

Este tipo de ensayo se emplea para cuantificar la actividad de hidrólisis de ATP a ADP y Pi; actividad llevada a cabo por multitud de proteínas caracterizadas como “ATPasas”. En el ensayo, el ADP producido vuelve a generar ATP, a través de la actividad de la enzima Piruvato Kinasa. Esta enzima, convierte una molécula de Fosfoenolpiruvato en Piruvato y, en el proceso, se genera una molécula de ATP a partir de otra de ADP. Una vez generado el Piruvato, éste se reduce, dando lugar a Lactato por la actividad del enzima Lactato Deshidrogenasa, también presente en la reacción. Durante la generación de Lactato, el enzima emplea una molécula de NADH, oxidándola y generando NAD⁺. Por tanto, la velocidad a la que se consume el NADH es equivalente a la velocidad a la que se consume el ATP (actividad ATPasa), y puede monitorizarse gracias al descenso de la absorbancia a 340 nm.

En esta tesis se ensayó el efecto de diferentes condiciones sobre la actividad ATPasa de cada enzima. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 150 µl, en cubetas de cuarzo atemperadas a través de un sistema Peltier, en un espectrofotómetro UV-1603 (Shimadzu). Se estudió el efecto de las variaciones de pH, la presencia de diferentes tipos de DNA e iones, etc. En todos los casos, las muestras contenían 5 mM ATP, 0,5 mM Fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM MgAc₂, 60 µg/ml de Piruvato kinasa, 60 µg/ml de Lactato deshidrogenasa, 5% (v/v) de glicerol, y por último, 50 nM de NaCl (o 50 mM de KCl). Las condiciones específicas de concentración de proteína o DNA, así como los valores de pH empleados en cada caso se detallan en la sección de Resultados.

3.7.6. Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)

Esta técnica se empleó para estudiar el reconocimiento y la afinidad de nuestras proteínas de interés por el DNA.

La proteína (en concentraciones crecientes) se incubó con una cantidad fija de DNA marcado con Fluoresceína, en un volumen final de muestra de 20 µl. La disolución tampón contenía 50 mM de buffer (Pipes para valores de pH en un rango 6,2 -7 y Tris HCl para valores de pH superiores a 7), 50 mM NaCl, 2 mM Ditiotretitol, 100 µg/ µL de Albúmina Bovina Sérica (BSA) y 5% (v/v) Glicerol. Las muestras se cargaron en un gel nativo PAGE (1x Tris-borato-EDTA). El DNA libre y los complejos núcleo-proteicos se resolvieron mediante electroforesis a 200 V, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado de los geles, se empleó un escáner de fluorescencia FUJIFILM FLA-5100. Una vez escaneado el gel, la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software ImageJ. Los cálculos sobre el porcentaje de retardo, se hicieron empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Retardo} = 100 - \left(\frac{I_{\text{banda ADN libre}}}{I_{\text{banda ADN libre de muestra sin proteína}}} \right) * 100$$

3.7.7. Ensayos de translocación

Para los ensayos de translocación, se emplearon oligonucleótidos comerciales (Sigma Genosys), marcados en ambos extremos. Para estudiar translocación en dirección 5'-3', se marcó el extremo 5' con Fluoresceína, y el extremo 3', con Biotina". Para estudiar la translocación en sentido 3'-5', ambas moléculas se dispusieron a la inversa. La presencia de fluoresceína en el DNA se usó para revelar el DNA presente en los gels, mediante un scanner de fluorescencia FUJIFILM FLA-5100. La función de la Biotina consistía en mediar la unión entre el DNA y la Estreptavidina (ThermoFisher). La unión entre la Biotina y Estreptavidina, es una de las uniones no covalentes más fuertes que existe en la naturaleza ($K_d \approx 10^{-15} \text{ M}$). De esta forma, tras incubar DNA marcado con Biotina junto a Estreptavidina, se obtiene un complejo DNA-Estreptavidina que migra de forma más lenta que la banda correspondiente al DNA libre de Estreptavidina (ver Figura M2). Cuando el motor transloca sobre DNA incubado con Estreptavidina en presencia de ATP, si es capaz de hacerlo con la suficiente fuerza, podrá separar la Estreptavidina del complejo con DNA, observándose una banda correspondiente a DNA libre de Estreptavidina.

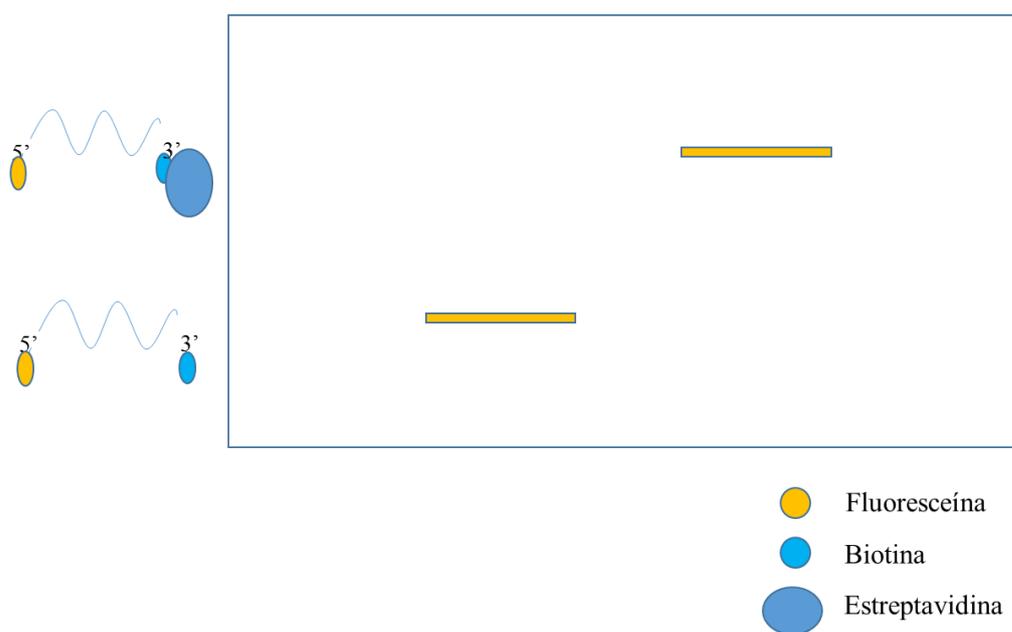


Figura M2. Representación esquemática de las diferentes movilidades del sustrato de DNA antes o después de la unión con Estreptavidina. La figura muestra la representación esquemática de un gel nativo revelado con un scanner de fluorescencia. Pueden observarse 2 bandas; la banda de la izquierda correspondería a DNA libre de Estreptavidina (marcado con Fluoresceína y Biotina), y la banda de la derecha correspondería a la muestra de DNA tras la incubación con Estreptavidina.

En el protocolo empleado, los oligonucleótidos marcados (oligos T, U, X e Y de la Tabla M5 de M&M) (5 nM) se incubaron con Estreptavidina (100 nM) a 37 °C en una disolución tampón con 50 mM Buffer (Pipes-NaOH (pH 6,2-7) o Tris HCl (pH > 7)), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) Glicerol. Una vez formado el complejo, se añadió ATP (5 mM), Biotina adicional (1 μM), y se comenzó la reacción añadiendo el enzima correspondiente en cada caso. La muestra se incubó durante 10 minutos en un volumen de reacción final igual a 20 μl. Transcurrido ese tiempo, se interrumpió la reacción mediante la adición de 20 μl de un buffer similar al anterior, con 0,1 mg/ml de Proteinasa K (ThermoFisher), 10 % (v/v) Glicerol y 0,2 % (p/v) de Azul de Bromofenol. Finalmente, se cargaron 20 μl de cada una de las muestras en un gel nativo PAGE (1x Tris-borato-EDTA). El DNA libre y los complejos Estreptavidina-DNA, se resolvieron mediante electroforesis, a 200 V durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Para el revelado de los geles, se empleó un escáner de fluorescencia tipo “FUJIFILM FLA-5100”. Como controles positivos de la actividad de translocación, se emplearon las proteínas Dda (Byrd & Raney, 2006) (dirección 5´-3´) y NS3 (Matlock et al., 2010) (dirección 3´-5´), cortesía de la Dra. Alicia Byrd.

3.7.8. Ensayos helicasa

Estos ensayos se llevaron a cabo sobre sustratos de DNA G-quadruplex intermolecular, estructurado como se describe en la Sección 3.5.2.3., a partir de oligonucleótidos marcados con Fluoresceína en el extremo 5´ (oligonucleótido U de la Tabla M5 de M&M).

La reacción se llevó a cabo en 20 μl de buffer 50 mM Pipes pH 6,2, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml de BSA, 5% (v/v) Glicerol, 5 mM de MgCl₂, 5 mM de ATP y 5 nM de sustrato de DNA. La adición de proteína (a diferentes concentraciones), se dejó para el final, marcando el inicio de la reacción.

La mezcla se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo mediante la adición de 20 μl de “Disolución Stop”, con 50 mM Pipes pH 6,2, 2,5% (p/v) de SDS, 200 mM EDTA, 10 mg/ml de Proteinasa K, 0,2 % (p/v) de Azul de Bromofenol y 10 % (v/v) Glicerol; incubando la muestra 5 minutos más, a 37 °C. Finalmente, se cargaron 20 μl de cada una de las muestras en un gel nativo PAGE (1x Tris-borato-EDTA) y se resolvieron mediante electroforesis, a 200 V, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Para el revelado de los geles, se empleó un escáner de fluorescencia FUJIFILM FLA-5100 y la intensidad de las bandas obtenidas se cuantificó con el software ImageJ. Como control positivo de actividad helicasa se empleó la proteína TrwC (Llosa et al 1996), cedida por cortesía de los Dres. Gabriel Moncalián y Sandra Sagredo.

3.8. Técnicas de análisis estructural

3.8.1. Ultracentrifugación analítica de la proteína TraB Δ 270

Esta técnica se empleó para comprobar el estado oligomérico de nuestra proteína objeto de estudio: TraB Δ 270. La muestra a analizar se obtuvo a partir de un último paso de purificación a través de un ensayo de gel filtración en una columna Superdex 200 PC 3.2.. El buffer, a diferencia del utilizado típicamente en este paso de purificación, no contenía glicerol. Los análisis fueron realizados a una concentración de enzima de 0,3 mg/ml, en buffer 50 mM Tris pH 7.5, 200 mM de NaCl, 5 mM MgCl₂ y 0.001% PMSF. Las muestras se analizaron en el Servicio de Ultracentrifugación Analítica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Se enviaron a 4°C, sin congelar. Las muestras se trataron a una velocidad de 40.000 RPM, a 20 °C, en una ultracentrífuga analítica XL-1 (Beckman-Coulter, Inc.). Se emplearon dos sistemas de detección óptica, de absorbancia a 280 nm y de interferencia de Rayleigh mediante el empleo de un rotor An-50Ti. Para la obtención de los perfiles de sedimentación se tomaron medidas cada 60 segundos. Las distribuciones del coeficiente de sedimentación fueron calculadas mediante el modelado de mínimos cuadrados de la velocidad de sedimentación, usando el método de coeficiente de sedimentación, que aplicó el programa SEDFIT 11.8.

3.8.2. Ensayos de cristalización de la proteína TraB Δ 270

Se purificó TraB Δ 270 (como se indica en la sección 3.7.1.3. de M&M) y se concentró en un último paso mediante una columna Hitrap Q 1ml (GE) en buffer 50 mM Tris HCl pH 7,5, 400 mM NaCl 0,001% (p/v) PMSF y 5% (v/v) Glicerol. Se cuantificaron las fracciones de enzima mediante un espectrofotómetro NanoDrop200 UV-Vis y se eligieron alícuotas de una fracción a una concentración de 18 mg/ml.

Los ensayos de cristalización se desarrollaron en placas de 96 pocillos (Hampton), utilizando el kit JCSG-plus HT-96 (Molecular Dimensions), mediante el método de difusión de vapor y la técnica de “gota sentada”. Cada pocillo contenía un espacio para la disolución precipitante y una pequeña plataforma para la mezcla de proteína (18 mg/ml) y precipitante. Como disoluciones precipitantes, se emplearon las diluciones presentes en los 2 kits de cristalización de JCSG-plus HT-96 (Molecular Dimensions). Estos dos kits, se emplearon como una primera aproximación. En cada pocillo de las placas de cristalización, se dispuso un volumen de 50 μ l de cada agente precipitante. Y en cada plataforma de los pocillos, se dispuso una gota de 2 μ l de precipitante y proteína, mezclados en una relación 1:1. Una vez dispuestos los precipitantes en los pocillos, y las gotas de precipitante-proteína en las plataformas, se sellaron las placas. A medida que se evaporó el agua en la plataforma, para equilibrar la presión de vapor entre ambas soluciones, fue aumentando la concentración de precipitante, y también de proteína. El aumento gradual en la concentración de precipitante y proteína, favoreció la constitución de núcleos de cristalización en algunos casos, dando lugar a pequeños cristales. Se obtuvieron cristales a 12 % de PEG, 0,1 M de Cacodilato de Sodio, y 0,1 M de Acetato Cálcico, incubando la muestra a 22 °C.

Una vez tanteadas las condiciones de cristalización mediante los kits de cristalización de Hampton, se emplearon otras placas de 24 pocillos, también tipo Hampton. Cada uno de esos pocillos, contenía una ligera variación sobre las condiciones óptimas observadas en la placa de screening inicial (ver sección 4.2.2.1. de Resultados). Con estas placas, se pretendió afinar las condiciones de cristalización, y obtener cristales de mayor calidad.

3.8.3. Microscopía electrónica

Para microscopía electrónica, se emplearon muestras de proteína recién purificada, sin congelar. Con el fin de trabajar con una muestra de proteína homogénea y monodispersa, se seleccionó una de las fracciones del pico de elución de elevada masa molecular, correspondiente a un estado oligomérico superior a monómero (ver sección 4.2.1.1. de Resultados). La muestra se cuantificó y diluyó a una concentración de 0,1-0,5 mg/ml y se aplicó sobre una rejilla de cobre cubierta con carbono (grafito), que fue previamente activado mediante radiación de plasma. El dispositivo empleado para la activación del carbono fue un Glow-discharge (Emitech K100X). Finalmente, las muestras aplicadas sobre el carbono activado, se tiñeron con 2 % (p/v) de Acetato de Uranilo, incubándose con él durante 1-2 minutos. Posteriormente, se acercó a un borde de la rejilla un poco de papel de filtro tipo “Whatman”, con el que se retiró la dilución de Acetato de Uranilo por capilaridad. Se aplicaron varios microlitros de agua destilada sobre la rejilla, y se retiraron de nuevo gracias al papel de filtro. Esta última operación se repitió dos veces más y, con ello, la muestra quedó lista para microscopía electrónica.

Las imágenes se tomaron en la Unidad de Microscopía del IDIVAL (Instituto de Investigación Marques de Valdecilla, Cantabria). Se grabaron en una cámara Gatan ORISUS SC 1000 CCD, bajo una magnificación nominal de 120.000 x, en un microscopio electrónico tipo JEOL-Jem-1011 EX-II a 100 KV. Las micrografías se obtuvieron a una resolución final de 2.462 px/ μ m.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. Caracterización Bioquímica de TraB

TraB es la proteína responsable de la transferencia del plásmido pSVH1 en el proceso conjugativo de *Streptomyces venezuelae* (Vogelmann et al., 2016). Utilizando la energía derivada de la hidrólisis de ATP, es capaz de transferir el plásmido conjugativo en forma de cadena doble de DNA. Para ello, reconoce una secuencia específica en el plásmido [secuencia TRS (GACCCGGA)], ubicada en una región de unas 200 pb, llamada región *clt*. El motor se anclaría a la membrana bacteriana como un hexámero, formando un poro de aprox. 3.1 nm, a través del cual el dsDNA del plásmido pSVH1 es transferido a la célula receptora (Vogelmann et al., 2011).

Este mecanismo de conjugación es interesante porque, a diferencia del resto de sistemas conjugativos entre bacterias, transfiere dsDNA (Thoma et al., 2015). Siendo un mecanismo conjugativo, presenta una gran similitud con el mecanismo de división celular bacteriano, en el que también se transfiere el DNA cromosómico a la célula hija a través del motor molecular FtsK (Löwe et al., 2008) (Massey et al., 2006). Ambos sistemas presentan ciertas similitudes con el sistema de transferencia de ssDNA en el mecanismo conjugativo entre bacterias gram negativas a través del motor molecular TrwB (Matilla et al., 2010). De esta forma, nos propusimos analizar y comparar la actividad de los tres motores implicados en los tres procesos.

En el caso de TrwB, la presencia de G-quadruplex estimula la afinidad de esta proteína por el DNA, aumentándola 100 veces. Además, favorece la hexamerización de la enzima. Nuestra hipótesis inicial fue que un fenómeno idéntico pudiera suceder con FtsK y TraB; siendo ambas proteínas dependientes de las secuencias de DNA KOPS y TRS, respectivamente (Sivanathan et al., 2006)(Thoma et al., 2012). Ambas secuencias consisten en fragmentos de DNA de 8 bases ricos en GCs, cuya repetición consecutiva estimula la afinidad de ambas enzimas. Analizando estas secuencias se puede constatar que la repetición consecutiva de cualquiera de ellas genera fragmentos de DNA cuya secuencia cumple con la secuencia consenso de formación de G-quadruplex intramolecular ($G_{3-5}, N_{1-3}, G_{3-5}, N_{1-3}, G_{3-5}, N_{1-3}, G_{3-5}$) (Xu et al., 2008). La secuencia KOPS no sólo funciona como un sitio de carga. Además, indica a FtsK en qué orientación debe ensamblarse en torno al dsDNA cromosómico. Se ha demostrado que varias secuencias KOPS consecutivas estimulan la interacción con dsDNA de forma más efectiva (Sivanathan et al., 2006) y, este hecho, nos induce a pensar que FtsK puede estar reconociendo no sólo secuencia, sino también, estructuras del tipo G-quadruplex. Del mismo modo, está demostrado que varias secuencias TRS consecutivas sobre dsDNA estimulan mejor la capacidad de reconocimiento de TraB (Vogelmann et al., 2011). Mediante el estudio comparativo de los 3 motores, se pretendía demostrar la implicación de la estructura G-quadruplex en la regulación de su mecanismo molecular, tal como se había demostrado para TrwB (Matilla et al., 2010).

Así como la actividad de FtsK y TrwB ha sido caracterizada, no es el caso de TraB. Reuther y colaboradores (2006) analizaron la actividad ATPasa de la proteína, pero los valores obtenidos eran muy bajos y no observaron dependencia de DNA; algo que no se

esperaba según el papel asignado a esta proteína. Por este motivo, en este trabajo nos propusimos llevar a cabo una exhaustiva caracterización de la actividad de esta proteína.

4.1.1. Sobreexpresión y Purificación de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79

TraB posee tres dominios: un dominio N-terminal de unión a membrana, un dominio motor con actividad ATPasa que presenta una gran homología con el dominio motor de FtsK y TrwB, y por último, un dominio “winged hélix-turn-helix” (WHTH) o dominio γ , de reconocimiento de la secuencia GACCCGGA (Vogelmann et al., 2011).

Debido a la dificultad que supone trabajar con una proteína integral de membrana, en esta tesis se proyectó construir un mutante con el dominio N-terminal deletado, TraB Δ N270. Así mismo, se decidió construir un mutante similar al anterior, con una deleción del dominio WHTH de reconocimiento de secuencia (Figura R1). Con ambos mutantes, se podrían realizar ensayos en paralelo y caracterizar la forma en que el dominio de reconocimiento de TraB modula la actividad del enzima.

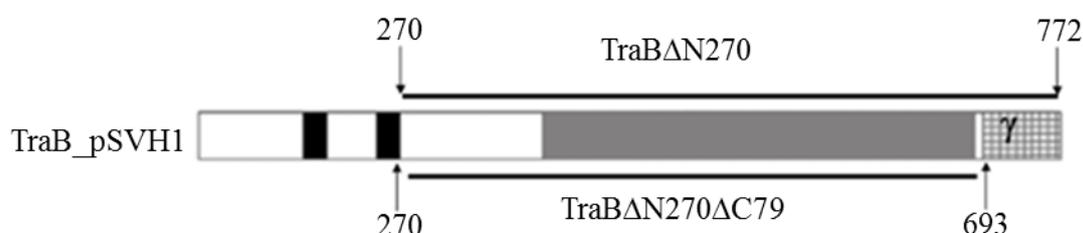


Figura R1. Representación esquemática de TraB procedente del plásmido pSVH1 de *Streptomyces*. Las barras negras representan las hélices transmembrana de la región N-terminal, utilizando el programa de predicción de estructura TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0). El dominio motor se representa en gris oscuro, y el dominio C-terminal, (dominio γ), se representa en cuadrícula gris. El mutante TraB Δ N270 consiste en una deleción de los primeros 270 residuos de TraB, que contiene el dominio transmembrana. El mutante TraB Δ N270 Δ C79 contiene, además de la deleción de la región transmembrana, una deleción de los últimos 79 residuos de la región C-terminal, que constituyen el dominio γ .

Tal y como se indica en la sección 3.5.1. (M&M), el clonaje de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79 se llevó a cabo en el vector pET28a, que permitía la inserción de un tag de histidinas en el extremo N-terminal, facilitando su purificación. Se empleó el método de purificación descrito en la sección 3.7.1.3. (M&M) para ambas proteínas.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en el proceso de purificación de TraB Δ N270. En la Figura R2 se muestra un gel al 12 % de acrilamida con las diferentes fracciones obtenidas tras el empleo de la primera columna usada en esta purificación, una columna Histrap HP 5ml (Healthcare).

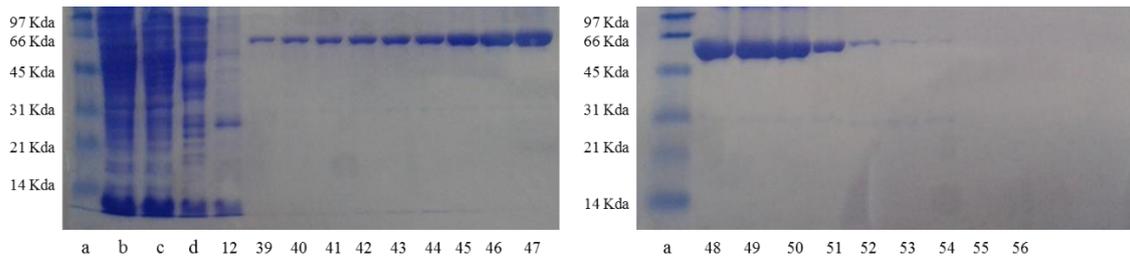


Figura R2. Fracciones de TraB Δ N270 obtenidas tras el primer paso de purificación. Ambos geles muestran las fracciones obtenidas tras emplear una columna de afinidad HisTrap HP 5ml (GE Healthcare), con un gradiente de Imidazol de 0 a 500 mM. (a), patrón de pesos moleculares “SDS-PAGE Standards, Low Range” (Biorad). (b), sobrenadante obtenido tras lisar y centrifugar las células (5 μ l). (c) y (d), fracciones que recogen la proteína no unida a la columna y la obtenida tras el lavado de la misma (5 μ l). El resto de fracciones (12 -56), corresponden a fracciones seleccionadas sobre el perfil de elución.

Tras emplear la columna de afinidad HisTrap HP de 5ml, se seleccionaron las fracciones libres de contaminantes, (39 - 51), y se cargaron en una columna Hitrap Q HP 1 ml (GE Healthcare). El propósito del uso de esta columna era aprovechar este paso de purificación para concentrar la muestra. A continuación, en la Figura R3, se muestra un gel de acrilamida al 12 % con las fracciones obtenidas:

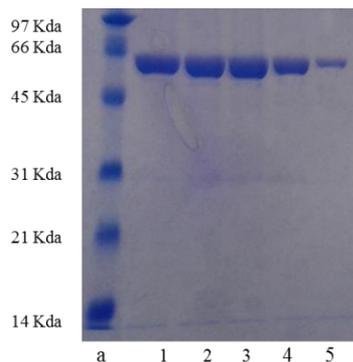


Figura R3. Fracciones de TraB Δ N270 obtenidas mediante el empleo de una columna de intercambio iónico Hitrap Q HP 1ml (Healthcare). (a), patrón de pesos moleculares “SDS-PAGE Standards, Low Range” (Biorad). El resto de fracciones (1 - 5), corresponden a fracciones seleccionadas sobre el perfil de elución.

Para la purificación de TraB Δ N270 Δ C79, se empleó el mismo protocolo de purificación. Ambas proteínas (TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79), con una masa molecular de 56,56 y 48,04 KDa, respectivamente, se obtuvieron en gran cantidad (aproximadamente 10 mg en cada purificación) y libres de contaminantes, tal y como se observa en la Figura R4:

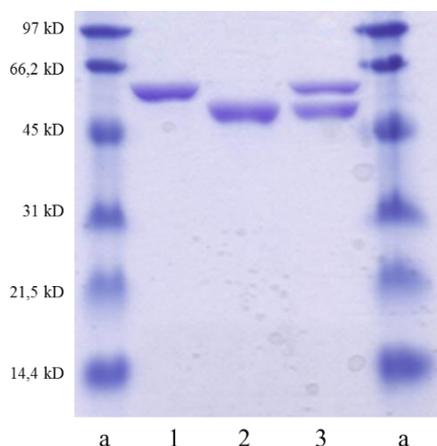


Figura R4. Electroforesis en gel SDS acrilamida (12%) de las proteínas TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79. La muestra (a) corresponde al patrón de pesos moleculares “SDS-PAGE, Standards, Low Range”(Biorad). Las calles 1, 2 y 3 corresponden a TraB Δ N270 (2 μ g), TraB Δ N270 Δ C79 (2 μ g), y una mezcla de 1 μ g de cada una de las dos proteínas, respectivamente.

4.1.2. Análisis de la Actividad ATPasa

4.1.2.1. Actividad ATPasa dependiente de DNA

TraB es un motor molecular hexamérico, capaz de transferir DNA de doble cadena en el proceso conjugativo de *Streptomyces* (Sepulveda et al., 2011). El proceso es dependiente del consumo de ATP. Sin embargo, hasta la fecha, no se había llevado a cabo una caracterización exhaustiva de la actividad ATPasa de este motor ni un análisis de los factores que determinan esta actividad. Únicamente se habían descrito valores muy bajos de actividad, que resultaban incompatibles con el gran consumo de ATP que un motor de este tipo debe tener para poder transferir el plásmido completo a una bacteria receptora (Reuther et al., 2006). En estos mismos ensayos, se determinó además que la actividad de este motor no era dependiente de DNA (Reuther et al., 2006). Por este motivo, en esta tesis decidimos probar diferentes condiciones de ensayo y analizar la actividad de la proteína bajo diferentes parámetros.

En un medio ligeramente ácido (50 mM Pipes pH 6.2, 35 mM NaCl, 5 mM MgAc₂, 5 % glicerol, 0,5 mM Fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM ATP, 60 μ g/ml de Piruvato Kinasa, 60 μ g/ml de Lactato Deshidrogenasa), TraB Δ N270 presentaba una actividad basal de 4.200 nmol ATP hidrolizados por minuto y miligramo de proteína. Estos valores de hidrólisis, diferían mucho del valor previamente publicado (800 nmol ATP * min⁻¹ * mg⁻¹) (Reuther et al., 2006). Probablemente, la diferencia se debe al valor del pH del medio. Los valores descritos por Reuther y cols. fueron obtenidos a valores altos de pH (pH 8).

Posteriormente, y con el fin de comprobar una posible dependencia de DNA, se eligieron dos oligonucleótidos de 45 bases (oligonucleótidos E y H de la Tabla M5 de M&M). El oligonucleótido E no presentaba secuencia específica ni capacidad para formar estructura secundaria. El segundo oligonucleótido elegido fue el complementario del anterior (oligonucleótido H). Ambos oligonucleótidos se hibridaron mediante el protocolo de formación de DNA de doble cadena, descrito en la Sección 3.5.2.1. (M&M). El resultado fue un DNA doble cadena, de 45 bases, sin secuencia específica. De esta forma, se dispuso de 2 sustratos de DNA, un DNA de cadena simple (el oligonucleótido E) y un DNA de cadena doble (oligos E y H hibridados). Los resultados de actividad ATPasa obtenidos en presencia de estos dos sustratos pueden observarse a continuación, en la Figura R5.

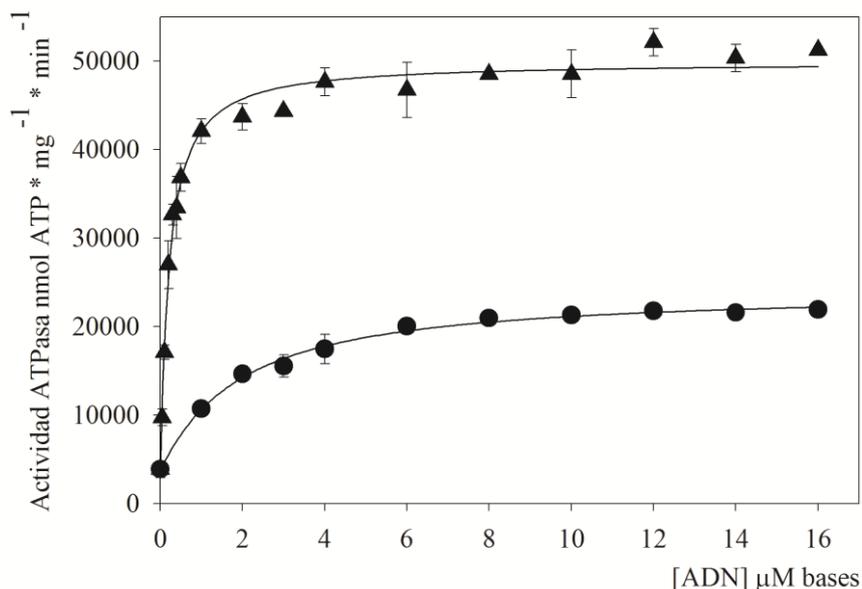


Figura R5. Actividad ATPasa de TraB Δ N270 sobre DNA de cadena sencilla (●) y DNA de cadena doble (▲). Para el ensayo se empleó un buffer ATPasa con 50 mM Pipes pH 6,2, 35 mM NaCl, 5 mM MgAc₂, 5% (v/v) de Glicerol, 0,5 mM Fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM ATP, 60 $\mu\text{g/ml}$ de Piruvato Kinasa, 60 $\mu\text{g/ml}$ de Lactato Deshidrogenasa y 50 nM de TraB Δ N270.

Los resultados indican claramente que la actividad ATPasa de la proteína es dependiente de la concentración de DNA. Además, el sustrato de DNA de doble cadena estimula mejor la actividad ATPasa de la proteína, lo cual refleja la actividad de esta proteína *in vivo*, implicada en transferir dsDNA. En presencia de este sustrato, la proteína alcanza un valor de actividad de 50.000 $\text{nmol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

4.1.2.2. Actividad ATPasa dependiente del valor de pH

Al igual que ocurre con otros parámetros, la actividad de estos motores suele presentar una elevada dependencia de los valores de pH. La actividad tan baja de TraB descrita previamente (Reuther et al., 2006), fue analizada a un valor de pH de 8, de forma que nos planteamos si tal discrepancia al comparar los resultados podría deberse a los valores de pH en los que se había ensayado la actividad. Así, caracterizamos la actividad de la proteína a diferentes valores de pH.

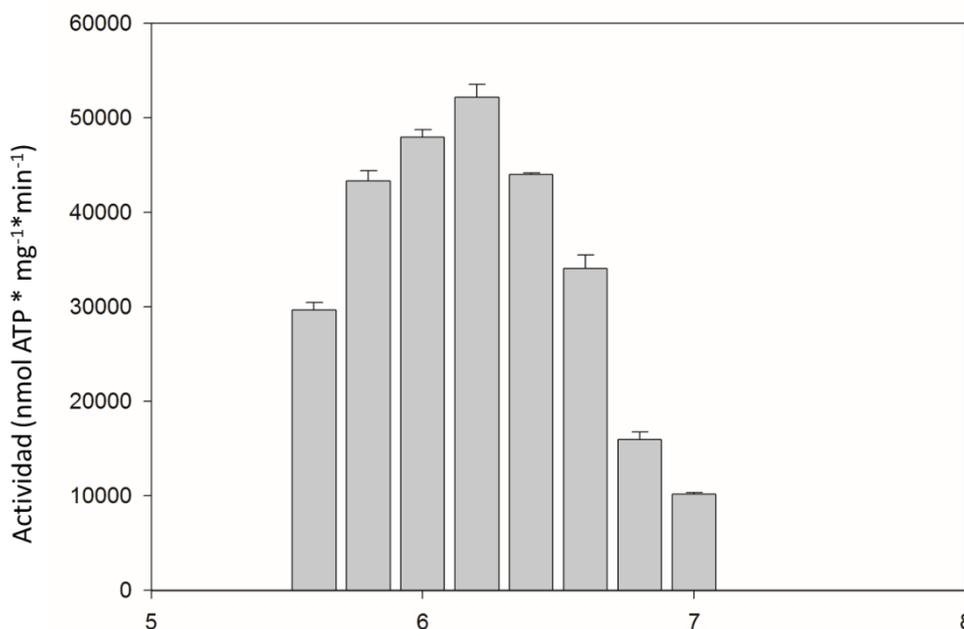


Figura R6. Actividad ATPasa de TraBΔN270 a diferentes valores de pH. Se empleó una concentración de 50 nM de TraBΔN270 y un sustrato de DNA doble cadena de 45 bases (12 μM pb) (oligos E Y H de la Tabla M5 de M&M). El buffer de reacción contenía 50 mM de buffer Mes o Pipes en función del rango de pH estudiado (Mes en el rango 5,8-6,2 y Pipes en el rango 6,4-7,0), 50 mM NaCl, 5 mM de MgCl₂, 5mM ATP, 0,5 mM fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM ATP, 60 μg/ml de piruvato kinasa, 60 μg/ml de lactato deshidrogenasa y 5% (v/v) de glicerol.

Tal y como muestra el histograma, el valor óptimo de pH fue 6,2. A ese valor, y en presencia de dsDNA, la actividad alcanzaba un valor de 55.000 nmol ATP*min⁻¹*mg⁻¹. La actividad de la proteína descendía mucho a valores crecientes de pH, de forma que a valores superiores a 7 la proteína presentaba muy poca actividad. Estos datos explican perfectamente la discrepancia de nuestros resultados frente a los valores publicados por Reuthers et al. (2006).

A partir de este momento, éste fue el valor de pH elegido para seguir evaluando la influencia del resto de parámetros en la actividad de la proteína.

4.1.2.3. Actividad ATPasa dependiente de Mg²⁺ y otras sales

La actividad ATPasa en la familia de motores RecA/AAA⁺ es dependiente de ATP y Mg²⁺ (Qian et al., 2007)(Lusetti et al, 2003). Por ello, con el fin de caracterizar la actividad de la proteína y encontrar los parámetros óptimos de actividad, se ensayó la actividad de la misma en función de cantidades crecientes de Mg²⁺. Los resultados obtenidos se muestran a continuación, en la Figura R7:

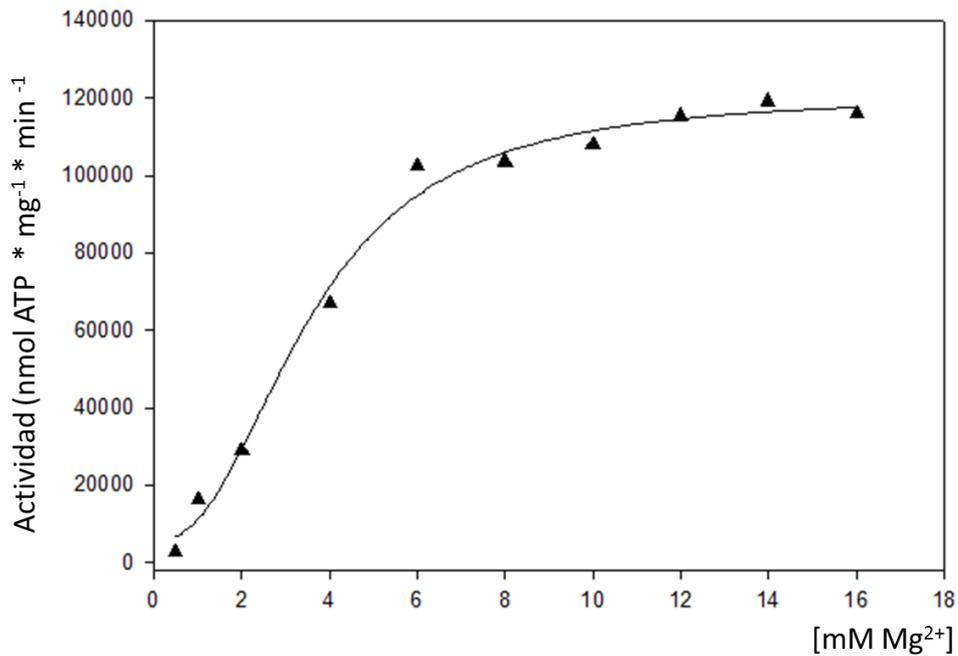


Figura R7. Actividad ATPasa de TraBΔN270 frente a concentraciones crecientes de Magnesio. El buffer de reacción consistía en 50 mM Mes pH 5,8, 50 mM KCl, 5 mM ATP, 0,5 mM Fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM ATP, 60 μg/ml de Piruvato kinasa, 60 μg/ml de Lactato Deshidrogenasa, 5% (v/v) de glicerol, 50 nM de TraBΔN270, 12 μM_{pb} de DNA doble cadena de 45 bases, y concentraciones crecientes de MgCl₂.

Tal y como muestra la gráfica, la actividad de TraBN270 es dependiente de Magnesio, pero a partir de una concentración de 5-6 mM, se alcanza el óptimo de actividad. La actividad observada era más elevada que la previamente obtenida. La diferencia fundamental fue la sustitución de una sal de Na⁺ por una de K⁺, por lo que se decidió analizar también la influencia de estas sales en la actividad de la proteína.

Al igual que ocurre con el Magnesio, la actividad de la proteína puede verse afectada por la presencia de otras sales. De esta forma, se decidió evaluar la actividad en presencia de 50 mM de NaCl ó KCl bajo diferentes valores de pH.

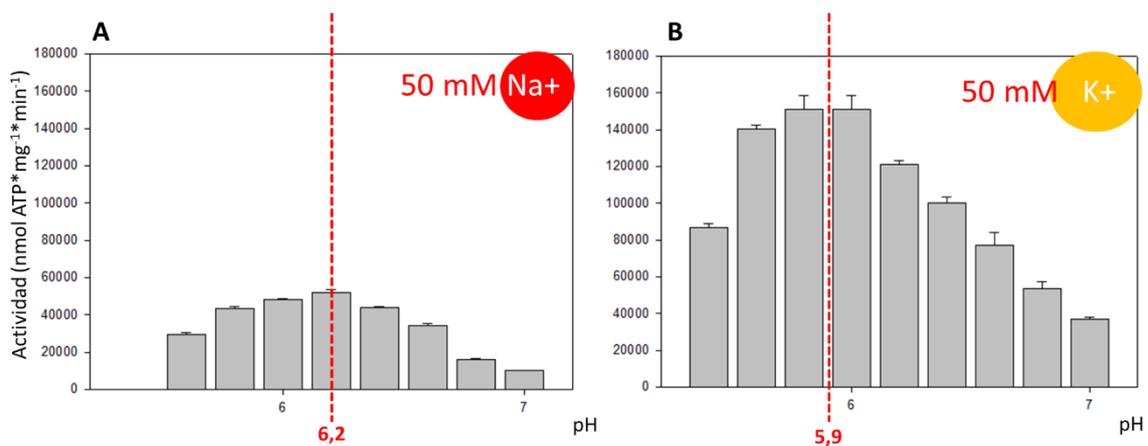


Figura R8. Ensayo ATPasa de TraBΔN270 frente a diferentes valores de pH, empleando NaCl (panel A) o KCl (panel B). El buffer contenía TraBΔN270 (50 nM), DNA doble cadena de 45 bases (12 μM pb) (oligos hibridados E y H de la Tabla M5 de M&M), 50 mM del tampón elegido según el valor de pH estudiado (Mes en el rango 5,8-6,2 y Pipes en el rango 6,4-7,0), 5 mM ATP, 0,5 mM Fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM MgAc₂, 5 mM ATP, 60 μg/ml de Piruvato kinasa, 60 μg/ml de Lactato deshidrogenasa, 5% (v/v) de glicerol, y, por último, 50 nM de NaCl (panel A) o 50 mM de KCl (panel B).

Los resultados obtenidos indicaban de nuevo una dependencia del pH sobre la actividad ATPasa y, a su vez, una dependencia del tipo de sal empleada. Cuando el sodio era sustituido por potasio en la reacción, los valores de hidrólisis de ATP se duplicaban, y el óptimo de pH se desplazaba a un valor de 5,9.

4.1.2.4. Actividad ATPasa dependiente de la secuencia y estructura del DNA

Tras demostrar que la actividad ATPasa en TraB era dependiente de DNA y optimizar las condiciones de ensayo, se ensayó la actividad de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 (sin dominio γ) frente a diferentes sustratos de DNA.

Con estos experimentos, se pretendía comprobar si el dominio γ, y también las secuencias TRS del plásmido pSVH1, estaban implicadas en modular la actividad del motor. Estudios previos con la proteína SpoIIIE, perteneciente a la misma familia que TraB (RecA ATPasas), demostraron que esta proteína reconocía específicamente secuencias de DNA a través de su dominio γ. Además, este reconocimiento inducía cambios estructurales transmitidos desde el dominio γ al dominio motor, modulando la actividad de la enzima y orientándola sobre la secuencia de DNA (Besprozvannaya et al., 2013).

En este estudio se emplearon sustratos de DNA de 65 bases. Los sustratos con secuencia específica contenían parte de la secuencia *clt* del plásmido pSVH1, incluyendo 3 secuencias TRS. Dicha secuencia fue analizada previamente con el programa de predicción de estructura QGRS mapper (Kikin et al, 2006) y resultó ser una buena candidata para la formación de estructuras G-quadruplex. Por ello, decidimos analizar también un sustrato rico en “G” capaz de formar estructuras G-quadruplex intramoleculares. Entre los sustratos dsDNA analizados, además del fragmento con la secuencia *clt*, se analizaron también sustratos dsDNA que contenían tres copias consecutivas de las secuencias TRS de 8 pb implicadas en el reconocimiento por el dominio γ (Vogelmann et al., 2011). Estas secuencias se colocaron en orientaciones distintas con el fin de comprobar si la actividad ATPasa del motor asociada a la translocación variaba en función de si el motor reconocía la secuencia específica en dirección 5´-3´o bien la inversa, 3´-5´. A continuación, se muestra una figura con un esquema de la disposición de las secuencias TRS en los diferentes sustratos empleados

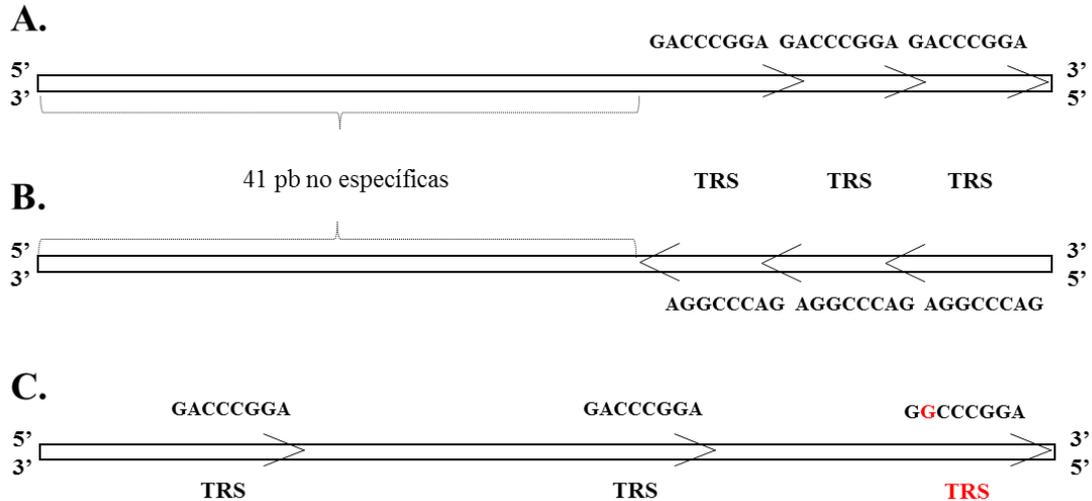


Figura R9. Representación esquemática de los sustratos dsDNA de 65 pares de bases con secuencias TRS utilizados en este estudio. (A), dsDNA formado a partir de la hibridación de los oligonucleótidos LL y NN (Tabla M5 M&M). Este fragmento dispone de 3 secuencias TRS consecutivas orientadas en dirección 5' – 3'. (B), dsDNA formado a partir de la hibridación de los oligonucleótidos OO y QQ (Tabla M5 M&M) . Dispone de 3 secuencias TRS consecutivas orientadas en dirección 3' – 5'. (C), dsDNA con secuencia procedente de un fragmento de la región *clt* del plásmido pSVH1. Elaborado a partir de la hibridación de los oligonucleótidos HH y JJ (Tabla M5 de M&M). Dispone de 3 secuencias TRS dispersas con orientación 5' – 3' pero una de ellas es una secuencia imperfecta (contiene un cambio de una base en relación a la secuencia TRS, tal y como es la secuencia en el plásmido).

A continuación, en el panel A de la Figura R10, se representa una tabla con los 8 sustratos de DNA empleados para el ensayo ATPasa, y en el panel B, los resultados de actividad ATPasa obtenidos con cada uno de ellos.

A

Substratos	Descripción
1	ssDNA de secuencia inespecífica (Oligonucleótido DD)
2	ssDNA con secuencia "clt" (Oligonucleótido HH)
3	ssDNA con secuencia complementaria a "clt" (Oligonucleótido JJ)
4	dsDNA de secuencia inespecífica (Oligonucleótido DD hibridado con FF)
5	dsDNA con secuencia 3xTRS dirección 5'-3' (Oligonucleótido LL hibridado con NN)
6	dsDNA con secuencia 3xTRS dirección 3'-5' (Oligonucleótido OO hibridado con QQ)
7	dsDNA con secuencia "clt" (Oligonucleótido HH hibridado con JJ)
8	G4-DNA intermolecular (Oligonucleótido RR formando estructura G4 intermolecular)

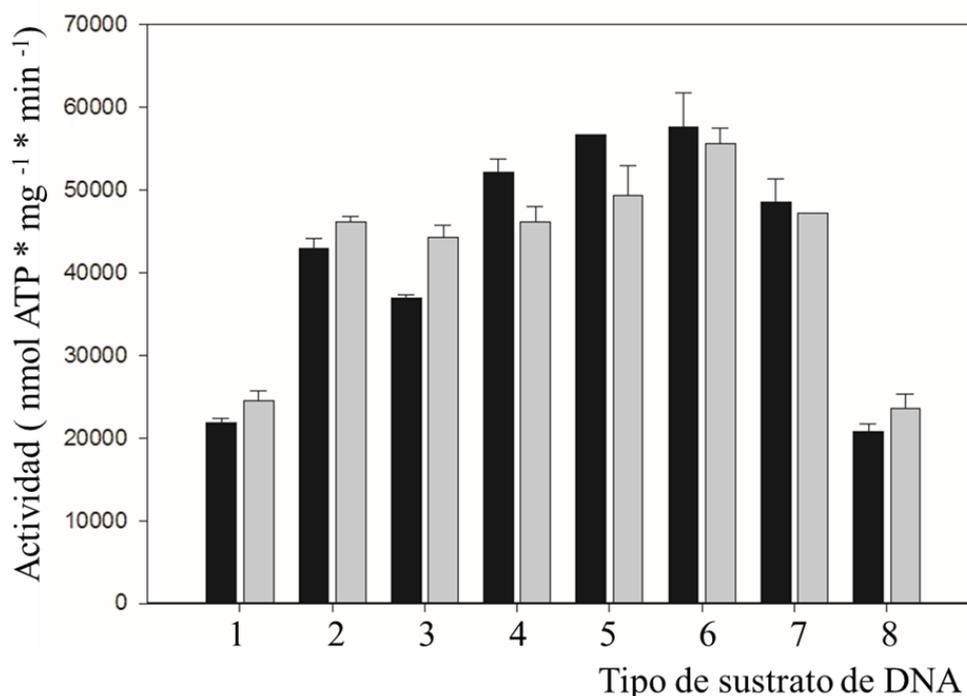
B

Figura R10. Actividad ATPasa de TraBAN270 y TraBAN270ΔC79 frente a diferentes sustratos de DNA de 65 bases. En el panel A, se representan los 8 sustratos de DNA empleados para el ensayo ATPasa (sustratos 1-8). Los oligonucleótidos empleados para la formación de los 8 sustratos, son los reflejados en la Tabla M5 (M&M). En el panel B, se representa la actividad ATPasa de TraBAN270 (barras negras) y TraBAN270ΔC79 (barras grises) frente a estos 8 sustratos. Se empleó una concentración de 50 nM de TraBAN270, frente a los diferentes sustratos de DNA, a una concentración final 12 μM de bases o pares de bases. El buffer de reacción contenía 50 mM Mes pH 6,2, 50 mM NaCl, 5 mM de Cl₂Mg, 5mM ATP, 0,5mM fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM ATP, 60 μg/ml de piruvato kinasa, 60 μg/ml de lactato deshidrogenasa y 5 % (v/v) de glicerol. Las barras de error representan la desviación estándar en una media de 5 experimentos.

Tal y como muestra la figura, se observó que la presencia del dominio γ no producía ningún efecto significativo sobre la actividad ATPasa de TraB; al menos en presencia de los sustratos de DNA mostrados en la tabla. Con estos experimentos, podemos concluir que la actividad ATPasa de TraBN270 observada depende exclusivamente del dominio

motor. La ausencia del dominio γ no parece afectar a la actividad de TraB. Contrariamente a lo observado con la proteína SpoIIIA de la misma familia (Besprozvannaya et al., 2013), la presencia del dominio γ no incrementa los valores de hidrólisis de ATP en presencia de su sustrato específico (secuencias TRS en tándem o secuencia *clt* del plásmido conteniendo las secuencias TRS en el mismo orden en el que se encuentran en el plásmido pSVH1). La actividad ATPasa observada con los sustratos de DNA de doble cadena con y sin secuencia específica (sustratos 4 y 7, respectivamente) fue similar en ambos casos. Es importante destacar la capacidad de la secuencia *clt* para estimular la actividad ATPasa de TraB al emplear sustratos de DNA de cadena sencilla. Cuando se empleaban sustratos de DNA de cadena sencilla con esta secuencia, los valores de actividad fueron prácticamente similares a los valores de actividad con DNA de cadena doble.

Estos mismos ensayos fueron llevados a cabo con oligonucleótidos 45-mer con las mismas secuencias sin observarse diferencias significativas en relación a los resultados obtenidos con los sustratos de 65 bases.

4.1.3. Ensayos de unión a diferentes sustratos de DNA

TraB une secuencias específicas de 8 pb (TRS) en la región *clt* del plásmido pSVH1 a través del dominio γ (Vogelmann et al., 2011). Sin embargo, los datos obtenidos en la sección anterior no mostraron variaciones en la estimulación de la actividad ATPasa de TraB en presencia de este dominio. Por este motivo, se decidió caracterizar la interacción de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79 con diferentes sustratos de DNA.

Ensayos de unión a ssDNA inespecífico de 45 bases

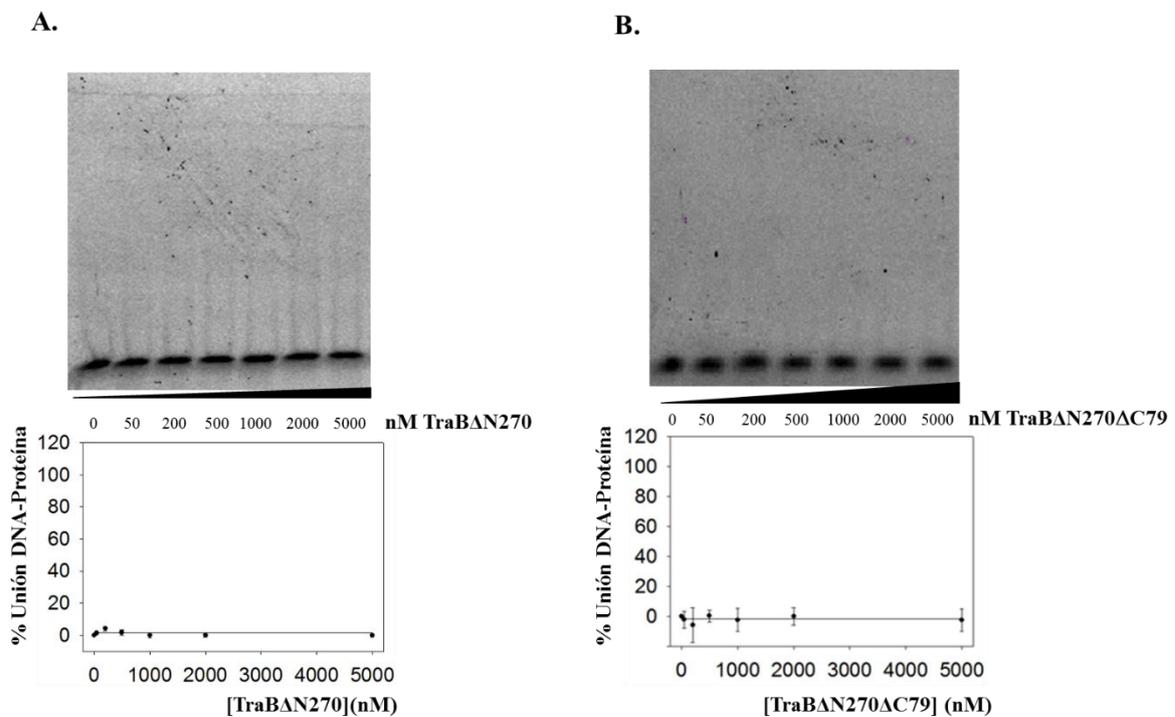


Figura R11. Ensayo de interacción de TraBAN270 y TraBAN270 Δ C79 con ssDNA de 45 bases de secuencia inespecífica. En los paneles A y B se exponen los resultados obtenidos para TraBAN270 y TraBAN270 Δ C79, respectivamente. Se empleó un buffer

50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol, en el que se incubó el oligonucleótido F (Tabla M5 de M&M) a una concentración 5 nM con concentraciones crecientes de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79.

Tal y como muestra la Figura R11, en las condiciones ensayadas no se observó interacción de TraBΔN270 o TraBΔN270ΔC79 con este sustrato de DNA de cadena sencilla de 45 bases.

Ensayos de unión a dsDNA inespecífico de 45 bases

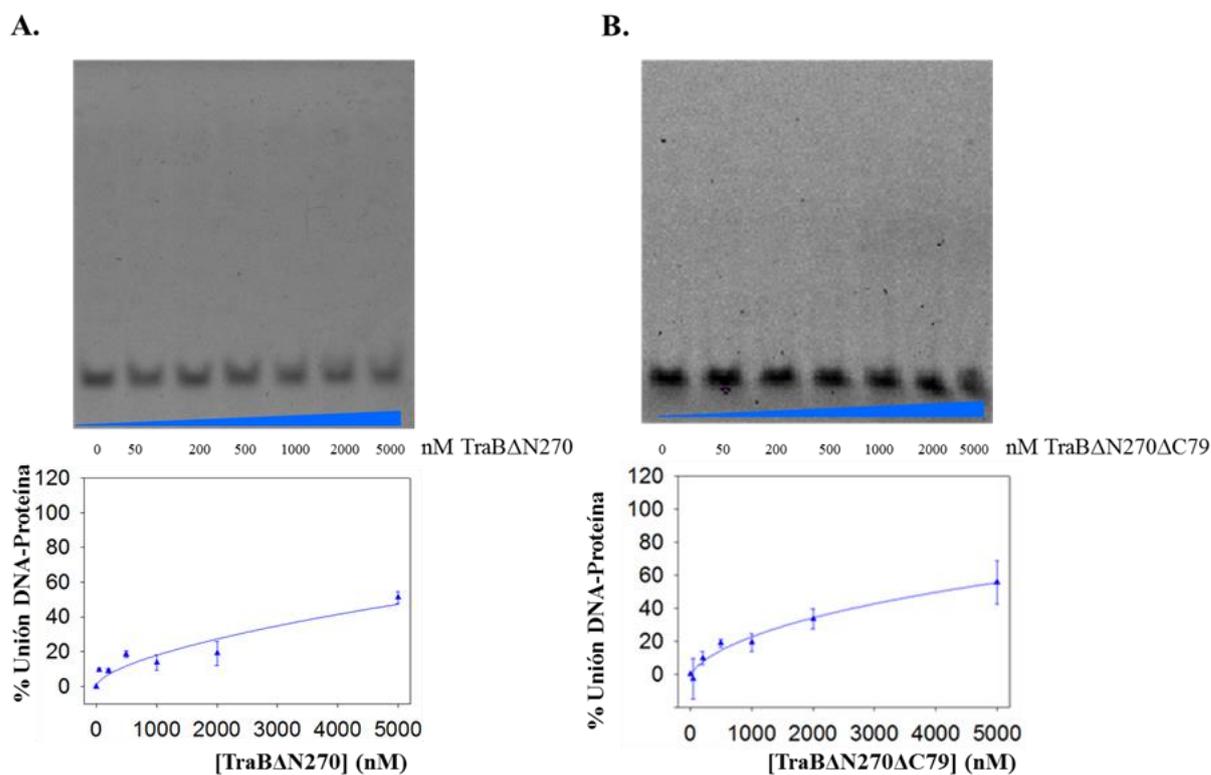


Figura R12. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a dsDNA de 45 bases de secuencia inespecífica. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol, en el que se incubó el sustrato dsDNA de secuencia inespecífica (resultado de la hibridación de los oligonucleótidos F y H de la Tabla M5 de M&M), a una concentración 5 nM, con concentraciones crecientes de TraB con y sin dominio γ .

Tal y como era de esperar, TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 interactuaban con el DNA doble cadena inespecífico con una afinidad muy baja. En ausencia de ninguna secuencia TRS, el dominio γ no inducía ningún efecto sobre la interacción de TraB con el DNA.

Ensayos de unión a dsDNA de 45 bases con tres repeticiones en tándem de la secuencia TRS en dirección 5' - 3'

Para este ensayo, se empleó un sustrato dsDNA de 45 bases con la secuencia “TRS” GACCCGGA, repetida tres veces en tándem, y orientada en dirección 5' - 3' formado a partir de la hibridación de los oligonucleótidos O y P (Tabla M5 M&M)

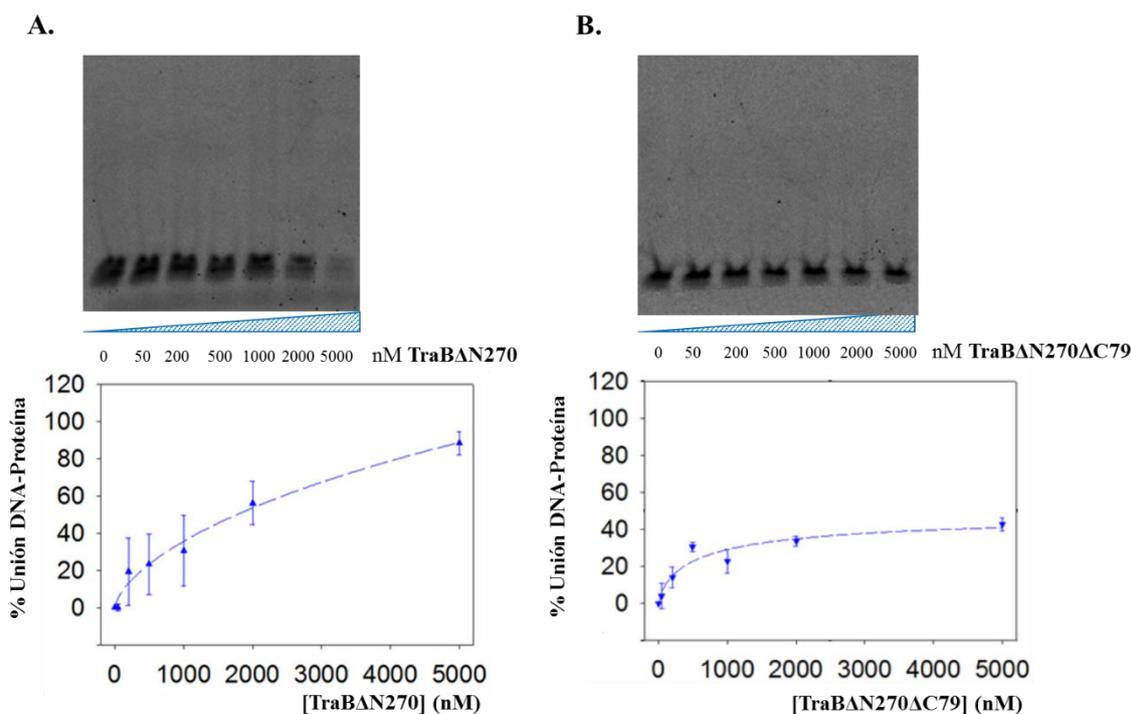


Figura R13. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a dsDNA de 45 bases con tres repeticiones de la secuencia TRS en dirección 5'-3'. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol, en el que se incubó el sustrato dsDNA con secuencias TRS orientadas en dirección 5'-3' (elaborado hibridando los oligonucleótidos O y P de Tabla M5 M&M) a una concentración 5 nM y concentraciones crecientes de TraB con, y sin dominio γ .

Según los resultados obtenidos, el dominio γ favorecía la interacción de TraB con el sustrato de DNA doble cadena en presencia de la secuencia TRS. Para TraBΔN270 se obtuvo un valor de $k_d = 1,8 \mu\text{M}$ y para TraBΔN270ΔC79 una $k_d > 5 \mu\text{M}$.

Ensayos de unión a dsDNA de 45 bases con tres repeticiones en tándem de la secuencia TRS en dirección 3'-5'

Para este ensayo, se empleó sustrato dsDNA de 45 bases con la secuencia “TRS” GACCCGGA, repetida tres veces en tándem, y orientada en dirección 3' - 5', formado a partir de la hibridación de los oligonucleótidos R y S (Tabla M5 M&M).

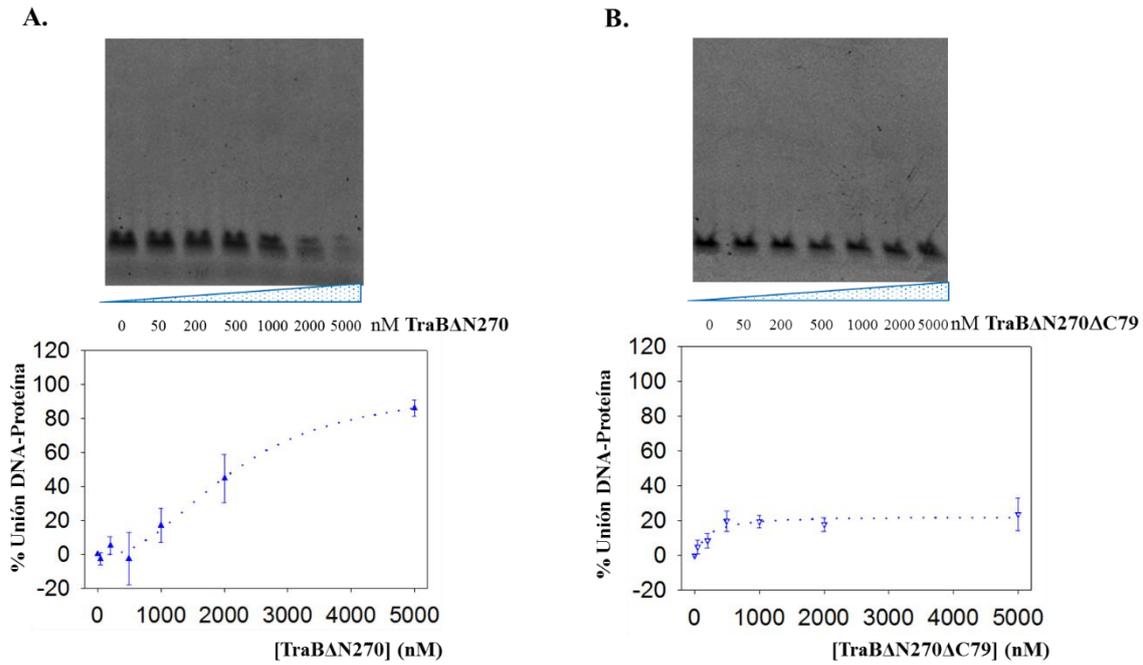


Figura R14. Ensayo de interacción de TraBAN270 y TraBAN270ΔC79 frente a dsDNA con secuencia TRS en dirección 3'-5'. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBAN270 y en el panel B, los resultados de TraBAN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol, en el que se incubó el sustrato dsDNA con secuencias TRS orientadas en dirección 3'-5' (elaborado hibridando los oligonucleótidos R y S de Tabla M5 M&M) a una concentración 5 nM y concentraciones crecientes de TraB con, y sin dominio γ .

Los resultados obtenidos fueron similares a los que se obtuvieron con el sustrato de DNA con la secuencia TRS repetida en tándem en sentido 5'-3'. Según estos resultados, el dominio γ favorecía la interacción de TraB con el sustrato de DNA doble cadena en presencia de la secuencia TRS. Para TraBAN270, se obtuvo un valor de $k_d = 2,2 \mu\text{M}$ y para TraBAN270ΔC79, una $k_d > 5 \mu\text{M}$.

Ensayos de unión a dsDNA de 45 bases con la secuencia *clt* procedente del plásmido pSVH1

Para este ensayo, se empleó sustrato dsDNA de 45 bases con la secuencia *clt*, que contiene tres secuencias "TRS" GACCCGGA dispuestas de forma alterna, en el mismo orden en el que se encuentran en el plásmido pSVH1. Este sustrato se confeccionó hibridando los oligonucleótidos K y L (Tabla M5 M&M).

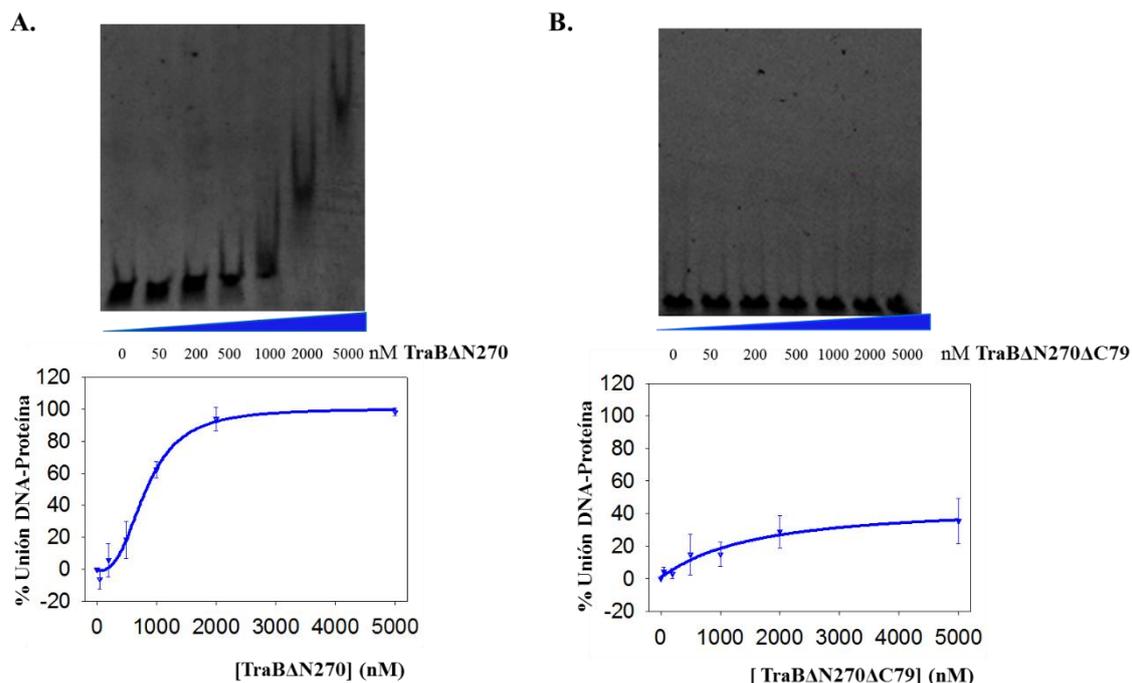


Figura R15. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a dsDNA con secuencia *clt*. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol, en el que se incubó el sustrato dsDNA con secuencia *clt* (elaborado hibridando los oligonucleótidos K y L de Tabla M5 M&M) a una concentración 5 nM y concentraciones crecientes de TraB, con y sin dominio γ .

Según estos resultados, en presencia del dominio γ , TraBΔN270 interactuaba con la secuencia *clt* ($k_d = 0,98 \mu\text{M}$). La afinidad es más elevada que la presentada por el sustrato que contiene las tres secuencias TRS dispuestas en tándem, en cualquiera de sus orientaciones. En ausencia del dominio γ no se observaba interacción con este sustrato de secuencia específica.

Ensayos de unión a DNA G-quadruplex intermolecular de 45 bases

Para este ensayo, se empleó sustrato G-quadruplex intermolecular de 45 bases elaborado a partir del oligonucleótido V (Tabla M5 M&M) mediante el protocolo de formación G-quadruplex de la Sección 3.5.2.3. (M&M).

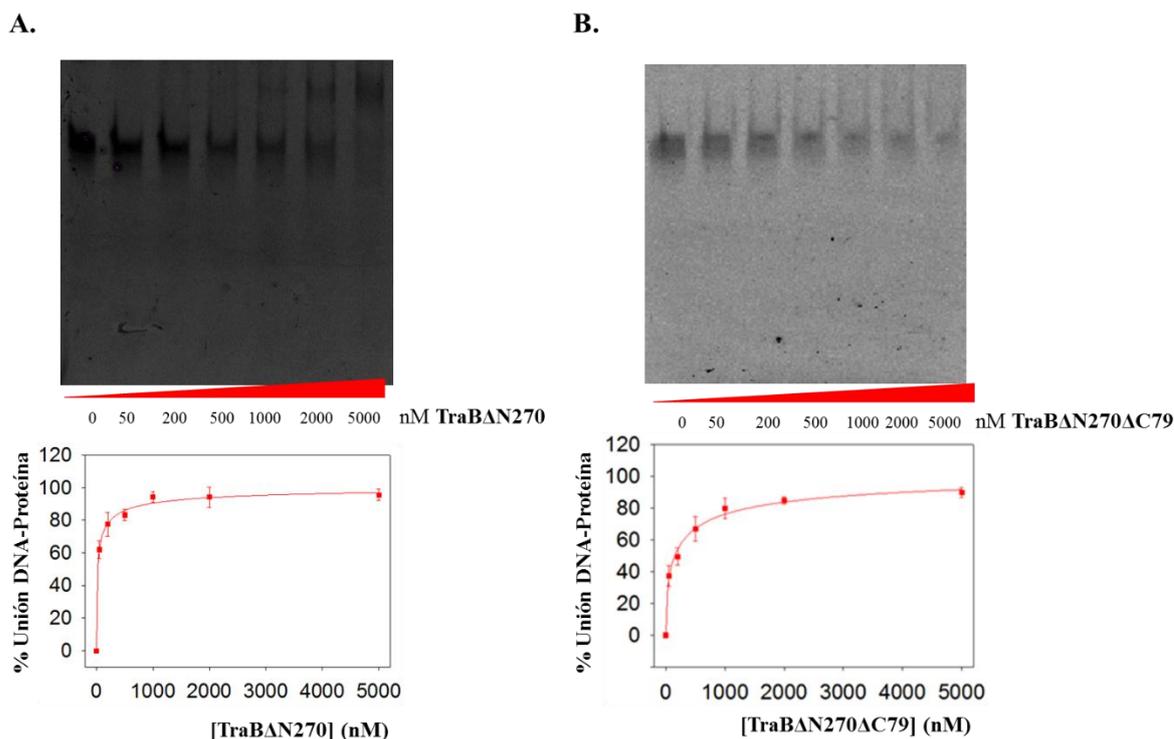


Figura R16. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a G4 DNA. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol, en el que se incubó el G-quadruplex intermolecular a una concentración 5 nM junto a concentraciones crecientes de TraB, con y sin dominio γ .

Los resultados indicaban que el DNA G-quadruplex era el sustrato preferente de ambas enzimas. La interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 con este sustrato G-quadruplex se caracterizó con unas constantes de afinidad $k_d = 23$ nM y $k_d = 193$ nM, respectivamente. El aumento en los valores de afinidad para ambas enzimas en relación a otros sustratos de DNA (K_d 's con un orden o dos de magnitud por debajo de las que presentan para otros sustratos), sugería que el dominio motor del enzima era el principal responsable de la afinidad del motor por este tipo de estructuras. No obstante, aún así existe una diferencia de un orden de magnitud entre ambos mutantes, por lo que aunque podemos decir que el dominio motor del enzima juega un papel importante en el reconocimiento de este tipo de estructuras en el DNA, el dominio γ también es importante en este reconocimiento. Es importante señalar que la secuencia de DNA empleada en la formación del sustrato G-quadruplex es totalmente inespecífica y no contiene secuencias TRS o *clt* implicadas en el reconocimiento por parte del dominio γ .

Balance de afinidad de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 por los diferentes sustratos de DNA de 45 bases

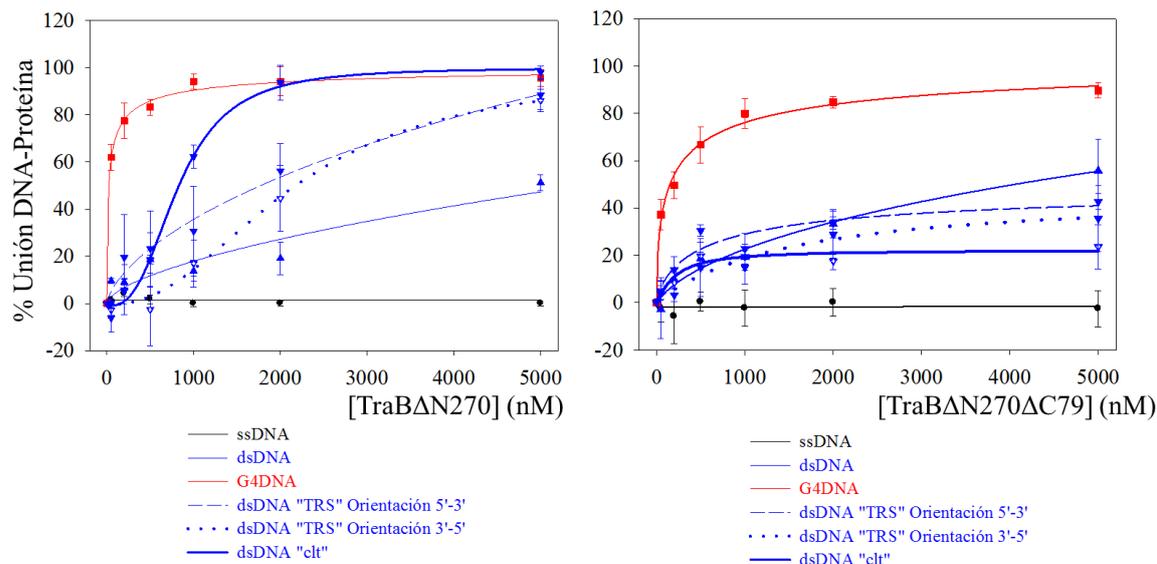


Figura R17. Resumen de Ensayos de afinidad de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79 frente a diferentes sustratos de DNA de 45 bases. El panel de la izquierda, corresponde a los resultados obtenidos para TraB Δ N270, y el de la derecha, a los obtenidos para TraB Δ N270 Δ C79. Se empleó un código de colores para los diferentes tipos de sustratos. Negro (ssDNA), azul (dsDNA) y rojo (DNA G-quadruplex). Para representar los diferentes tipos de sustratos de dsDNA, se empleó un código basado en la continuidad de la línea de interpolación de valores de cada sustrato. Para el sustrato dsDNA inespecífico, se empleó una línea continua. Para el sustrato dsDNA con secuencia TRS orientada en dirección 5' - 3', se empleó línea discontinua. Para el sustrato dsDNA con secuencia TRS orientada en dirección 3' - 5', se empleó una línea de puntos finos y, finalmente, para el sustrato dsDNA con la secuencia *clt*, se empleó línea gruesa.

Como conclusión, podemos decir que ambas construcciones derivadas de TraB no eran capaces de reconocer el DNA de cadena sencilla ni tampoco dsDNA de secuencia inespecífica. TraB, en presencia de su dominio γ , reconoce sustratos de DNA que contienen secuencias TRS con una K_d de 1-2 μ M, dependiendo de la disposición de esas secuencias TRS en el DNA. Podemos concluir que TraB presenta una mayor afinidad por la secuencia *clt* con su disposición alterna de las tres secuencias TRS, en comparación con los sustratos que contienen tres repeticiones en tándem. Curiosamente, en presencia de G-quadruplex, aún con secuencia inespecífica, ambos motores mostraban una elevada afinidad por este sustrato ($K_{d-TraB\Delta N270} = 23$ nM y $K_{d-TraB\Delta N270\Delta C79} = 193$ nM), indicando que el dominio motor de la proteína es el principal responsable en el reconocimiento de este sustrato.

Ensayos de unión a ssDNA de 65 bases con secuencia *clt*

Para estos ensayos, se empleó como sustrato el oligonucleótido II (Tabla M5 M&M), extraído de la región *clt* del plásmido pSVH1. A priori, este oligonucleótido presenta potencial para formar G-quadruplex intramolecular por su secuencia rica en GC.

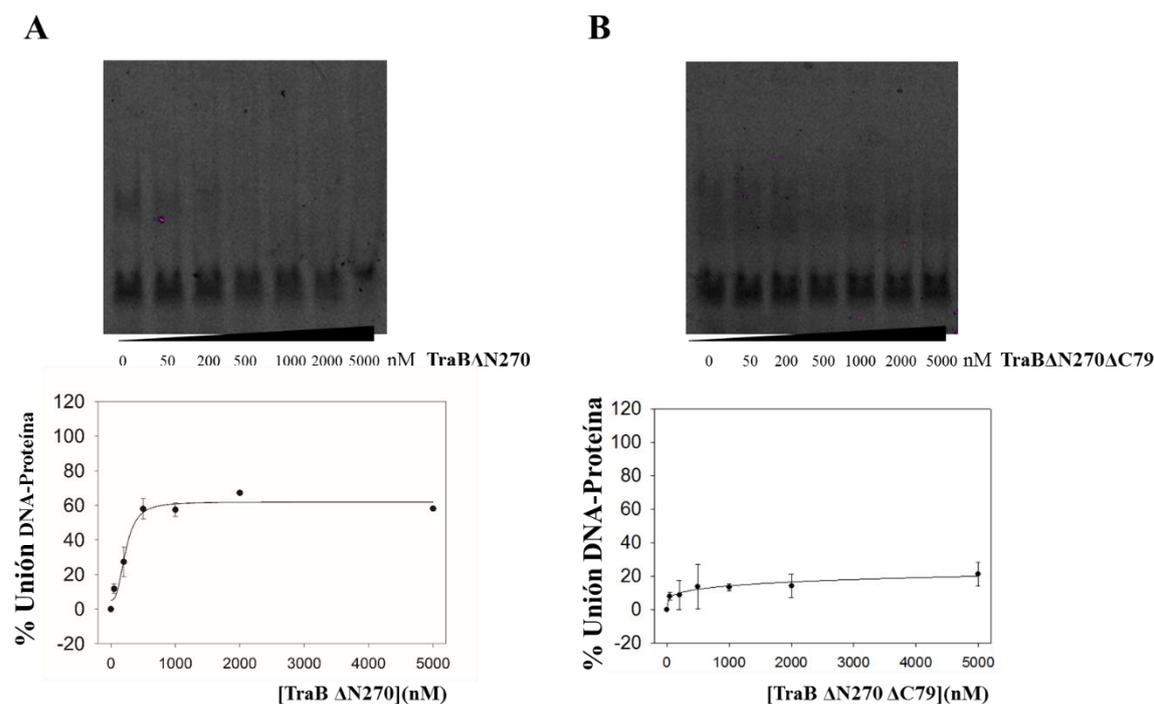


Figura R18. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a ssDNA de 65 bases con secuencia *clt*. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol, en el que se incubó el oligonucleótido II (Tabla M5 de M&M) a una concentración 5 nM con concentraciones crecientes de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79.

Estos datos reflejan una débil interacción de TraB, a través de su dominio γ , con el sustrato que contiene la secuencia *clt* en forma de cadena sencilla.

Ensayos de unión a ssDNA de 65 bases con secuencia complementaria a la secuencia *clt*

Para estos ensayos, se empleó como sustrato de ssDNA de 65 bases al oligonucleótido KK (Tabla M5 M&M), complementario de la secuencia *clt*, y a priori, también con potencial para formar G-quadruplex intramolecular por su secuencia rica en GC.

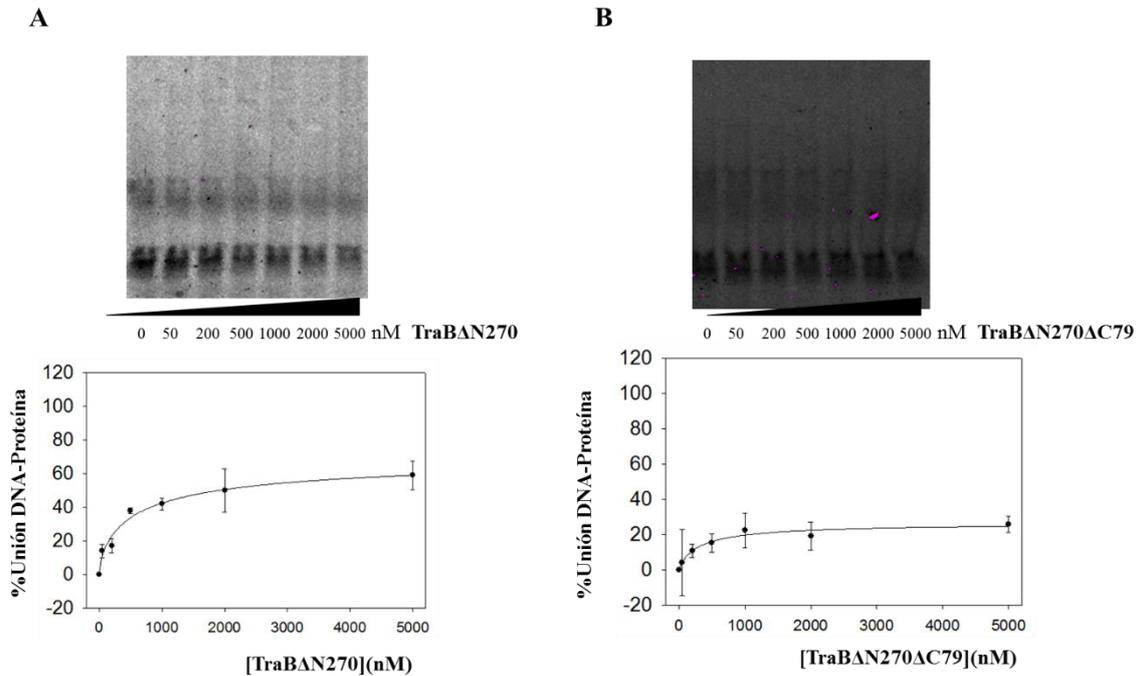


Figura R19. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a ssDNA de 65 bases con secuencia complementaria a *clt*. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol, en el que se incubó el oligonucleótido KK (Tabla M5 de M&M) a una concentración 5 nM con concentraciones crecientes de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79.

Los resultados fueron similares a los obtenidos en presencia del fragmento de ssDNA de 65 bases con la secuencia *clt*.

Ensayos de unión a dsDNA de 65 bases con secuencia *clt*

Para este ensayo, se empleó sustrato dsDNA de 65 bases con la secuencia *clt*, confeccionado hibridando los oligonucleótidos II y JJ (Tabla M5 M&M).

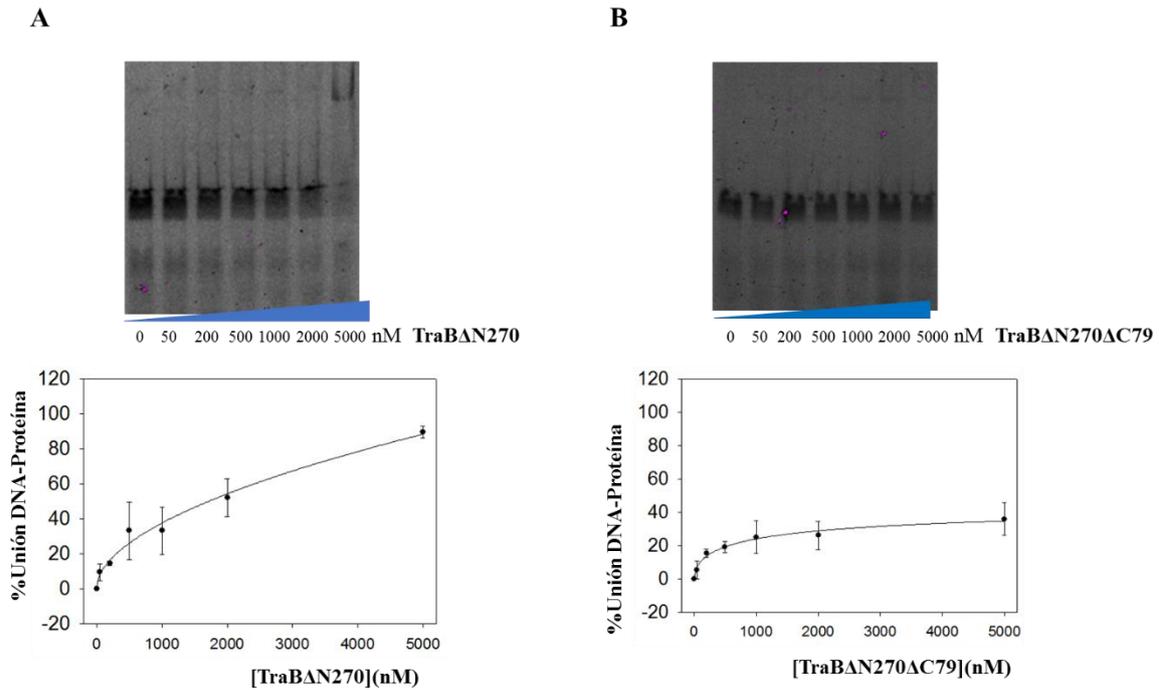


Figura R20. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a dsDNA de 65 bases con la secuencia *clt*. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol, en el que se incubó el DNA doble cadena (elaborado mediante la hibridación de los oligonucleótidos II y JJ Tabla M5 de M&M) a una concentración 5 nM con concentraciones crecientes de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79.

Según estos resultados, la secuencia *clt* es capaz de estimular la interacción de TraB con DNA a través del dominio γ . Sin embargo, la afinidad observada se caracteriza por una $k_d > 5 \mu\text{M}$, un valor superior al obtenido con el sustrato de 45 bases.

Ensayos de unión con una muestra que contiene ssDNA de 65 bases con secuencia *clt* y su ssDNA complementario (sin tratamiento de hibridación)

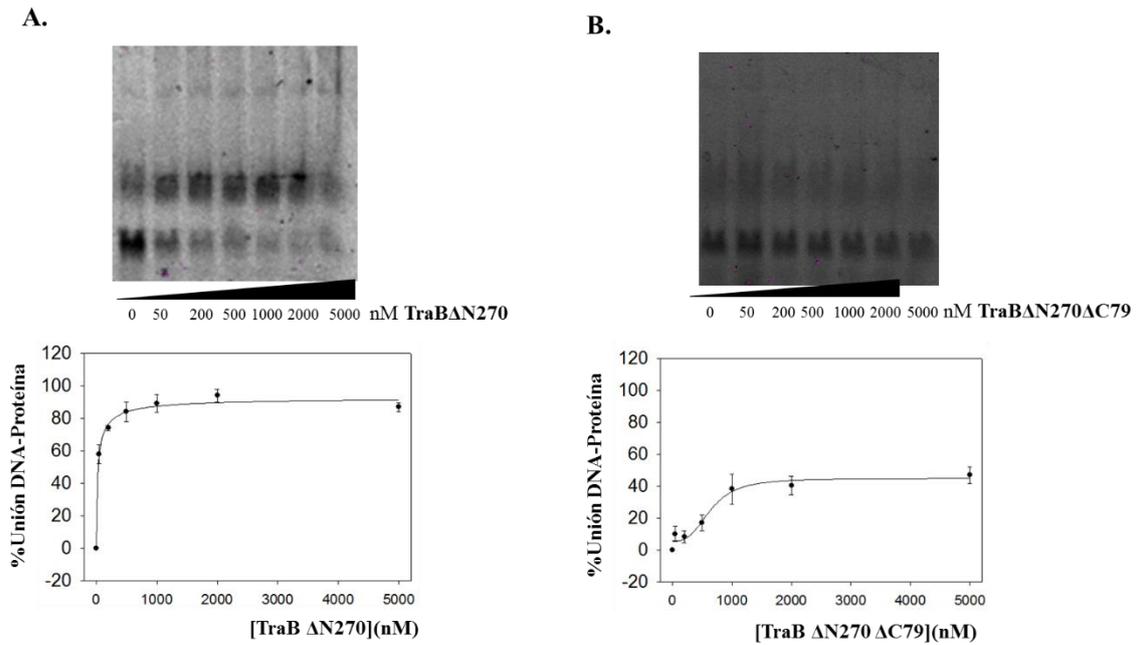


Figura R21. Ensayo de interacción de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79 frente a mezcla de 2 oligonucleótidos de DNA de 65 bases, el oligonucleótido II con la secuencia *clt*, y el oligonucleótido KK, su complementario. En el panel A, se exponen los resultados obtenidos para TraBΔN270 y en el panel B, los resultados de TraBΔN270ΔC79. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 7, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol, en el que se incubaron a los 2 oligonucleótidos HH e JJ (M5 de M&M) a una concentración de 2,5 nM cada uno, con concentraciones crecientes de TraBΔN270 y TraBΔN270ΔC79.

El resultado obtenido con TraBΔN270 se caracterizó con una constante de afinidad $K_d = 27$ nM, similar a la obtenida con sustratos de DNA de 45 bases G-quadruplex en presencia del dominio γ . Este resultado es muy diferente al obtenido tras hibridar previamente ambos oligos y formar un sustrato de doble cadena. Por tanto, este resultado es muy interesante y puede sugerir que TraB, a través de su dominio γ , puede reconocer simultáneamente dos hebras de una horquilla de dsDNA abierta. Las dos hebras, al separarse, podrían formar una estructura secundaria del tipo G-quadruplex.

Aunque es necesario llevar a cabo más experimentos para poder extraer conclusiones más sólidas, los resultados obtenidos en esta tesis parecen indicar que TraB reconoce con elevada afinidad estructuras secundarias en el DNA que se formarían en la secuencia *clt* del plásmido; estructuras que para su formación requerirían una previa separación de hebras y que explican la elevada afinidad de TraB por la mezcla de estos dos nucleótidos sin hibridar (en el protocolo de hibridación se perderían estas estructuras).

4.1.4. Ensayos de translocación sobre diferentes sustratos de DNA

TraB, en forma hexamérica y anclada a la membrana de la bacteria donadora, debe formar un poro que le permita translocar dsDNA plasmídico (Vogelmann et al., 2011), con el fin de conseguir la transferencia completa del plásmido en el proceso conjugativo.

De acuerdo a la estructura hexamérica de TraB, para el desplazamiento, el DNA debe atravesar el canal central. El diámetro del canal central de TraB, equivalente a 3 nm (Thoma & Muth, 2012), permitiría el paso de DNA de doble cadena.

En el trabajo que se presenta aquí, se pretendía estudiar el desplazamiento de TraB Δ N270 sobre el DNA y caracterizar este mecanismo en función de los diferentes sustratos de DNA. Este estudio, se desarrolló mediante el empleo de ensayos de translocación.

Para los ensayos de translocación se prepararon diferentes sustratos de DNA marcados con Fluoresceína y Biotina. La Fluoresceína permitía revelar el sustrato de DNA en un gel mediante el empleo de un escaner de Fluorescencia. La Biotina, unida a Estreptavidina, suponía un volumen extra adherido a la molécula de DNA, es decir, un obstáculo en la translocación de DNA a través del poro de la proteína hexamérica. La unión Estreptavidina-Biotina, es la unión no covalente más fuerte que se conoce en la naturaleza, de forma que si TraB es capaz de translocar sobre una molécula de DNA con la suficiente fuerza, provocaría la disociación de la unión Estreptavidina-Biotina en ese movimiento de translocación. Este ensayo se ha llevado a cabo con éxito en el caso de otros motores moleculares para demostrar su actividad de translocación; por ejemplo, con el motor Dda (Byrd et al., 2006). Además, colocando el marcaje de biotina en los diferentes extremos del DNA, se puede analizar la dirección de translocación (5'-3' ó 3'-5').

El ensayo se configuró como se describe en la sección 3.7.7. de M&M. A continuación, en la Figura R22, se representa un esquema de un ensayo de translocación hipotético.

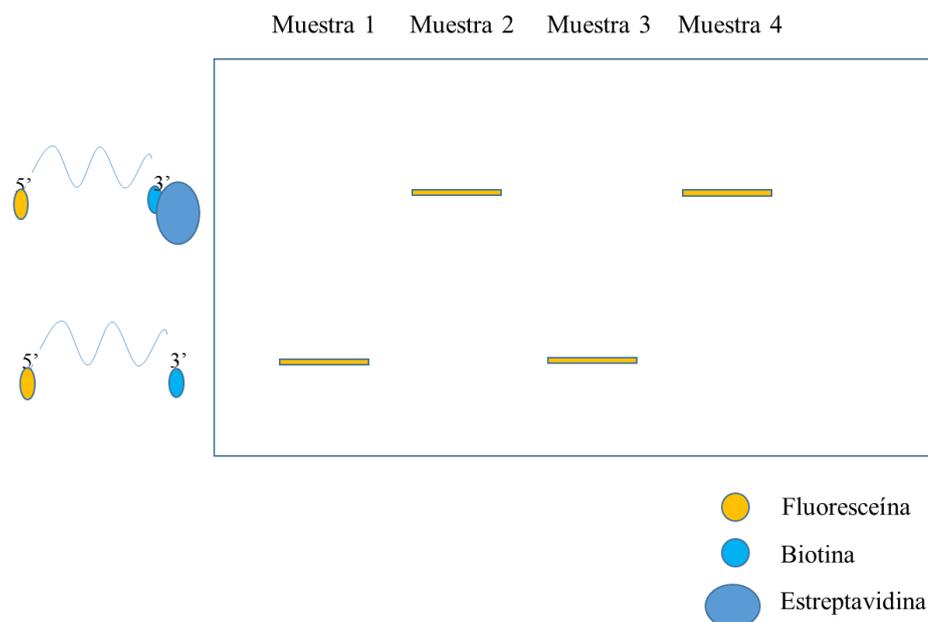


Figura R22. Representación esquemática de un ensayo de translocación. En el margen izquierdo del gel, aparecen representadas dos moléculas de DNA marcadas con Fluoresceína en el extremo 5' y con Biotina en el extremo 3'. La molécula superior aparece hibridada con Estreptavidina y la inferior, sin ella. En el dibujo, el rectángulo representa el gel y las diferentes líneas indican la posición correspondiente a las bandas de retardo en el gel. (1), DNA marcado con Biotina y Fluoresceína. (2), DNA marcado con biotina e incubado con estreptavidina. (3), DNA marcado e hibridado con estreptavidina, tras ser incubado con una enzima capaz de translocar DNA y disociar la unión Estreptavidina-Biotina. (4), similar a la muestra 3, pero empleando un enzima incapaz de deshacer la unión Estreptavidina-Biotina.

Para los ensayos con TraB Δ N270, se emplearon 4 tipos de sustratos de 45 bases de longitud. A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

Ensayos de translocación de TraB Δ N270 sobre ssDNA de 45 bases con biotina en el extremo 3'

Aunque el sustrato biológico de TraB corresponde a DNA plasmídico de doble cadena, se decidió a ensayar también la translocación sobre DNA de cadena sencilla. Se empleó un sustrato de DNA de una longitud de 45 bases. La Fluoresceína se dispuso en el extremo 5', y la Biotina, en el 3' (oligonucleótido G de Tabla M5 de M&M). Con esta disposición, pretendía estudiarse la translocación de TraB en dirección 5'-3'. Los resultados obtenidos pueden observarse a continuación, en la Figura R23.

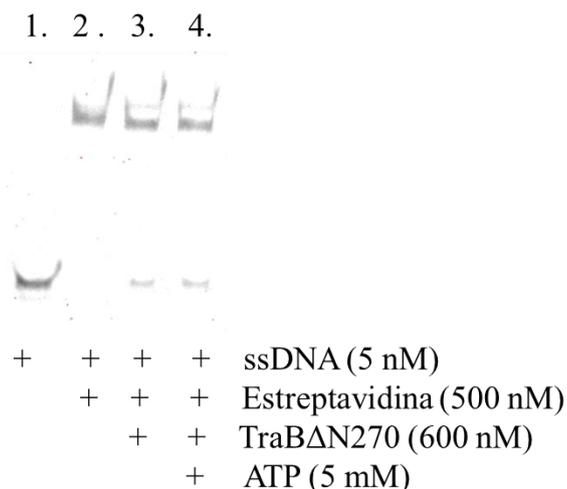


Figura R23. Ensayo de translocación de TraBΔN270 frente a DNA de cadena sencilla con secuencia inespecífica. Se empleó un buffer de reacción con 50 mM Pipes pH 6,2, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol. (1), Oligonucleótido G (Tabla M5 de M&M). (2), Oligonucleótido G incubado previamente con estreptavidina durante 10 min en baño de hielo. (3), Muestra 2 tras añadir TraBΔN270 (600 nM) e incubar durante 10 min a 37°C. (4), Similar a la muestra anterior pero añadiendo ATP (5 nM) a la mezcla de incubación. Tras llevar a cabo el protocolo descrito para cada muestra, la reacción se detuvo con un buffer similar que contenía además Proteinasa-K (0,2 mg/ml).

Bajo estas condiciones, TraBΔN270 no fue capaz de desplazar la estreptavidina unida en el extremo 3' del oligonucleótido G. Si bien es cierto que puede apreciarse una pequeña banda sin estreptavidina, esta banda también se observa en el control correspondiente a la muestra 3, donde no se ha añadido ATP. Es decir, la interacción de TraBΔN270 con el DNA, desplaza una pequeña cantidad de Estreptavidina.

Ensayos de translocación de TraBΔN270 sobre dsDNA de 45 bases con Biotina en el extremo 3' de una de las hebras del DNA.

Para este ensayo, se empleó sustrato dsDNA de 45 bases de secuencia inespecífica, confeccionado hibridando los oligonucleótidos G y H (Tabla M5 M&M).

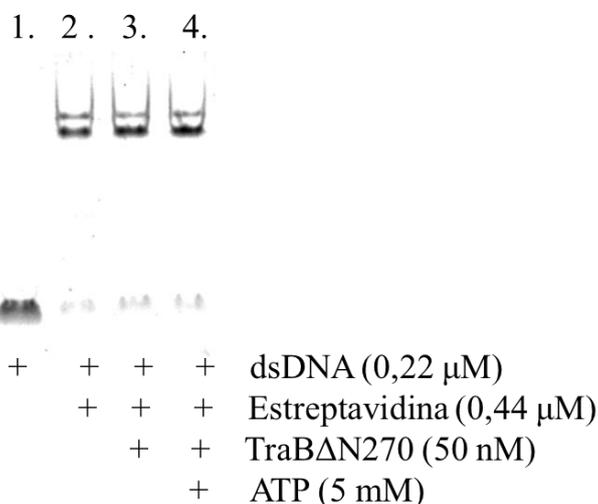


Figura R24. Ensayo de translocación de TraBΔN270 frente a DNA doble cadena de secuencia inespecífica. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 6,2, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol. En el ensayo, se empleó DNA de cadena doble de 45 bases, formado tras hibridar los oligonucleótidos G y H (Tabla M5 de M&M). (1), sustrato dsDNA. (2), sustrato dsDNA incubado 10 minutos en baño de hielo con estreptavidina. (3), similar a la muestra 2 y además, con 50 nM de TraBΔN270 e incubado 10 minutos más a 37°C. (4), similar a la muestra 3 pero incubando además con ATP (5 nM) durante 10 minutos a 37°C. Tras llevar a cabo el protocolo descrito para cada muestra, la reacción se detuvo con un buffer similar que contenía además Proteinasa-K (0,2 mg/ml).

El resultado fue similar al observado con DNA de cadena sencilla. Bajo estas condiciones, no podemos concluir si el problema es que TraBΔN270 no es capaz de translocar sobre estos sustratos (ssDNA ó dsDNA) o si el problema es que el motor no es capaz de hacerlo con la suficiente fuerza como para disociar la unión Estreptavidina-Biotina.

Finalmente, se integraron 4 tipos de sustratos en un mismo ensayo de translocación. Por una parte, se ensayaron dos tipos de sustratos ssDNA de secuencia inespecífica con el marcaje en extremos opuestos (oligonucleótidos G y T de la Tabla M5 M&M). De este modo, se pretendía comprobar si el motor translocaba en una dirección determinada. Además, se empleó un sustrato dsDNA inespecífico con estreptavidina unida en el extremo 3', con el fin de comprobar una translocación en dirección 5'-3' (oligonucleótidos G y H de la Tabla M5 hibridados). El último sustrato ensayado fue G4DNA, marcado con estreptavidina en el extremo 3' para comprobar si existía translocación sobre G4DNA en dirección 5'-3' (oligonucleótido W tratado previamente con el protocolo de formación de estructuras G4 intermolecular descrito en la sección 3.5.2.3. M&M).

Los resultados obtenidos pueden observarse a continuación, en la Figura R25:

A

Substrato	Descripción
a	ssDNA inespecífico: Fluoresceína en 5' y Biotina en 3' (oligonucleótido G)
b	ssDNA inespecífico: Fluoresceína en 3' y Biotina en 5' (oligonucleótido T)
c	dsDNA inespecífico: Fluoresceína en 5' y Biotina en 3' (oligonucleótidos G y H hibridados)
d	G4DNA: Fluoresceína en 5' y Biotina en 3' (oligonucleótido W)

B

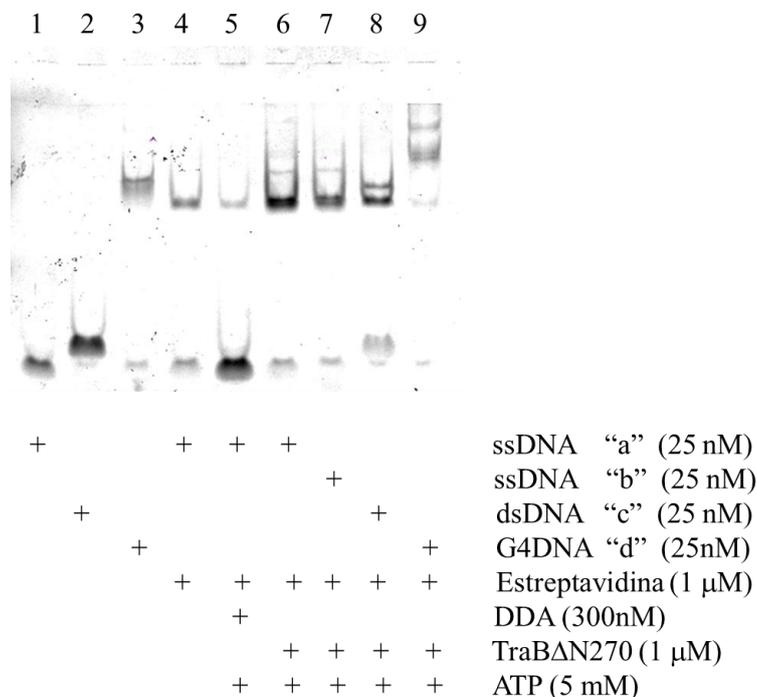


Figura R25. Ensayo de Translocación de TraBAN270 sobre sustratos ssDNA, dsDNA y G-quadruplex de 45 bases. El Panel A representa las muestras de DNA de 45 bases empleadas. Los oligonucleótidos empleados para formar los sustratos, mostrados entre paréntesis, son los reflejados en la Tabla M5 de M&M. El Panel B muestra los resultados del ensayo de translocación. Para dicho ensayo, se empleó un medio con con 50 mM Pipes pH 6,2, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de glicerol. (1), sustrato ssDNA de cadena sencilla "a". (2), sustrato dsDNA "c". (3), sustrato DNA G-quadruplex "d". (4), sustrato "a" incubado con estreptavidina. (5), similar a (4) pero incubado además con el motor DDA y ATP. Esta calle suponía un control positivo de la translocación. (6), Sustrato "a" con Estreptavidina, incubada con TraBAN270 y ATP. (Las muestras 7, 8 y 9 corresponden a muestras de TraB incubadas con los sustratos b, c y d, respectivamente, en presencia de estreptavidina y ATP.

Aunque al observar la muestra 8 pudiera entenderse que ha habido desplazamiento de Estreptavidina, no es así, esta banda tenue corresponde a Estreptavidina desplazada al interactuar TraBAN270 con el sustrato (ver experimento similar, en la sección anterior, utilizando los mismos oligonucleótidos). Por tanto, en todas las condiciones ensayadas, TraBAN270 no era capaz de translocar ninguno de los sustratos con la suficiente fuerza para disociar la interacción Estreptavidina-Biotina.

4.2. Caracterización estructural de TraB

4.2.1. Análisis del estado oligomérico

4.2.1.1. Filtración en gel de TraBΔN270

Se llevó a cabo un ensayo de filtración en gel, en una columna Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare), para obtener una primera aproximación del estado oligomérico de TraBΔN270. Para asegurar una buena integridad proteica, se empleó muestra recién purificada (según el protocolo de purificación descrito en la Sección 3.7.1.3. de M&M). La columna Superdex 200 PC 3.2/30 fue previamente equilibrada con buffer Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 0,001 % (p/v) y glicerol 5% (v/v). El resultado se muestra a continuación, en la Figura R26:

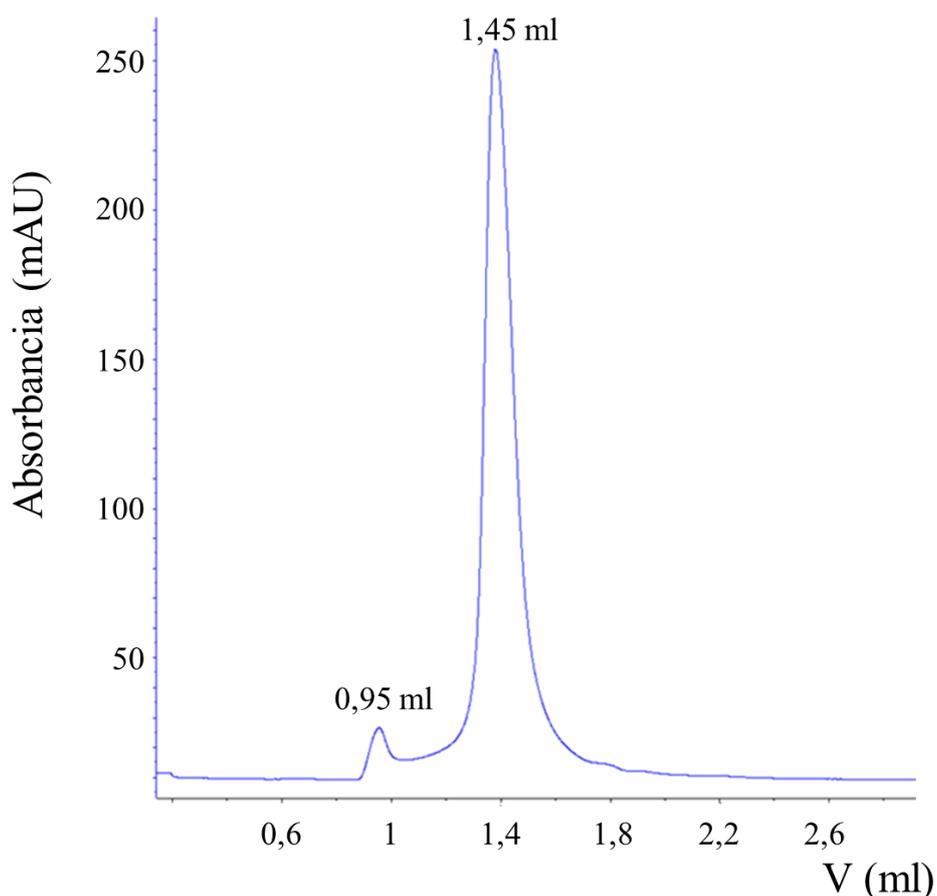


Figura R26. Ensayo de filtración en gel de TraBΔN270 (50 μM). La fase móvil empleada en el ensayo consistió en buffer Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 0,001 % (p/v) y glicerol 5% (v/v). Se empleó una columna Superdex 200 PC 3.2/30.

La mayor proporción de TraBΔN270 eluía a 1,45 ml, y una pequeña proporción de proteína a 0,95 ml. Para determinar la masa molecular correspondiente a ambos

volúmenes de elución, se confeccionó una recta patrón con 4 proteínas de masa molecular conocida. Las cuatro proteínas se sometieron a filtración en gel en el mismo buffer empleado para la muestra de TraBΔN270. Los volúmenes de elución (Ve) obtenidos para las cuatro proteínas fueron: Tiroglobulina (660 KDa) 1,03 ml, Ferritina (440 KDa) 1,19 ml, Catalasa (220 KDa) 1,37 ml, y Albúmina láctica (69 KDa) 1,51 ml. La recta patrón obtenida se muestra a continuación, en la Figura R27:

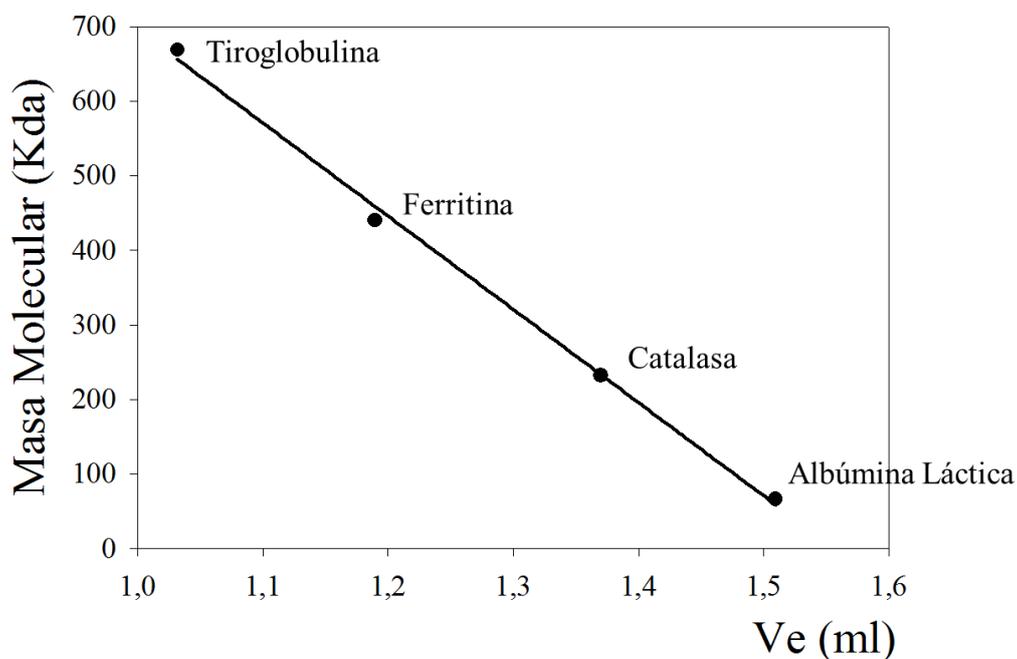


Figura R27. Recta patrón de masas moleculares confeccionada con Albúmina Láctica, Catalasa, Ferritina, y Tiroglobulina. El buffer empleado consistió en Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 0,001 % (p/v) y glicerol 5% (v/v). Se empleó una columna Superdex 200 PC 3.2/30.

La ecuación de la recta patrón obtenida se describe a continuación:

$$F(x) = -1250,33 \text{ (KDa/ml)} x + 1946,36 \text{ (KDa)}$$

$$(R^2 = 0,9970)$$

Al interpolar en la recta patrón el volumen de elución mayoritario para la muestra de TraBΔN270, equivalente a 1,45 ml, se obtuvo una masa molecular (MW) aproximada de 134 KDa. Teniendo en cuenta que la MW teórica de TraBN270 es de 56,56 KDa, la MW calculada de la muestra corresponde aproximadamente a un dímero de proteína. Al interpolar el volumen de elución de la población de TraBΔN270 minoritaria, equivalente a 0,95 ml, se obtuvo una masa molecular en torno a 800 KDa. No obstante, este volumen de elución está muy cercano al volumen vacío de la columna y, por lo tanto, la MW estimada con esta columna podría estar muy lejos de la MW real de la muestra.

Desde el punto de vista de esta tesis, nos interesaba la población de TraBΔN270 en estado oligomérico. TraB *in vivo* funciona como un motor molecular en estado oligomérico, al

menos hexamérico (Vogelmann et al., 2011). Por tanto, era importante conocer las condiciones de oligomerización.

Se modificaron las condiciones para aumentar la proporción de TraB Δ N270 en estado oligomérico. Se varió el pH (6,2-7,5), la concentración de NaCl (100-200 mM), MgCl₂ (0-5 mM) y por último, se suprimió el glicerol.

En la Figura R29, se muestra el resultado de un ensayo de filtración en gel realizado sobre una muestra de TraB Δ N270 recién purificada. El buffer de carga empleado, fue similar al empleado anteriormente, sin glicerol.

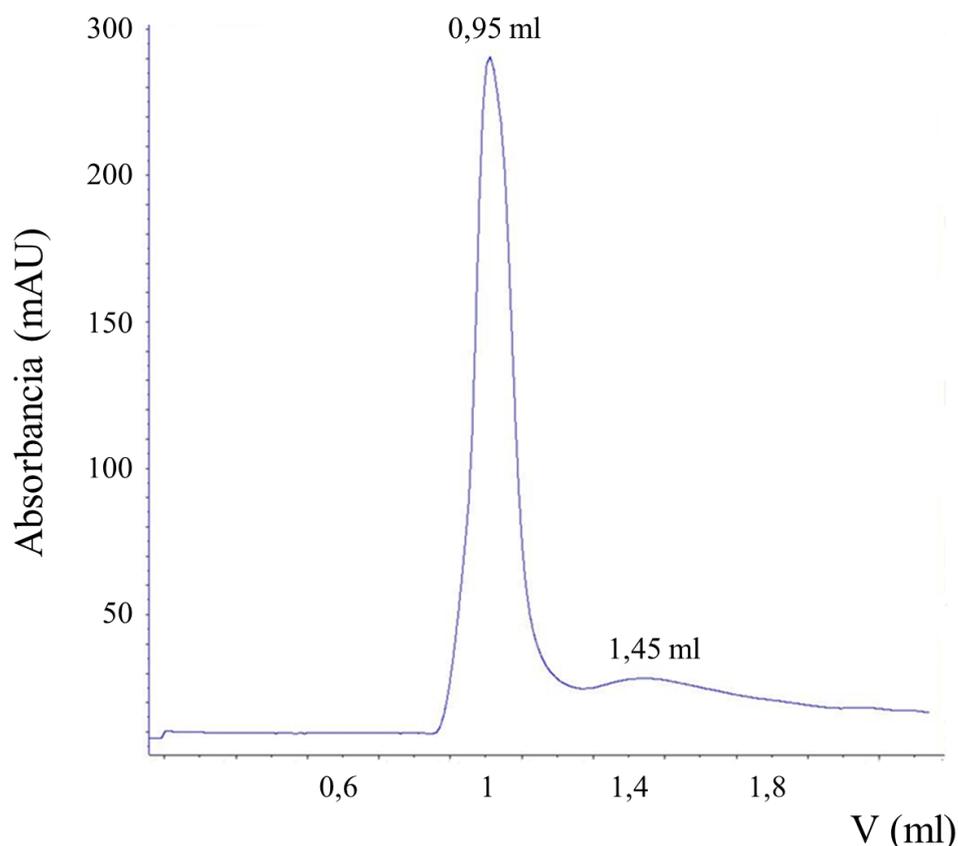


Figura R28. Ensayo de filtración en gel sobre TraB Δ N270 (50 μ M). La fase móvil empleada en el ensayo, contuvo Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM, y PMSF 0,001 % (p/v). Se empleó una columna Superdex 200 PC 3.2/30.

Como puede observarse, bajo estas condiciones, la proporción de población oligomérica y de dímero de TraB Δ N270 aparecían invertidas, obteniéndose prácticamente todas las partículas en estado oligomérico. Es importante señalar que la muestra de partida era diferente, por lo que con los datos de los que disponemos no podemos concluir si el cambio en el estado oligomérico está afectado por la presencia de glicerol o bien se trata de una dependencia de la concentración inicial de partida de la proteína.

En cualquier caso, tal y como se ha indicado anteriormente, este volumen de elución en una columna Sx200 está muy cercano al volumen vacío de la columna y, por lo tanto, la MW estimada con esta columna podría estar muy lejos de la MW real de la muestra. Por

ello, se decidió emplear una columna Superosa 6, con mayor capacidad de resolución de complejos de mayor masa molecular.

Tras el último paso de purificación de TraBΔN270, después de concentrar la muestra con la columna HiTrap Q 1 ml (GE Healthcare) (Sección 3.7.1.3. de M&M), se cargaron 100 μl de muestra a una concentración de 3.3 mg/ml en una columna Superosa 6 10/300 GL (GE Healthcare) previamente equilibrada en buffer 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glicerol y 0.001 % PMSF. El resultado puede observarse a continuación, en la Figura R29:

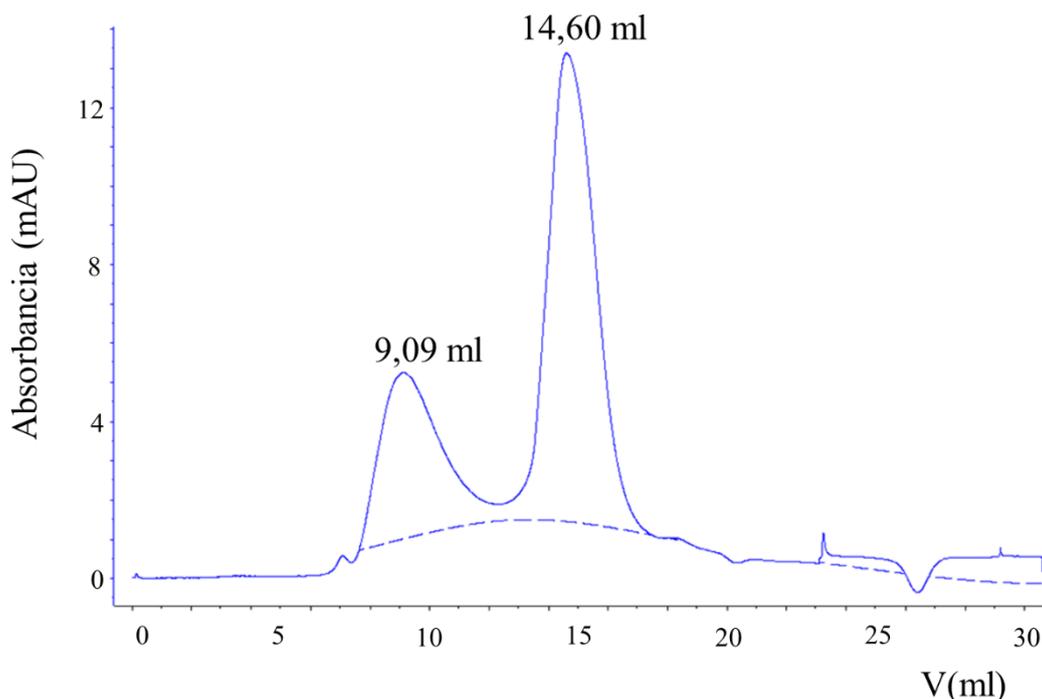


Figura R29. Ensayo de filtración en gel sobre TraBΔN270 (58,9 μM). La fase móvil empleada en el ensayo consistía en 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glicerol y 0.001 % PMSF. Se empleó una columna Superosa 6 10/300 GL.

Previamente, se cargaron en la columna Superosa 6 10/300 GL los patrones de MW, obteniéndose los siguientes volúmenes de elución (V_e): Tiroglobulina (660 KDa) 11,63 ml, Apoferritina (440 KDa) 13,34 ml, β-Amilasa (200 KDa) 14,3 ml y Alcohol Deshidrogenasa (150 KDa) 14,79 ml.

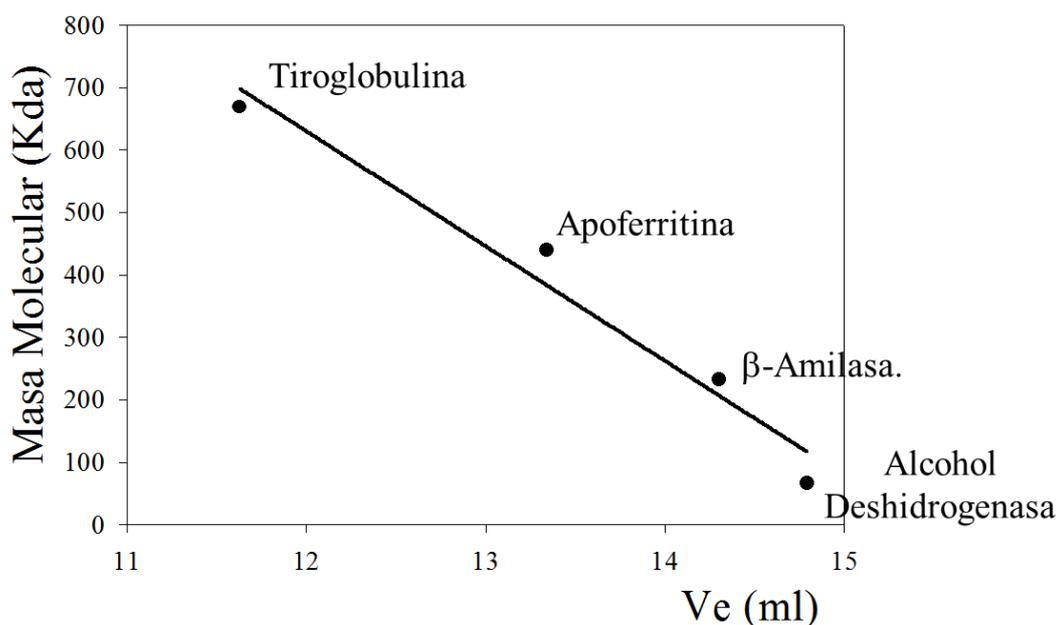


Figura R30. Recta patrón de masas moleculares confeccionada con las proteínas Alcohol Deshidrogenasa, β-Amilasa, Apoferritina, y Tiroglobulina. El buffer empleado consistía en 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glicerol y 0,001 % PMSF. Se empleó una columna Superosa 6 10/300 GL.

La ecuación de la recta patrón obtenida se describe a continuación:

$$F(x) = 2663 \text{ (KDa)} - 170 \text{ (KDa/ml)} \times x \\ (R^2 = 0,9800)$$

Interpolando el valor del del volumen de elución del oligómero ($V_e = 9,09 \text{ ml}$) se obtuvo una MW estimada equivalente a 1120 KDa (aprox. 23-24 monómeros).

4.2.1.2. Ultracentrifugación analítica de TraBAN270

Se decidió llevar a cabo un ensayo de ultracentrifugación analítica sobre TraBAN270. Con ello, se pretendía estudiar de forma más exhaustiva su estado oligomérico.

Se empleó el método de velocidad de sedimentación. En este tipo de experimentos, las macromoléculas se someten a un campo centrífugo elevado, tal que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, por lo que existe un transporte neto de material hacia el fondo de la celda. Es un método hidrodinámico de transporte, que permite fraccionar las macromoléculas en base a las diferencias en su coeficiente de sedimentación (dependiente de la masa, la densidad y la forma de la macromolécula).

Se empleó muestra sin glicerol, puesto que en la medida de lo posible se recomienda eliminarlo de la muestra en este tipo de experimentos. El ensayo se llevó a cabo bajo la dirección de los Doctores German Rivas, Carlos Alfonso Botello y Juan Román Luque, en el Laboratorio de Ultracentrifugación Analítica e Interacciones Macromoleculares (LUAIM) del CIB (CSIC).

Los resultados que se obtuvieron pueden observarse a continuación, en la Figura R31.

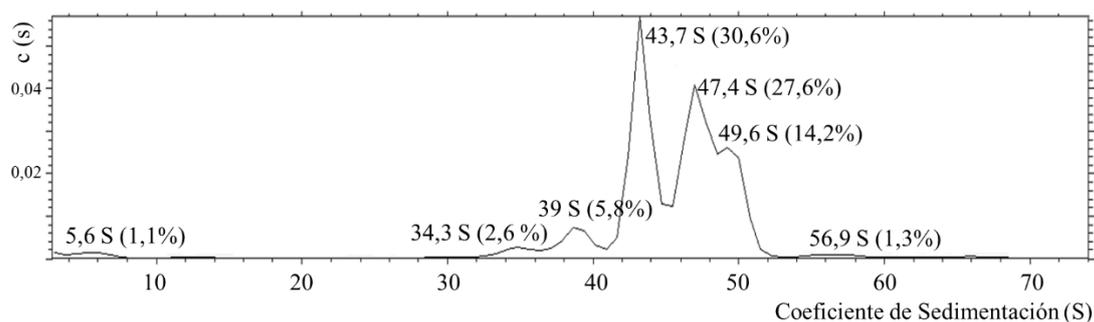


Figura R31. Resultados obtenidos a partir de un ensayo de ultracentrifugación analítica mediante el método de velocidad de sedimentación. Se analizó una muestra de TraBΔN270 (0,27 mg/ml) en buffer 50 mM Tris pH 7,5, 200 mM de NaCl, 5 mM MgCl₂ y 0,001% PMSF, obtenida a partir de un ensayo de filtración en gel en una columna Superdex 200 PC 3.2/30. La muestra procede de la fracción de elevada MW ($V_e = 0,95$ ml). El envío de la muestra se realizó a 4°C, sin congelar. En la figura se representa el perfil de ultracentrifugación de la muestra, donde aparecen las diferentes subpoblaciones oligoméricas obtenidas, caracterizadas por un coeficiente de sedimentación expresado en unidades Svedberg (S). Además, entre paréntesis, aparece reflejado el tamaño de la subpoblación a la que pertenecen, expresado en porcentaje.

Tal como se observa en la Figura R32, se obtuvieron diferentes subpoblaciones oligoméricas, con un valor de MW estimado que puede verse a continuación, en la Figura R33:

Subpoblación	Coeficiente Sedimentación (S)	MWestimada (Da)
1 (1,1 %)	5,6	115.000
2 (2,6 %)	34,3	1.730.000
3 (5,8 %)	39	2.110.000
4 (30,6 %)	43,7	2.490.000
5 (27,6 %)	47,4	2.810.000
6 (14,2 %)	49,6
7 (1,3 %)	56,9	3.700.000

Figura R32. Subpoblaciones oligoméricas obtenidas por ultracentrifugación analítica de una muestra de TraBΔN270. Se representan las subpoblaciones oligoméricas obtenidas de la muestra de TraBΔN270 del ensayo anterior junto al porcentaje que representa dicha subpoblación con respecto al total. También se expone el coeficiente de sedimentación asociado a cada subpoblación expresado en unidades Svedberg (S) y la MW estimada.

Probablemente, la eliminación de glicerol del buffer haya afectado a la estabilidad de la proteína, favoreciendo su agregación. Esto explicaría los coeficientes de sedimentación tan elevados que presenta la muestra en el análisis. No obstante, cabe destacar 2 picos, el pico de 5,6 S, que es compatible con la masa del dímero de TraBΔN270 y el pico de 34,3 S, compatible con 24 unidades de TraBΔN270. A pesar de obtenerse en porcentajes muy

pequeños, estos valores son compatibles con el resultado obtenido por gel filtración en la columna Superosa 6 10/300 GL.

4.2.2. Análisis estructural

Aunque la estructura de TraB no está resuelta a nivel atómico, sí se han obtenido micrografías de la proteína sin el dominio N-terminal transmembrana por tinción negativa (Vogelmann et al., 2011). En el trabajo llevado a cabo por estos autores, observaron que TraB en disolución adoptaba una conformación hexamérica, como otros motores con función ATPasa de la familia FtsK/RecQ, tales como TrwB, la proteína acopladora de R388 (Gomis-Rüth et al., 2001) o FtsK (Massey et al., 2006).

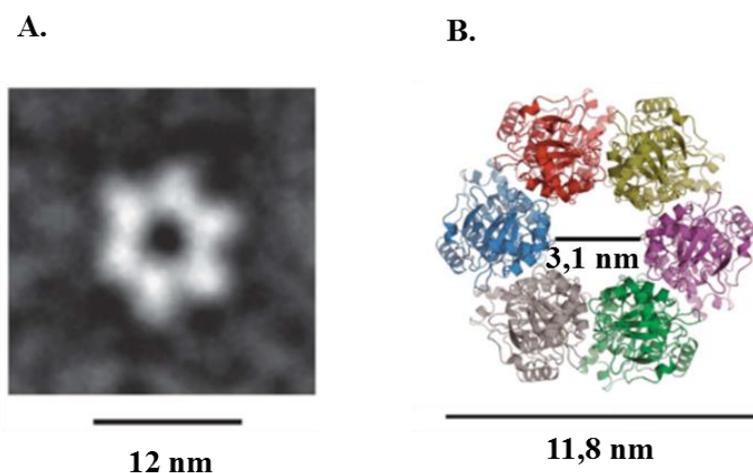


Figura R33. Microscopía electrónica de TraB Δ N270 y modelo molecular hexamérico dels dominio motor de TraB. En el panel A, se observa una media de imágenes 2D tomadas sobre una muestra de TraB Δ N270. En el panel B, se muestra un modelado molecular hexamérico construido a partir del dominio motor de TraB tomando como referencia la estructura del dominio motor de FtsK de *P. aeruginosa* (PDB ID: 2IUU). Figuras tomadas de Vogelmann et al., (2011).

La microscopía electrónica llevada a cabo con TraB Δ N270 sólo proporciona información a baja resolución (Vogelmann et al., 2011) y, por lo tanto, sigue sin existir información sobre el dominio γ acoplado al dominio motor en esta familia de proteínas. Existe una gran controversia sobre la conexión entre ambos dominios y la forma en la que la unión al DNA transmite la información al dominio motor para iniciar la translocación. Por este motivo, nos propusimos un abordaje estructural.

4.2.2.1. Cristalización de TraB Δ N270

Se intentó cristalizar muestra de TraB Δ N270. Se pretendió obtener cristales de calidad suficiente para poder someterlos a difracción de rayos X.

Tras purificar TraB Δ N270, se eligieron las fracciones más concentradas, con valores superiores a 10 mg/ml, y los ensayos de cristalización se desarrollaron en placas de 96 pocillos, tipo “Hampton” (Greiner Bio-One Ltd, Stonehouse, UK), mediante el método de difusión de vapor y la técnica de “gota sentada”, con el kit de cristalización JCSG-plus

HT-96 (Molecular Dimensions). A continuación, en la Figura R34, se muestra una imagen con cristales de TraB Δ N270 obtenidos mediante esta técnica.

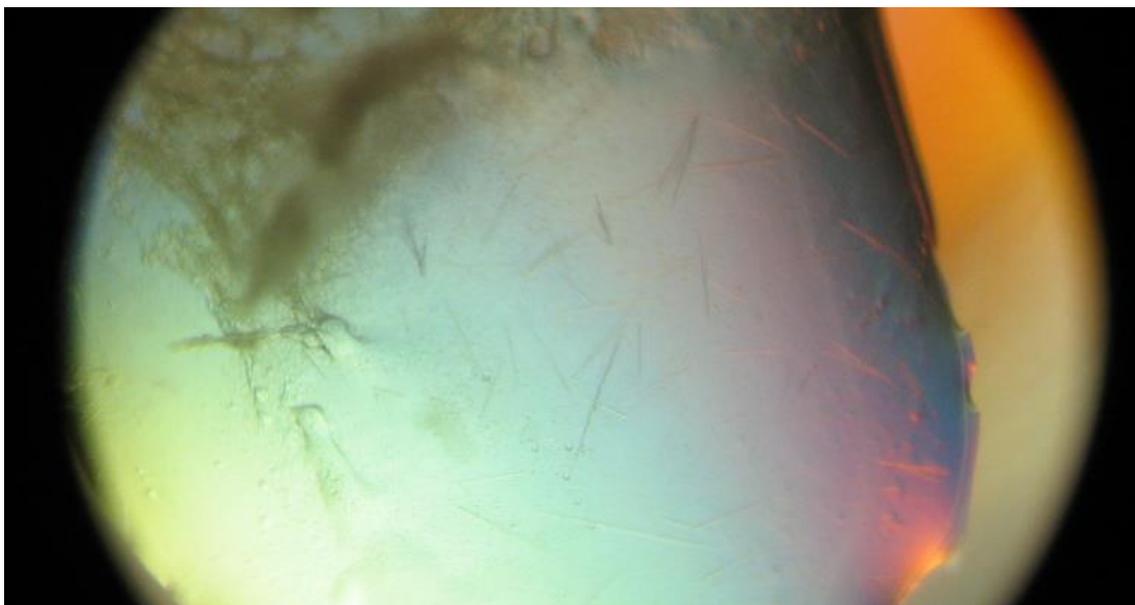


Figura R34. Fotografía de cristales obtenida en los ensayos de cristalización de TraB Δ N270. Tras purificar la proteína, se eligieron fracciones con una concentración 18 mg/ml. Estos cristales con forma de aguja fueron obtenidos con la condición E11 del kit JCSG-plus HT-96 (Molecular Dimensions). Esta solución contenía un 14 % de PEG 8000, 0,1 M de Cacodilato de Sodio, 0,16 M de acetato cálcico y 20 % de glicerol. Estos cristales se obtuvieron a partir de dicha muestra tras 24 horas de incubación a 22° C.

Posteriormente, se probaron variantes en torno a esas condiciones. Se varió el tipo de PEG y el porcentaje, así como la concentración de Cacodilato de Sodio y Acetato Cálcico. Lamentablemente, todos los cristales obtenidos tenían forma de aguja y carecían de la calidad suficiente para ser sometidos a difracción de rayos X.

4.2.2.2. Microscopía electrónica de TraB Δ N270

Como se ha mencionado en la sección anterior, en estudios previos de microscopía electrónica, las imágenes obtenidas mostraban una estructura hexamérica de TraB, con un diámetro de 12 nm y un tamaño de poro de 3,1 nm (Vogelmann et al., 2011). Este tamaño de poro, era consistente con la función biológica de TraB, cuya función es translocar DNA de doble cadena en la conjugación de *Streptomyces venezuelae*.

En esta tesis, se pretendió analizar con más detalle la estructura de TraB Δ N270 sola y en presencia de diferentes sustratos de DNA. El objetivo era observar si se apreciaban diferencias en la conformación hexamérica de TraB en presencia de determinadas estructuras de DNA.

TraB Δ N270 fue purificada según el método descrito en la sección 3.7.1.3. (M&M). Una alícuota de proteína a 8,9 mg/ml se sometió a filtración en gel en una columna Superdex 200 PC 3.2 en buffer Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM, y PMSF 0,001 % (p/v). Se seleccionó una muestra de enzima en estado oligomérico y se disolvió

hasta una concentración de 0,01 mg/ml. El método empleado para preparar muestras para microscopía electrónica fue el descrito en la sección 3.8.3. (M&M).

A continuación, se muestra un ejemplo de las micrografías obtenidas por el Dr. Ignacio Arechaga en un microscopio tipo JEOL-Jem-1011 EX-II, a una resolución 2.462 px/ μm .

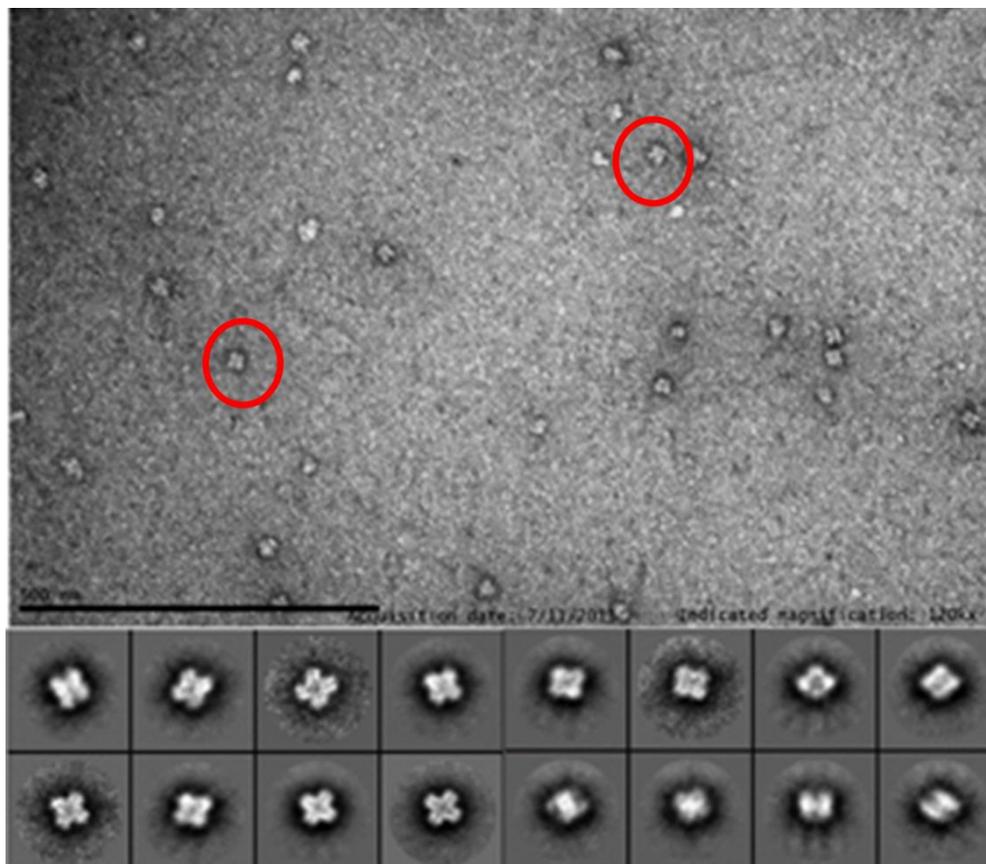


Figura R35. Microscopia electrónica sobre la fracción oligomérica de TraB Δ N270. Muestra procedente de eluido proteico de una columna cromatográfica de exclusión molecular Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare). En el Panel superior, se expone una imagen tomada sobre la muestra de TraB Δ N270, teñida con Acetato de Uranilo y micrografiada mediante microscopía electrónica como se describe en la sección 3.8.3. (M&M). En el panel superior, también se indica una barra que representa una longitud equivalente a 500 nm. En el panel inferior, se muestran 16 clases, obtenidas tras seleccionar, alinear y clasificar todas las imágenes de las partículas observadas mediante microscopía electrónica.

Tal y como se observa en la Figura R35, lo más destacable de las imágenes es que la muestra es monodispersa y homogénea, observándose la formación de unas estructuras cruciformes, muy recurrentes. El tamaño aproximado de estas estructuras cruciformes era de 22 nm en las dos dimensiones, el doble del diámetro obtenido en estudios previos de este motor en estado hexamérico (Vogelmann et al., 2011).

Como conclusión, podemos decir que en las condiciones de purificación de TraBN270 empleadas en esta tesis, el motor forma estructuras oligoméricas de gran tamaño (superior al hexamérico previamente descrito). Aunque la técnica de análisis por filtración en gel

en una columna Superdex 200 no permitió obtener una MW aproximada del complejo por eluir éste en un volumen cercano al volumen vacío de la columna, la sustitución de una columna Superdex 200 por una Superosa 6 sí permitió acercarnos a una estimación más real de su MW (ver sección 4.2.1. de Resultados). Esta estimación de MW fue de 1120 KDa, compatible con 23-24 subunidades de TraB_{N270}. Así mismo, el análisis de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica mostró la presencia de diferentes estados oligoméricos en la muestra; uno de ellos (43,7 S) compatible con un estado oligomérico compatible con 24 subunidades de proteína.

Teniendo en cuenta los datos anteriormente expuestos, el tamaño de las partículas de TraB_{N270} observado en las micrografías y el grado de simetría cuatro que muestran dichas partículas, podemos postular que las estructuras observadas corresponden a complejos de cuatro hexámeros de proteína unidos.

4.3. Análisis comparativo de la actividad de TraB frente a otros motores implicados en translocar DNA

TraB es un motor molecular de la familia RecA/AAA+ ATPasas, que al igual que TrwB del T4SS, transfiere DNA en el proceso de conjugación bacteriana (Matilla et al., 2010). TrwB transfiere ssDNA a diferencia de TraB, que se encarga de translocar dsDNA de la misma forma que lo hace FtsK, encargada del correcto reparto cromosómico durante el proceso de división bacteriana en *E. coli* (Löwe et al., 2008).

Tal y como se ha indicado al comienzo de esta sección, son tres los motores modelo tomados en esta tesis para estudiar el proceso de transferencia de DNA a través de membranas plasmáticas: FtsK, TraB y TrwB, implicados en la transferencia de dsDNA en el momento de la división bacteriana o en la transferencia del DNA conjugativo en forma de dsDNA o ssDNA, respectivamente. Las tres proteínas forman estructuras hexaméricas y, además, organizan sus dominios de forma muy similar. Disponen de un dominio N-terminal con segmentos transmembrana y un dominio motor estructuralmente muy parecido. Además, FtsK y TraB comparten un dominio C-terminal (dominio γ), implicado en el reconocimiento de una secuencia específica de 8 pares de bases de DNA (Sepulveda et al., 2011). Esta secuencia es específica para cada motor: secuencia TRS en TraB (Reuther et al., 2006) y KOPS en FtsK (Sivanathan et al., 2006).

A continuación, se muestra un esquema con los principales dominios señalados en cada una de estas proteínas:



Figura R36. Representación esquemática de los dominios homólogos de TraB

(*Streptomyces venezuelae*), FtsK (*Pseudomonas aeruginosa*) y TrwB (plásmido R388 de *Escherichia coli*). Las regiones transmembrana (TM) aparecen como barras representadas en color pistacho. Los dominios motores (MD) aparecen representados en azul. Por último, el dominio γ , del cual carece TrwB, está representado en color naranja con la letra γ .

TrwB no posee el dominio C-terminal de reconocimiento de secuencia y su dominio motor presenta una elevada afinidad por estructuras G-quadruplex (Matilla et al., 2010). En este caso, es posible que otra proteína accesoria, TrwA, pudiera estar actuando como su dominio de reconocimiento de secuencia específica (Tato et al., 2007).

La forma en que TraB, FtsK y TrwB organizan sus dominios estructurales es similar, e incluso parecen compartir un historial filogenético común (Peña et al., 2012), donde TraB pudiera hacer de nexo evolutivo. Estructuras G-quadruplex favorecen la hexamerización de TrwB, y también estimulan su actividad ATPasa (Matilla et al., 2010). Las secuencias de reconocimiento específico KOPS y TRS son secuencias ricas en GC y, por lo tanto, susceptibles de formar estructuras G-quadruplex. Por todas las similitudes que comparten esta familia de motores, en esta tesis decidimos ampliar el trabajo de TraB a estos motores y comprobar si todos ellos comparten un mecanismo similar de reconocimiento y translocación sobre el DNA.

4.3.1. Análisis de la actividad ATPasa de TrwB Δ N70 con sustratos G-quadruplex

La actividad ATPasa de TrwB Δ N70 depende de la previa formación de hexámeros (Tato et al., 2007), la forma enzimáticamente activa de TrwB, capaz de llevar a cabo su función ATPasa. En este contexto, es importante tener en cuenta el papel del DNA G-quadruplex, que además de estimular la hexamerización de TrwB Δ N70, estimula su actividad ATPasa.

La actividad ATPasa de TrwB ha sido caracterizada en presencia de ssDNA y dsDNA (Tato et al., 2007), pero no de estructuras G-quadruplex. En este trabajo, se pretendió caracterizar la actividad de la enzima frente a concentraciones crecientes de DNA G-quadruplex. Así mismo, se pretendió comparar dicha actividad con la actividad frente a los otros dos tipos de sustratos de DNA involucrados en el procesamiento de R388, ssDNA y dsDNA .

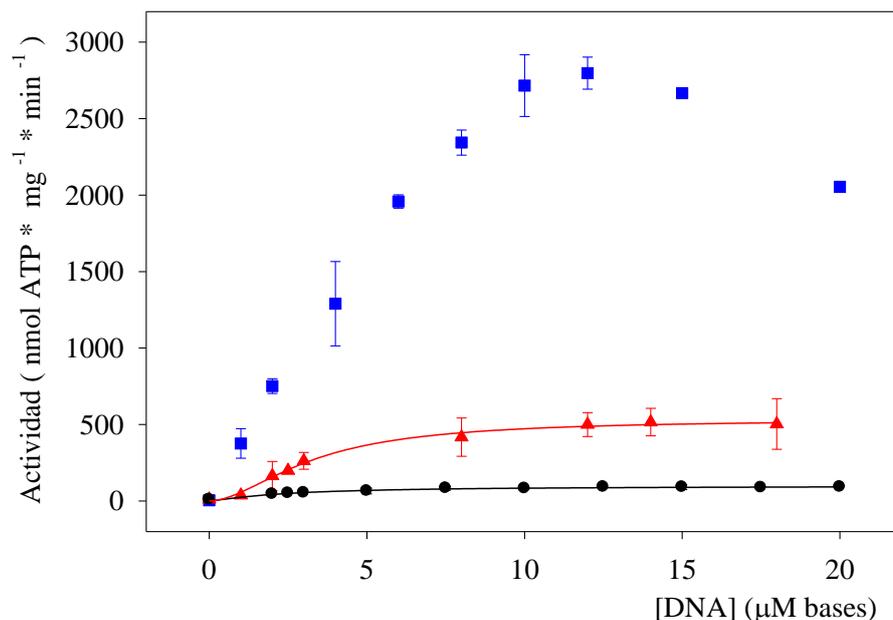


Figura R37. Ensayo ATPasa de TrwBΔN70 frente a diferentes sustratos de DNA. Se ensayó la actividad enzimática de TrwBΔN70 (1 μM), frente a concentraciones crecientes de sustratos de DNA de 45 bases: DNA de cadena simple (oligo E de la Tabla M5)(●), DNA de cadena doble (oligos E y H de la Tabla M5 hibridados) (▲) y DNA G-quadruplex intermolecular (formado con el oligonucleótido U de la Tabla M5)(■).

Los valores de V_{max} que se obtuvieron para los sustratos ssDNA, dsDNA y G-quadruplex fueron de 100 ± 20 , 500 ± 40 y 3100 ± 40 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹, respectivamente.

Tal y como muestra la Figura R38, el sustrato G-quadruplex es capaz de estimular la actividad ATPasa de TrwBΔN70 alcanzando velocidades de reacción 5 y 30 veces superiores a las obtenidas con dsDNA y ssDNA, respectivamente. Destaca la forma decreciente de la curva de actividad que se obtiene en presencia de DNA G-quadruplex. Este efecto ya había sido observado previamente con sustratos de gran tamaño de cadena sencilla (Tato et al., 2007). En su momento, se postuló que la interacción TrwB-TrwB, competía con la interacción TrwB-DNA, esta última de mayor afinidad, de forma que el equilibrio estaba desplazado hacia la interacción TrwB-DNA, desfavoreciendo la formación de hexámeros a medida que aumentaba la concentración de DNA y, por tanto, reduciendo su actividad.

4.3.2. Análisis de la actividad ATPasa de TrwBΔN70 con sustratos G-quadruplex en presencia de TrwA

En estudios previos (Tato et al., 2007), se demostró que TrwA-His inducía la hexamerización de TrwB y estimulaba su actividad ATPasa. El dominio C-terminal de TrwA es el responsable de la interacción y de la estimulación de dicha actividad, mientras que el dominio N-terminal de TrwA está implicado en reconocer una secuencia específica del plásmido en el origen de transferencia (Moncalián & de la Cruz, 2004).

Con el fin de estudiar de forma combinada el efecto de TrwAy el de una estructura secundaria del tipo G-quadruplex en la actividad ATPasa de TrwB, se analizó la actividad de la proteína en presencia de ambos factores.

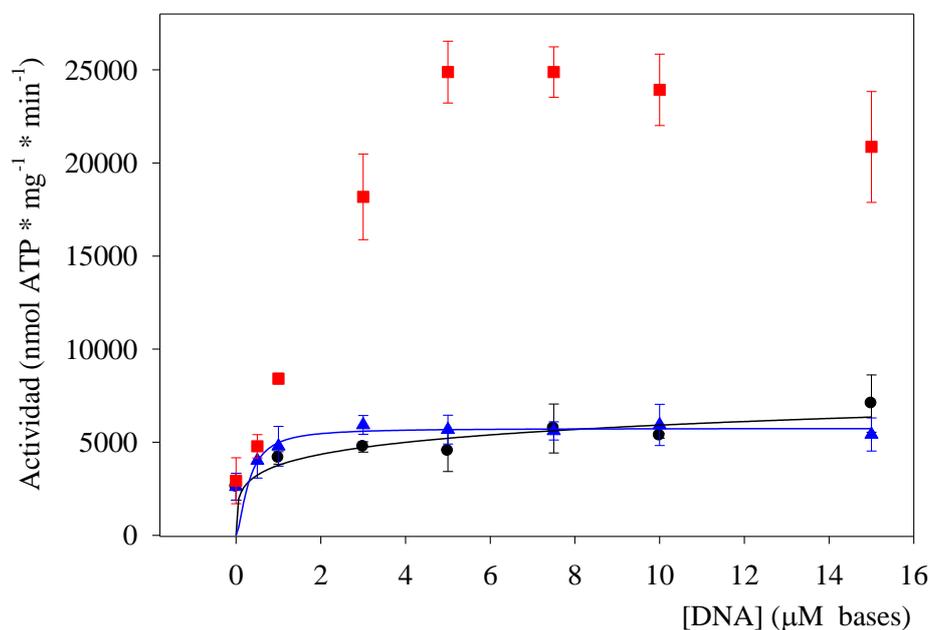


Figura R38. Ensayo ATPasa de TrwBΔN70, en presencia de TrwA-His, frente a diferentes sustratos de DNA. Se ensayó la actividad enzimática de TrwBΔN70 (0,3 μM), en presencia de TrwA-His (0,3 μM), frente a concentraciones crecientes de sustratos de DNA de 45 bases: ssDNA (oligo E de la Tabla M5 M&M)(●), dsDNA (oligos E y H de la Tabla M5 de M&M hibridados) (▲) y DNA G-quadruplex intermolecular (sustrato U de la Tabla M5 de M&M)(■).

Los valores de V_{max} que se obtuvieron para los sustratos de DNA de cadena sencilla, cadena doble y G-quadruplex fueron de 8.300 ± 400 , 5.300 ± 300 y 22.900 ± 900 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹, respectivamente.

Para los tres sustratos, los valores de V_{max} aumentaron considerablemente, casi un orden de magnitud con respecto a los valores obtenidos sin TrwA-His. El DNA G-quadruplex seguía siendo el sustrato que mejor estimulaba la actividad ATPasa de TrwBΔN70. Los valores de actividad obtenidos con DNA G-quadruplex eran cinco veces superiores a los obtenidos con ssDNA y dsDNA.

Otro dato a señalar es que en presencia de TrwA-His, los valores de actividad ATPasa de TrwBΔN70 frente a DNA de cadena sencilla y doble eran similares, presentando en ambos casos una V_{max} próxima a los 5.000 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹.

4.3.3. Análisis comparativo de la actividad ATPasa de RecQ con estructuras G-quadruplex

La proteína RecQ es una enzima helicasa de *E. coli* implicada en procesos de replicación, recombinación y reparación de DNA, y por tanto vital para el mantenimiento de la estabilidad genómica (Bernstein et al. 2003). Es el miembro más representativo de la

familia de helicasas RecQ. Esta multitudinaria familia de proteínas está presente en organismos desde procariotas hasta mamíferos; algunos ejemplos son las proteínas Sgs1 en levaduras o BLM y WRN en humanos, responsables de los síndromes de Bloom y Werner, respectivamente. En todos los miembros de esta familia está descrita su afinidad por estructuras de DNA no canónicas, como el G-quadruplex, siendo capaces de resolver dichas estructuras (Smestad et al., 2015).

RecQ se estructura en dos dominios: un dominio N-terminal de unos 59 kDa, y un dominio C-terminal de unos 9 kDa. El dominio N-terminal posee actividad helicasa y ATPasa. El dominio C-terminal, por otro lado, está relacionado con la capacidad de interacción de la proteína con el DNA.

Tras obtener los datos mostrados en secciones anteriores, en los que se muestra una clara preferencia de motores como TrwB o TraB por estructuras G-quadruplex, decidimos analizar la actividad de RecQ con este tipo de sustratos y compararla con la actividad obtenida por TrwB o TraB.

A continuación, se muestra una gráfica con la actividad ATPasa de RecQ en presencia de diferentes sustratos de DNA.

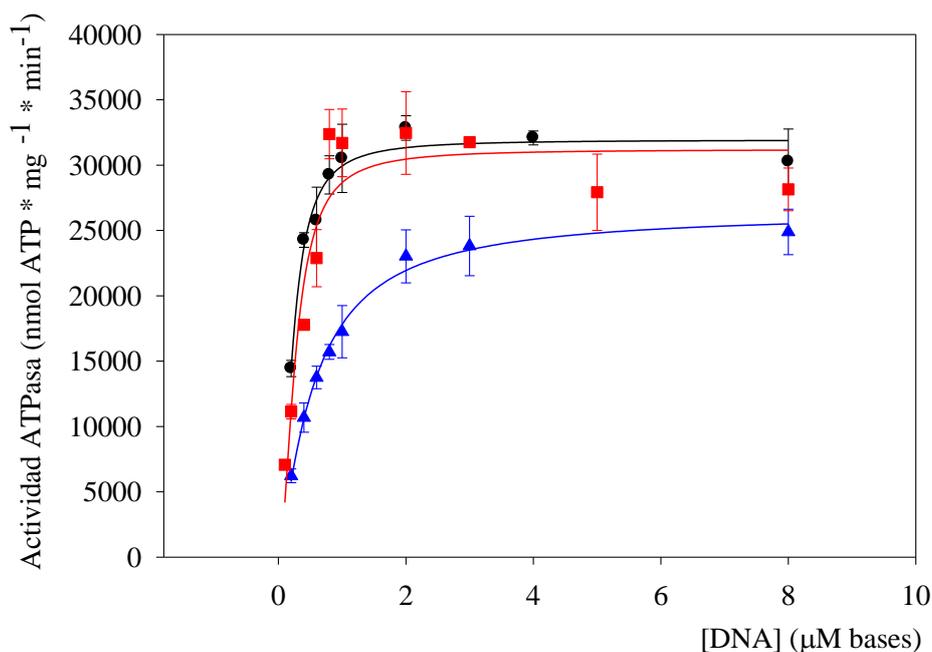


Figura R39. Ensayo de Actividad ATPasa de RecQ frente a diferentes sustratos de DNA. Se ensayó la actividad ATPasa de RecQ (25nM), frente a sustratos ssDNA (oligo E de la Tabla M5 de M&M) (●), dsDNA (oligos E y H de la Tabla M5 de M&M hibridados) (▲) y G-Quadruplex intermolecular (oligonucleótido U de la Tabla M5 de M&M) (■). El medio empleado fue una disolución tampón con 50 mM Tris HCl pH 7,6, 35 mM NaCl, 5 mM MgAc₂, 5% (v/v) de Glicerol, 0,5 mM Fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM ATP, 60 μg/ml de Piruvato Kinasa y 60 μg/ml de Lactato Deshidrogenasa pH 7,6.

Los valores de V_{\max} que se obtuvieron para los sustratos de DNA de cadena sencilla, cadena doble y G-quadruplex fueron de 32.000 ± 700 , 26.700 ± 1200 y 31.400 ± 600 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹, respectivamente.

Tal y como se aprecia en la Figura R40, RecQ presenta mayor actividad con sustratos ssDNA y G-quadruplex, siendo menos efectiva con dsDNA. A pesar de ser un motor cuya función específica es separar estructuras G-quadruplex (Smestad et al., 2015) (Huber et al., 2006), estos resultados muestran que es igual de eficiente con ssDNA, al menos en nuestras condiciones de ensayo.

Los valores de actividad obtenidos con este motor son comparables a los obtenidos con TraB. La actividad detectada para TrwB, sin embargo, es mucho menor. TrwB sólo alcanza valores elevados de actividad (~ 23.000 nmol ATP * min⁻¹ * mg⁻¹) en presencia de la proteína TrwA y DNA G-quadruplex.

4.3.4. Ensayos de Translocación de TrwB Δ N70 sobre diferentes sustratos de DNA

Con estos ensayos se pretendía estudiar un posible desplazamiento de TrwB Δ N70 sobre el DNA. El método empleado fue el descrito en la sección 3.7.7. (M&M), empleado también con la proteína TraB (sección 4.1.4. de Resultados)

Además de analizar la capacidad de TrwB para translocar DNA, se pretendía estudiar también la capacidad de TrwA de estimular el proceso. Para ello, se llevaron a cabo ensayos con TrwB Δ N70 frente a diferentes sustratos de DNA, en presencia o ausencia de TrwA.

Ensayos de translocación de TrwB Δ N70 sobre ssDNA en dirección 5'3'

El primer sustrato ensayado fue un oligonucleótido de secuencia inespecífica (oligonucleótido G de la Tabla M5 de M&M), marcado en el extremo 5' con Fluoresceína, y en 3', con Biotina. Esta disposición, permite ensayar si TrwB Δ N70 transloca sobre DNA de cadena sencilla en dirección 5'-3'. A continuación, se muestra una figura con los resultados obtenidos.

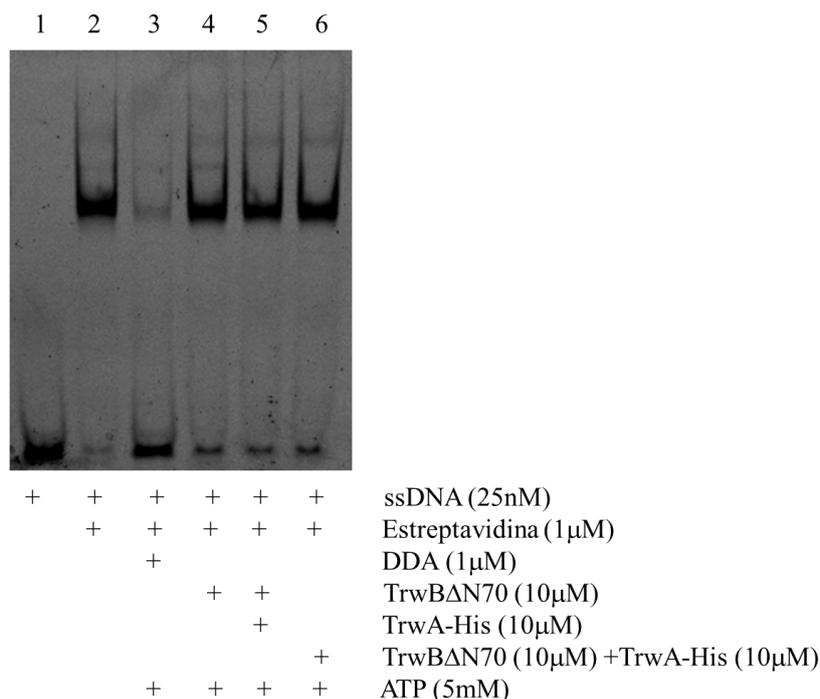


Figura R40. Ensayo de translocación de TrwBΔN70 frente a DNA de cadena sencilla.

Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 6,2, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol. El oligonucleótido G (Tabla M5 de M&M) (25 nM) se incubó durante 10 minutos en baño de hielo con Estreptavidina y el complejo resultante fue usado como sustrato de reacción. Tras añadir la enzima correspondiente a cada muestra, se añadió ATP (5 mM) para iniciar la reacción, y Biotina (10 µM), con el fin de unir la Estreptavidina que pudiera quedar libre por la acción de la actividad de translocación del motor. La reacción se incubó durante 10 minutos y para finalizarla se empleó un buffer idéntico al de reacción con Proteinasa-K a 0,2 mg/ml.

La figura muestra perfectamente el retardo del DNA tras la unión con Estreptavidina (calle 2). En la calle 3, se empleó el motor Dda (1 µM) como control positivo del ensayo (Byrd & Raney, 2006). En las calles 4,5 y 6, se empleó TrwBΔN70, TrwBΔN70 con TrwA-His incubados por separado, y TrwBΔN70 con TrwA-His previamente incubados.

Las muestras 4,5, y 6 apenas presentan diferencia con la muestra 2, en la que no se ha añadido ninguna proteína, lo cual indica que TrwB, al menos en estas condiciones, no es capaz de translocar el DNA con la suficiente fuerza para disociar el complejo Estreptavidina-Biotina. También es posible concluir, al no apreciarse una diferencia clara entre las muestras 4, 5 y 6, que la interacción con TrwA-His no estimulaba una actividad translocasa en TrwBΔN70.

Ensayos de translocación de TrwBΔN70 sobre ssDNA en dirección 3' - 5'

A continuación, se ensayó un sustrato de cadena sencilla marcado a la inversa del anterior, con Biotina en el extremo 5' y en 3', con Fluoresceína. De este modo, se pretendía estudiar si se producía translocación en sentido 3' - 5'. Los resultados se muestran a continuación, en la Figura R42.

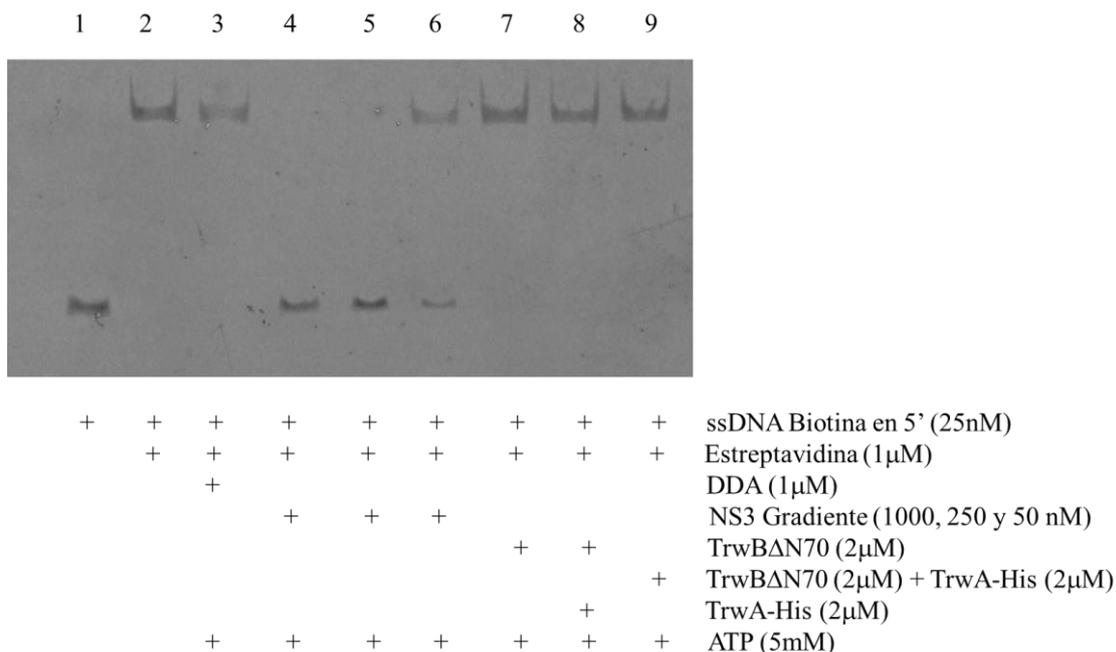


Figura R41. Ensayo de translocación de TrwBΔN70 frente a DNA de cadena sencilla en dirección 3'-5'. Ensayo de translocación de TrwBΔN70 (2 μM) frente a sustrato de DNA monocadena de 45 bases. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 6,2, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol. En el ensayo, se empleó un oligonucleótido T (Tabla M5 M&M) de 45 bases, marcado en 5', con Biotina y en 3', con Fluoresceína. Posteriormente, se incubó 10 minutos en baño de hielo con Estreptavidina. El complejo resultante fue usado como sustrato de reacción. Tras añadirse la enzima correspondiente a cada muestra, se añadió ATP (5 mM) para iniciar la reacción, y Biotina (10 μM), para acomplejar la posible Estreptavidina separada del complejo DNA-Estreptavidina. Se incubó la reacción durante 10 minutos, y para finalizarla se empleó un buffer idéntico al de reacción, pero con Proteinasa-K a 0,2 mg/ml.

La figura muestra el retardo del DNA tras la unión con Estreptavidina (calle 2). En la calle 3, se empleó el motor Dda (1 μM) como control negativo del ensayo dado que transloca sobre ssDNA sólo en sentido 5'-3' (Byrd et al., 2006). En las calles 4,5 y 6, se empleó el motor NS3 como control positivo del ensayo, ya que es capaz de translocar ssDNA sólo en sentido 3'-5' (Matlock et al., 2010). Se empleó en gradiente debido a que bajo estas condiciones se desconocía la concentración óptima de ensayo. Para las calles 7, 8 y 9, se emplearon respectivamente, TrwBΔN70, TrwBΔN70 con TrwA-His incubados por separado, y TrwBΔN70 con TrwA-His previamente incubados.

Las calles 7, 8 y 9 indican que TrwB, al menos en estas condiciones, no es capaz de translocar el DNA con la suficiente fuerza para disociar el complejo Estreptavidina-Biotina. También es posible concluir que la interacción con TrwA-His no es capaz de estimular una actividad translocasa en TrwBΔN70 al no apreciarse ninguna diferencia entre estas calles.

Ensayos de translocación de TrwBΔ70 sobre dsDNA

El siguiente sustrato ensayado fue DNA de cadena doble. Se emplearon los oligonucleótidos G y H (Tabla M5 de M&M) hibridados, siguiendo el protocolo descrito

en M&M (sección 3.5.2.1.). El oligonucleótido H se utilizó sin marcar, de modo que el marcaje con Biotina y Fluoresceína lo portaba exclusivamente el oligonucleótido G. Los resultados se muestran a continuación, en la Figura R42:

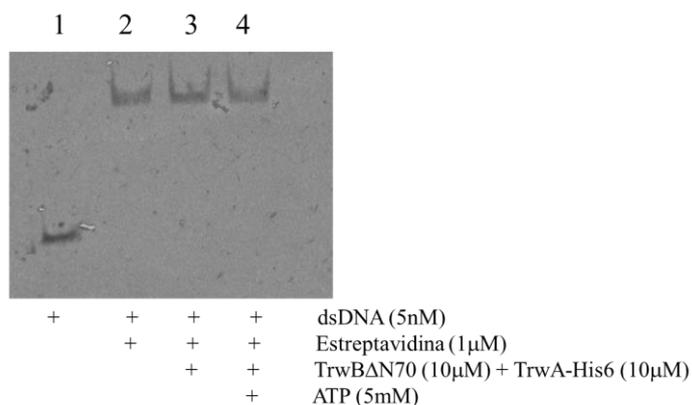


Figura R42. Ensayo de translocación de TrwBΔN70 frente a DNA doble cadena.

Ensayo de translocación de TrwBΔN70 (10 μM) con TrwA-His6 (10 μM) frente a sustrato de DNA doble cadena de 45 bases. Se empleó un medio con 50 mM de Pipes pH 6,2, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol. En el ensayo, se empleó dsDNA de 45 bases, el cual se incubó 10 minutos en baño de hielo con Estreptavidina, y el complejo resultante fue usado como sustrato de reacción. Tras añadirse la enzima correspondiente a cada muestra, se añadió ATP (5 mM) para iniciar la reacción, y Biotina (10 μM) para acomplejar la Estreptavidina que pudiera separarse del complejo DNA-Estreptavidina. Se incubó la reacción durante 10 minutos, y para finalizarla se empleó un buffer idéntico al de reacción, pero con Proteinasa-K a 0,2 mg/ml.

La Figura R42 muestra el retardo del DNA tras la unión con Estreptavidina (calle 2). En la calle 3, se empleó TrwBΔN70 con TrwA-His incubados previamente en ausencia de ATP. La calle 4 fue similar a la 3 pero en presencia de ATP.

La calle 4 indica que, bajo estas condiciones, TrwBΔN70 no es capaz de translocar el DNA con la suficiente fuerza para disociar el complejo Estreptavidina-Biotina.

Ensayos de translocación de TrwBΔN70 sobre DNA G-quadruplex

El último sustrato ensayado fue DNA G-quadruplex intermolecular. Previamente, se llevó a cabo el protocolo de formación G-quadruplex, a partir del oligonucleótido W (Tabla M5 de M&M) marcado en el extremo 5' con Fluoresceína y en 3' con Biotina. Los resultados del ensayo de translocación pueden verse a continuación, en la Figura R43:

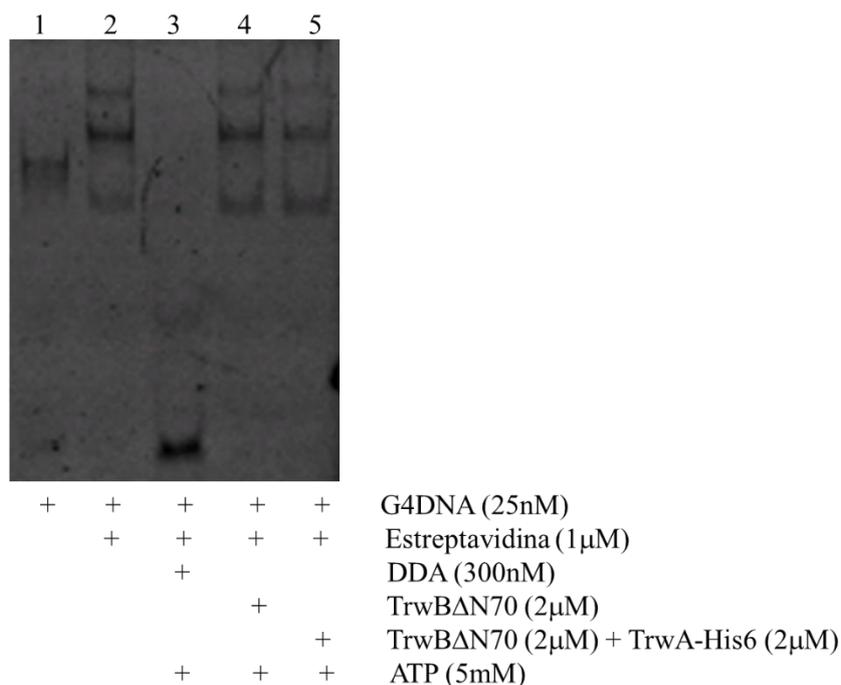


Figura R43. Ensayo de translocación de TrwBΔN70 frente a DNA G-quadruplex de 45 bases. Ensayo de translocación de TrwBΔN70 (2 μM) con y sin TrwA-His (2 μM), frente a sustrato de DNA G-Quadruplex de 45 bases. Se empleó un medio con 50 mM de Pipes pH 6,2, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol. El sustrato G-Quadruplex formado se incubó 10 minutos en baño de hielo con Estreptavidina, y el complejo resultante fue usado como sustrato de reacción. Tras añadirse la enzima correspondiente a cada muestra, se añadió ATP (5 mM) para iniciar la reacción, y Biotina (10 μM), para acomplejar la Estreptavidina que pudiera separarse del complejo DNA-Estreptavidina. Se incubó la reacción durante 10 minutos, y para finalizarla, se empleó un buffer idéntico al de reacción, pero con Proteinasa-K a 0,2 mg/ml.

La Figura R43 muestra el retardo del DNA tras la unión con Estreptavidina (calle 2). Como puede observarse, la Estreptavidina interactúa con el DNA G-quadruplex dando lugar a 3 bandas diferentes. Probablemente, la banda inferior corresponde a ssDNA disociado del G-quadruplex y acomplejado con Estreptavidina. Las dos bandas superiores podrían corresponder a 1 ó 2 complejos, respectivamente, del DNA G-quadruplex con Estreptavidina. En la calle 3, se ha empleado Dda como control positivo de la reacción. Tal y como puede observarse en la figura, Dda es capaz de translocar sobre DNA G-quadruplex y disociarlo, una actividad que hasta el momento no había sido descrita. En las calles 4 y 5 se empleó TrwBΔN70 con TrwA-His incubados por separado, y TrwBΔN70 con TrwA-His previamente incubados.

Las calles 4 y 5 indican que TrwB, al menos en estas condiciones, no es capaz de translocar sobre este sustrato de DNA con la suficiente fuerza para disociar el complejo Estreptavidina-Biotina. También es posible concluir, al no apreciarse diferencia entre las calles 4 y 5, que la interacción con TrwA-His no estimula una actividad translocasa en TrwBΔN70.

4.3.5. Ensayos de translocación del motor molecular TrwC

TrwC es una proteína de gran tamaño (966 aminoácidos), esencial en el plásmido conjugativo R388. Presenta un dominio N-terminal relaxasa y un dominio C-terminal helicasa necesario para la conjugación (César et al., 2006) (Fernandez-Lopez et al., 2006).

El dominio N-terminal relaxasa (N293) permite a la enzima cortar DNA superenrollado, unir de forma covalente ssDNA y transferirlo a otra célula (César & Llosa, 2007).

El dominio helicasa es similar al que presenta enzima RecD2 de *Deinococcus radiodurans* (Saikrishnan et al., 2008), perteneciendo a la superfamilia de helicasas SF1B que translocan DNA en dirección 5'-3'. En este dominio se localizan la actividad helicasa y la actividad ATPasa (César & Llosa, 2007). La elevada actividad ATPasa de la que dispone TrwC (~180.000 nmol ATP * mg⁻¹* min⁻¹) está ligada a su actividad helicasa (Grandoso et al., 1994). Además, esta actividad está ligada a su capacidad para translocar sobre el DNA. Por este motivo, nos propusimos analizar si TrwC era capaz de translocar sobre el DNA con suficiente fuerza para desplazar la Estreptavidina unida al DNA en un ensayo de translocación. A continuación, en la Figura R45, se muestra el resultado obtenido mediante el empleo de TrwC en un ensayo de translocación con un sustrato ssDNA de 45 bases (oligo G de la Tabla M5 de M&M).

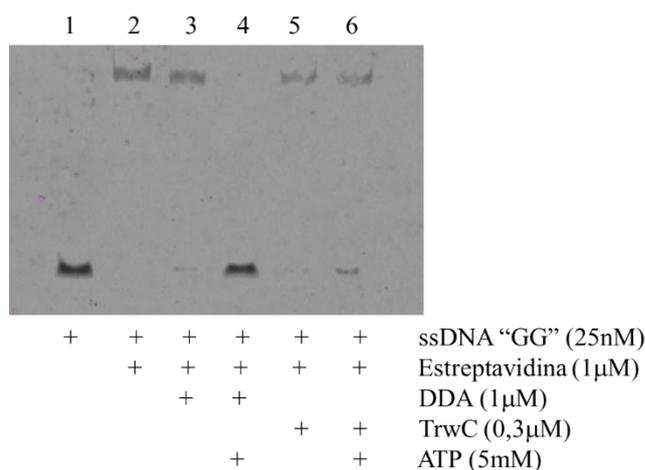


Figura R44. Ensayo de Translocación de TrwC sobre ssDNA de 45 bases. Se empleó un medio con 50 mM Pipes pH 6,8, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 % (v/v) de Glicerol. En el ensayo, se empleó DNA monocadena de 45 bases, marcado en 5' con fluoresceína, y en el extremo 3', con Biotina. Posteriormente, se incubó 10 minutos en baño de hielo con Estreptavidina, y el complejo resultante fue usado como sustrato de reacción. Tras añadirse la enzima correspondiente a cada muestra, se añadió ATP (5 mM) para iniciar la reacción, y Biotina (10 µM), para acomplejar la posible Estreptavidina separada del complejo DNA-Estreptavidina. Se incubó la reacción durante 10 minutos, y para finalizarla, se empleó una disolución tampón idéntica a la de reacción, pero con Proteinasa-K a 0,2 mg/ml.

La Figura R44 muestra el retardo del DNA tras la unión con Estreptavidina (calle 2). En las calles 3 y 4, se ha empleado Dda como control positivo. En las calles 5 y 6 se ha empleado TrwC, pero sólo en la muestra 6 se ha añadido ATP.

Tal y como muestra la figura, TrwC es capaz de translocar sobre ssDNA en dirección 5'-3' en presencia de ATP (calle 6, Figura R45). A pesar de que la banda correspondiente al DNA disociado por TrwC es muy tenue (23% de disociación), es importante señalar que la concentración de TrwC empleada (0,3 μ M) fue inferior a la del control Dda (1 μ M).

4.4. Estructuras G-quadruplex y su implicación en motores moleculares que translocan DNA

4.4.1. Búsqueda de secuencias tipo G-quadruplex en plásmidos de interés utilizando herramientas bioinformáticas

Como se ha citado en el capítulo de Introducción, la presencia de G-Quadruplex se expande a lo largo de todo el genoma humano (Huppert et al., 2005), y está implicada en procesos clave de regulación génica (Huppert et al., 2007)(Rhodes et al., 2015). Su estudio está suscitando muchísimo interés. Es importante conocer su estructura, los factores involucrados en su formación y estabilización, etc. Esta estructura podría ser la clave para intervenir en procesos como el metabolismo, envejecimiento y cáncer.

Además del papel que juega este tipo de estructuras en los procesos de replicación y transcripción del DNA, recientemente se ha descrito una asociación de estructuras G-quadruplex a virulencia en muchos tipos de microorganismos (Harris & Merrick, 2015). Puesto que TrwB, una proteína esencial en el mecanismo de la conjugación bacteriana, presenta una elevada afinidad por este tipo de estructuras, nos planteamos estudiar si los plásmidos conjugativos pudieran presentar este tipo de estructuras G-quadruplex como un mecanismo de reconocimiento en esta familia de motores. Si fuese así, estas estructuras podrían convertirse en susceptibles dianas para inhibir el proceso conjugativo, uno de los principales mecanismos de diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

4.4.1.1. Análisis de secuencias en el plásmido R388

TrwB es el motor implicado en la transferencia de una copia del plásmido R388 en forma de cadena sencilla a la célula receptora. Por este motivo, comenzamos este análisis de búsqueda de potenciales secuencias G-quadruplex en el plásmido R388. Para ello, se empleó el programa online de predicción de estructura "QGRS mapper" (Kikin et al., 2006), al que se le suministró como argumento la secuencia de R388.

Tras el análisis, el programa reconoció dos secuencias candidatas en R388, una de ellas sobre la hebra líder y la otra sobre la hebra complementaria. Ambas secuencias aparecen representadas en el panel superior de la Figura R45.

Posteriormente, se analizó la ubicación de ambas secuencias utilizando el programa "Vector NTI" (ThermoFisher Scientific). La secuencia encontrada sobre la hebra líder estaba dentro de la secuencia del gen *trwC*. La segunda secuencia se encontraba en una región intergénica próxima al gen *stbC*. La posición de ambas se indica en el panel inferior de la siguiente Figura R45.

	Hebra	Inicio	Fin	Secuencia
+ G4 1	+	15528	15552	GGGGAGGGGTGAGGGGGGAGAGGGG
- G4 2	-	21527	21551	GGGCTTGGGAACGGCAGGGAAGGG

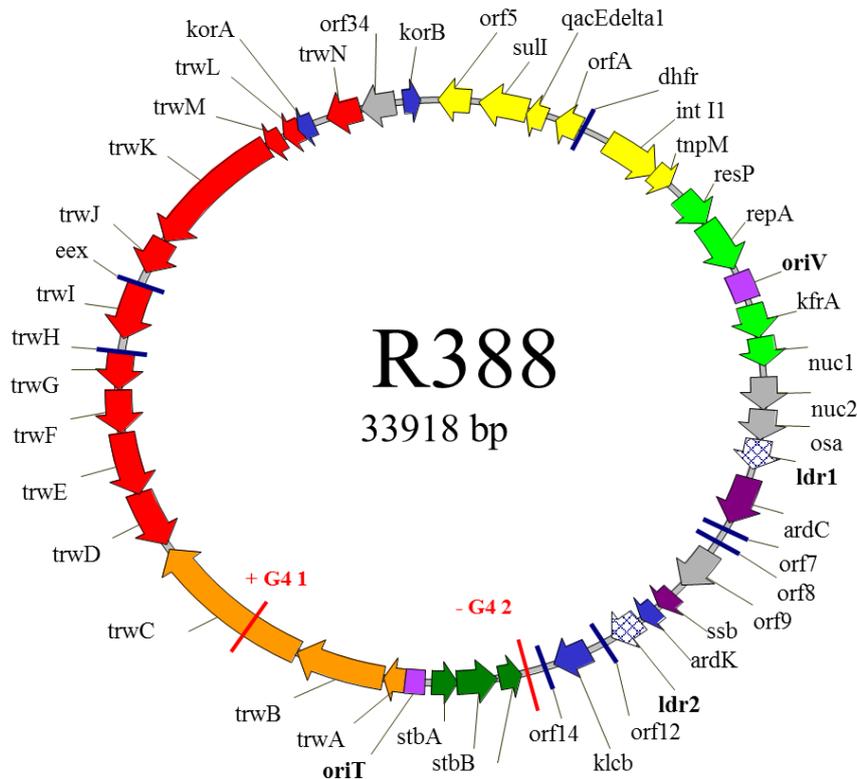


Figura R45. Esquema del plásmido R388 de *Escherichia coli* y localización de potenciales secuencias G-Quádruplex. El panel superior muestra las 2 secuencias G-quadruplex encontradas sobre la secuencia del plásmido R388 (Genbank id: BR000038.1) utilizando el programa “GQRS mapper”. En el panel inferior, aparece representado el plásmido R388 con la localización de las 2 secuencias encontradas en rojo. Modificación de figura tomada de Fernández-López et al., (2006).

4.4.1.2. Análisis estadístico en relación a la significancia de los datos obtenidos para secuencias G-quadruplex en R388

Para comprobar si la predicción de dos potenciales secuencias G-quadruplex en R388 era relevante o simplemente era el número que se esperaría encontrar de forma casuística en función del tamaño de secuencia del plásmido, se realizó un pequeño estudio. Se comparó el número de potenciales secuencias G-quadruplex encontradas en R388 con el número de secuencias G-quadruplex potenciales que se podían identificar en plásmidos homólogos y en plásmidos elegidos aleatoriamente.

Para la elección de plásmidos homólogos, se llevó a cabo el siguiente protocolo. Se empleó la secuencia del gen *trwB* para realizar un “BLAST” e identificar secuencias homólogas de otros plásmidos a partir de la secuencia suministrada (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De entre estos plásmidos, se eligieron 6, cuyo tamaño y proporción de secuencia GC era similar a R388 (en torno a 33.000 pb y 58% de

contenido en GC). Los plásmidos seleccionados fueron pMAK3, R7K, pXCV38, NAH7, pXAC64 y pXcB.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NC_009982.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin plasmid pMAK3, c	2749	2749	100%	0.0	100%
NC_010643.1	Providencia rettgeri plasmid R7K, complete sequence >emb AM90156	2518	2518	100%	0.0	96%
NC_010716.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin plasmid IncW pIE:	2298	2298	100%	0.0	93%
NC_011891.1	Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1, complete genome >qb CP00	302	302	74%	8e-78	66%
NC_010170.1	Bordetella petrii DSM 12804, complete genome >emb AM902716.1 E	172	172	35%	1e-38	67%
NC_007506.1	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10 plasmid pXCV38,	78.8	78.8	11%	2e-10	69%
NC_005240.1	Xanthomonas citri plasmid pXcB, complete sequence >qb AY228335.	73.4	73.4	3%	7e-09	88%
NC_007926.1	Pseudomonas putida plasmid NAH7, complete sequence >dbj AB2376	57.2	57.2	7%	6e-04	72%
NC_003922.1	Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306 plasmid pXAC64, complete	57.2	57.2	3%	6e-04	83%
NC_012695.1	Burkholderia pseudomallei MSHR346 chromosome I, complete genome	53.6	53.6	2%	0.007	88%
NC_012674.1	Pseudomonas fluorescens plasmid pNAH20, complete sequence >qb	53.6	53.6	3%	0.007	80%
NC_009080.1	Burkholderia mallei NCTC 10247 chromosome I, complete genome >qt	53.6	53.6	2%	0.007	88%
NC_009076.1	Burkholderia pseudomallei 1106a chromosome I, complete genome >c	53.6	53.6	2%	0.007	88%
NC_009074.1	Burkholderia pseudomallei 668 chromosome I, complete genome >qb	53.6	53.6	2%	0.007	88%
NC_008836.1	Burkholderia mallei NCTC 10229 chromosome I, complete sequence >	53.6	53.6	2%	0.007	88%
NC_008785.1	Burkholderia mallei SAVP1 chromosome I, complete genome	53.6	53.6	2%	0.007	88%
NC_006348.1	Burkholderia mallei ATCC 23344 chromosome chromosome 1, complet	53.6	53.6	2%	0.007	88%
NC_004999.1	Pseudomonas putida NCIB 9816-4 plasmid pDTG1, complete sequenc	53.6	53.6	3%	0.007	80%
NC_010891.1	Pseudomonas sp. CT14 plasmid pCT14, complete sequence >qb DQ1	48.2	48.2	4%	0.29	74%
NC_013131.1	Catenulispora acidiphila DSM 44928 chromosome, complete genome :	46.4	46.4	2%	1.00	89%
NC_010645.1	Bordetella avium 197N chromosome, complete genome >emb AM167	46.4	46.4	2%	1.00	89%
NC_007969.1	Psychrobacter cryohalolentis K5, complete genome >qb CP000323.1	46.4	46.4	2%	1.00	88%

Figura R46. BLAST realizado sobre la secuencia del gen *trwB*. Las flechas en rojo señalan los plásmidos elegidos, cuyas secuencias tenían un tamaño y contenido en GC similar a R388.

Otros seis plásmidos sin homología con R388 se seleccionaron aleatoriamente. Todos ellos tenían un tamaño y contenido en GC similar a R388. Fueron los plásmidos pBGR3, GRL1112, pACMV4, pP742404, cp32-3 y pAph03.

Los últimos 6 plásmidos sin homología se generaron bioinformáticamente. Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Fernandez Lanza. El programa se diseñó en Bioperl (<http://bioperl.org>) y generaba aleatoriamente secuencias empleando 4 letras, A, T, G y C. Además, el tamaño de dicha secuencia era de 33.000 letras, y el porcentaje de letras G y C era del 58 %. Los seis plásmidos se llamaron pRAND1, pRAND2, pRAND3, pRAND4, pRAND5 y pRAND 6.

Por último, la secuencia de todos estos plásmidos se analizó con el programa QGRS, de predicción de estructuras G-quadruplex. De este modo, se pudo analizar el número de potenciales secuencias G-quadruplex intramoleculares encontradas. Los resultados se muestran a continuación, en la Figura R47.

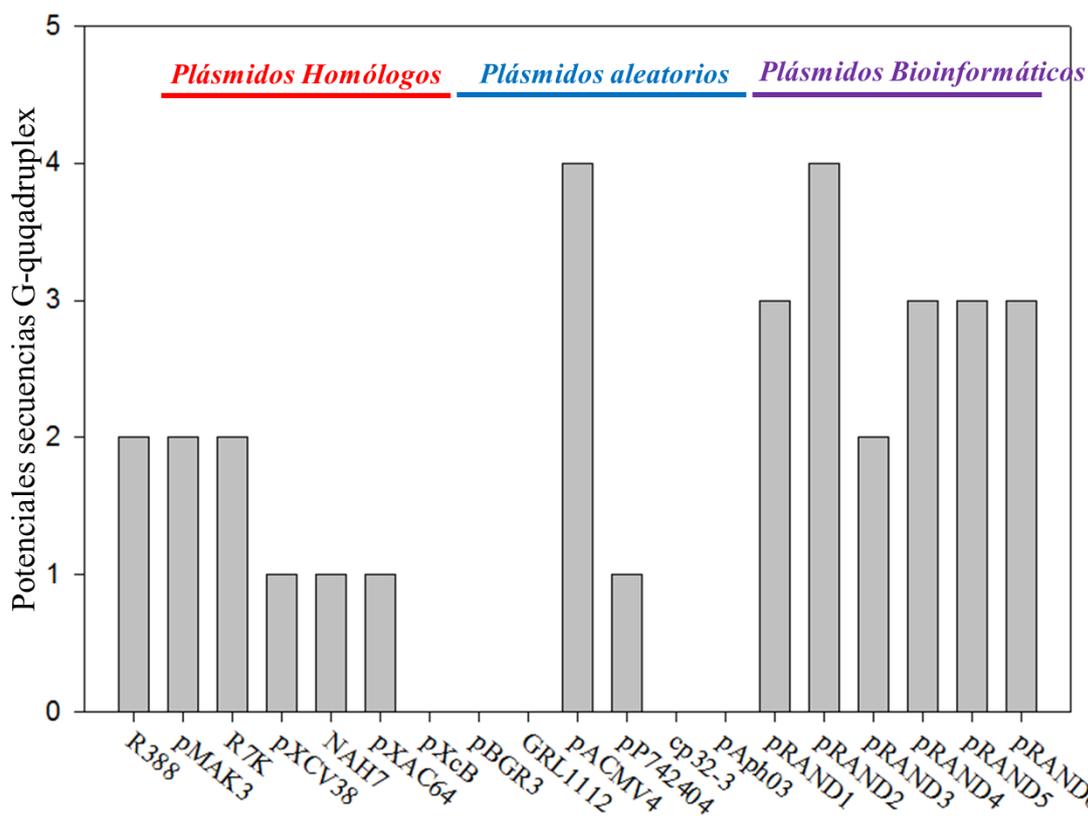


Figura R47. N° de potenciales secuencias G-quadruplex sobre R388 y otros plásmidos de interés. En esta figura, aparece representado el n° de potenciales secuencias G-quadruplex encontradas sobre el plásmido R388 y otros plásmidos. El primer grupo, destacado con una barra roja, son plásmidos homólogos de R388. El segundo grupo, destacado con una barra azul, son plásmidos elegidos aleatoriamente. El tercer y último grupo, destacado con una barra violeta, son plásmidos generados bioinformáticamente.

Este estudio, muy preliminar, no parece indicar que existan diferencias significativas. El número de potenciales secuencias era variable dependiendo del tipo de plásmido analizado. Estadísticamente, en una secuencia aleatoria del mismo tamaño sería esperable encontrar un número mayor de potenciales secuencias G-quadruplex, y efectivamente esto es lo que ocurre en el bloque de plásmidos generados informáticamente, lo cual podría indicar un cierto mecanismo “restrictivo” a la hora de seleccionar este tipo de secuencias en un plásmido. En cualquier caso, para poder sacar conclusiones más claras de este tipo de análisis sería necesario emplear un número mucho más elevado de secuencias.

4.4.1.3. Análisis de secuencias en el plásmido pSVH1

TraB debe transferir el plásmido pSVH1 durante la conjugación de *Streptomyces venezuelae* (Sepulveda et al., 2011). Tal y como se ha mencionado en la introducción, translocaría DNA de doble cadena, reconociendo previamente en el DNA plasmídico secuencias de 8 pb denominadas TRS (Vogelmann et al., 2011). La región *clt* del plásmido, con secuencias TRS distribuidas consecutivamente, cumplirían con la secuencia consenso de formación G4 intramolecular, de modo que se rastreó la secuencia del plásmido pSVH1 en busca de potenciales secuencias G-Quádruplex.

Se suministró la secuencia del plásmido pSVH1 al programa “QGRS mapper”, y el programa mostró una secuencia candidata sobre la hebra líder, y 6 secuencias sobre la hebra complementaria. Las secuencias aparecen representadas en el panel superior de la Figura R48.

	Hebra	Inicio	Fin	Secuencia
+ G4 1	+	6173	6195	GGGCTGGGCCGCTGGGCCGGG
- G4 1	-	2603	2633	GGGAAAGTCAGACATGGGCCGGGGCATGGG
- G4 2	-	3047	3076	GGGTACGGTCCGGGCTCGGGGCCGGCGGG
- G4 3	-	4416	4446	GGGTCGGGCACTCCGGCGTCCGGGTCGGGG
- G4 4	-	6726	6756	GGGACCGAGGCCGGGGCGGGGAGAGTGGGG
- G4 5	-	6902	6932	GGGGGTGGGTCAGAACTGGGCGAGGCCGGGG
- G4 6	-	7466	7496	GGGCGAGGGCCGAAGCCGGGCCCTGAGGG

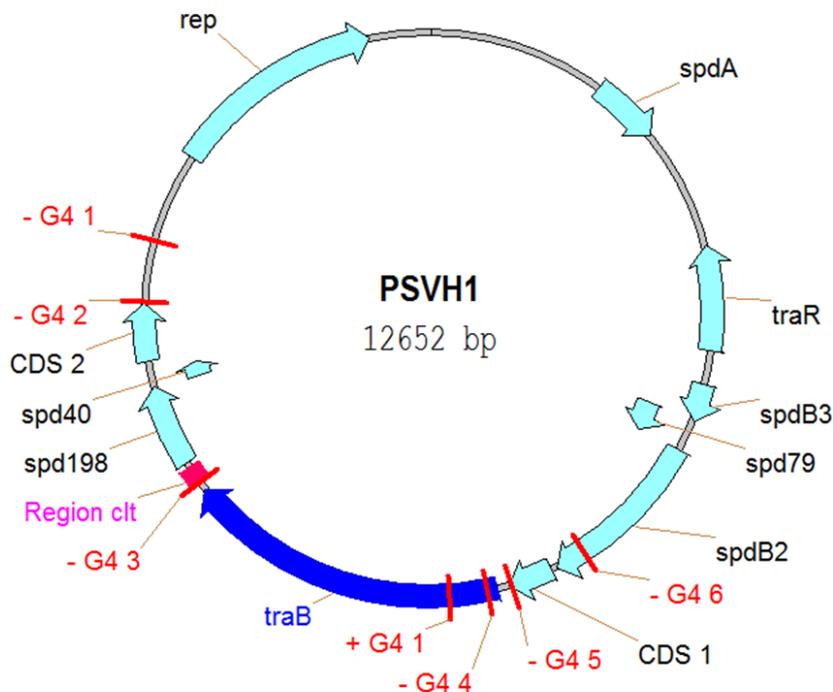


Figura R48. Plásmido pSVH1 de *Streptomyces venezuelae* y localización de secuencias G-Quádruplex. El panel superior muestra las secuencias G-quádruplex encontradas sobre pSVH1 obtenidas utilizando el programa “QGRS mapper”. El panel inferior representa la localización de las secuencias G-quádruplex sobre la secuencia del plásmido pSVH1 (GenBank id: AM087403.1).

Una vez se obtuvieron las secuencias G-quádruplex del plásmido, se localizaron utilizando el programa “Vector NTI” (ThermoFisher Scientific). Su localización aparece representada en el panel inferior de la Figura R48. Dos de ellas, “+ G4 1” y “-G4 4”, se encuentran dentro de la secuencia del gen *traB*; el resto muy próximas a él. Cabe destacar una de las secuencias sobre la hebra complementaria, la secuencia “-G4 3”, dentro de la región *clt*, constituida por dos secuencias TRS.

Finalmente, suscita interés el hecho de que no haya secuencias G-quadruplex de la hebra líder intercaladas con la hebra complementaria; algo que podría estar sugiriendo direccionalidad. Es de destacar también el hecho de que las posibles secuencias G-quadruplex se encuentren restringidas en un solo tercio de la longitud de la molécula de pSVH1, próximas a la región *clt*. La probabilidad de que este fenómeno suceda de forma casuística es pequeña. El plásmido pSVH1, con un contenido en GC del 71 % distribuido homogéneamente por toda la molécula, debería tener sus potenciales secuencias G-quadruplex también distribuidas de forma homogénea a lo largo del plásmido. De esta forma podemos sugerir que podría existir una razón biológica que explique esta distribución.

4.4.2. Análisis de la capacidad de secuencias localizadas en R388 y pSVH1 para formar estructuras G-quadruplex

4.4.2.1 Análisis con secuencias del plásmido R388

Puesto que el análisis *in silico* de potenciales secuencias G-quadruplex en el plásmido R388 no pudo ser conclusivo, decidimos analizar *in vitro* la capacidad de estas secuencias de formar este tipo de estructuras. Para ello, seleccionamos la secuencia cercana al gen *stbC*; un fragmento de 50 bases designado como “Y” (Tabla M5 de M&M):

ATCGTGCGCGA **GGG**CTT **GGG**AACGGCAGGGAA **GGG**CATCGAGTTCGATAC

Para su estudio estructural se eligió la técnica de cromatografía de filtración en gel.

Para este estudio, se emplearon 3 muestras. La primera consistió en una disolución 10 μ M del oligonucleótido “Y” en agua destilada. La segunda, en una disolución 10 μ M del oligonucleótido tratado con el protocolo de formación de G-quadruplex intramolecular (sección 3.5.2.2. M&M), disuelto por lo tanto en buffer de formación de G4 intramolecular (20 mM Pipes pH 6,2, 150 mM Na⁺ y 0,1 mM EDTA). La tercera y última muestra consistió en una disolución 10 μ M de “Y” en el buffer anterior junto a 50 μ M de N-metil-Mesoporfirina (NMM). NMM es un ligando de G-quadruplex que contribuye a su estabilización (Beaume et al., 2013). De este modo, para la tercera muestra, se incubó el oligonucleótido en dicho buffer, junto a NMM, durante 3 minutos, a 95°C, y posteriormente, se dejó enfriar lentamente hasta T^a ambiente. Los resultados pueden observarse en la Figura R49, representada a continuación.

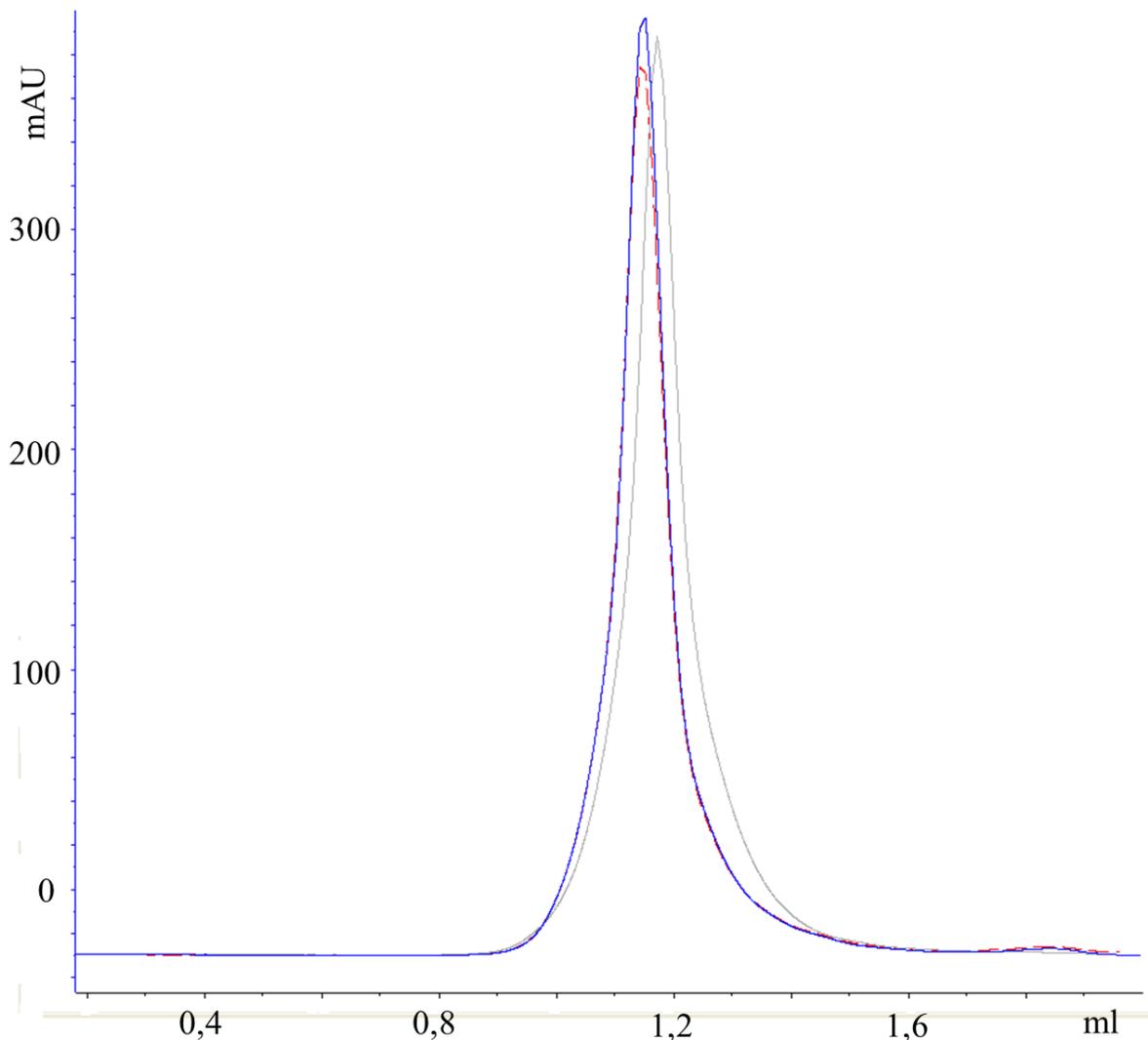


Figura R49. Ensayo de filtración en gel sobre oligonucleótido “Y” (Tabla M5 M&M) sometido a diferentes tratamientos. Se emplea una columna Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare). La línea azul representa el perfil cromatográfico del oligonucleótido disuelto en agua MilliQ sin tratamiento. La línea gris representa el perfil de elución del oligonucleótido después de ser tratado para formar G-quadruplex y, por último, la línea roja discontinua representa el perfil de elución del oligonucleótido tras ser incubado además con NMM.

El volumen de elución para el oligonucleótido “Y” fue similar en los tres casos ($V_e \sim 1,2$ ml).

4.4.2.2. Análisis con secuencias del plásmido pSVH1

Secuencias *clt*

Para continuar con los estudios sobre el plásmido pSVH1, se decidió realizar un análisis estructural sobre una de las potenciales secuencias G-quadruplex. La secuencia elegida fue la secuencia complementaria a la encontrada en la región *clt*. Constaba de 65 bases y se denominó “JJ” (Tabla M5 de M&M):

TCCGGGCCCACCCGGACGC GGGCGTCCGGGTCGGGCACTCCGGCGTCCGG
 GTCGGGGCCCGGTC

Así mismo, decidimos analizar también la secuencia complementaria, rica en citosinas, ante la posibilidad de que pudiera formar estructuras G-quádruplex del tipo i-motif (Day et al., 2014), Esta secuencia, rica en citosinas, se denominó “HH” (Tabla M5 de M&M) y su secuencia se detalla a continuación:

GACCGGGCCCCGA CCCGGACGCCGGAGTGCCCGA CCCC-
 GACGCCCGCGTCCGGGTCGGG CCGGA

Los oligonucleótidos “JJ” e “HH” se encargaron a la casa comercial Sigma Aldrich, marcados con Fluoresceína en el extremo 5’, y se designaron como “KK” y “II”, respectivamente.

La técnica empleada para su estudio fue retardo en gel no desnaturizante.

A

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia
EE	ssDNA (65-mer) sin secuencia específica	[Flc]ACGAAAACCTGTGTAGTGTAAAGGACGAAAACCTG TGTAAGTGTATGCCACTACAATATTGCCGC
KK	ssDNA (65-mer) secuencia complementaria a "clt"	[Flc]TCCGGGCCCGACCCGGACGCGGGCGTCCGGGTCCG GCACTCCGGCGTCCGGGTCGGGGCCCGGTC
II	ssDNA (65-mer) secuencia "clt"	[Flc]GACCGGGCCCCGACCCGGACGCCGGAGTGCCCGA CCCGACGCCCGTCCGGGTCGGGCCCGGA

B

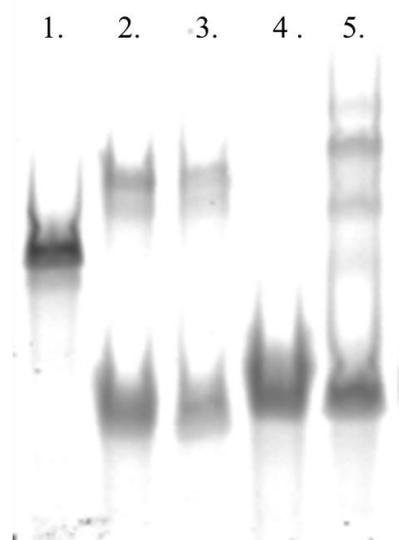


Figura R50. Electroforesis en gel nativo sobre potenciales secuencias G-quádruplex intramoleculares. (A), Oligonucleótidos empleados para el ensayo (Tabla M5 M&M). (B) Resultados obtenidos. (1), oligonucleótido de 65 bases sin estructura “EE” (5 nM) con Fluoresceína en 5’ y disuelto en buffer de dilución (20 mM Pipes pH 6,2 y 0,1 mM EDTA). (2), oligonucleótido “KK” (5nM) disuelto en el mismo buffer de dilución. (3), oligonucleótido “KK” (5 nM), disuelto en buffer de dilución con 150 mM de NaCl, y tratado con protocolo de formación G4 intramolecular (Sección 3.5.2.2. M&M). (4), oligonucleótido “II” (5 nM) disuelto en buffer de dilución. (5), oligonucleótido “II” (5 nM) disuelto en buffer con 150 mM de NaCl, y tratado con protocolo de formación G4

intramolecular (sección 3.5.2.2. M&M). Las muestras se cargaron en un gel TBE, al 12 % de acrilamida, y la electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante 45 minutos. Posteriormente, el gel se reveló en un escaner FLA 5100 (FUJIFILM).

Según estos resultados, ambos oligonucleótidos, “KK” y “II”, experimentaban los mismos efectos. Ambos adoptaban una estructura secundaria G4, aún en ausencia de NaCl y protocolo G4. Ambos se estructuraban reduciendo su superficie de interacción con la malla tridimensional de acrilamida y, por tanto, migrando de forma más rápida en el gel. Además, se observó que ambos se asociaban consigo mismos para formar estructuras intermoleculares, de mayor masa molecular. En el caso de “II”, era necesaria la presencia de NaCl para asociarse intermolecularmente.

Los resultados obtenidos parecen indicar, por lo tanto, que estas secuencias pueden formar estructuras del tipo G-quadruplex de forma espontánea en ausencia de una cadena de DNA complementaria.

4.4.3. Análisis del efecto *in vivo* e *in vitro* de compuestos que se unen a estructuras G-quadruplex

4.4.3.1. Efecto del compuesto N-Metil-Mesoporfirina en el crecimiento de *E.coli*

Se realizaron ensayos de crecimiento bacteriano sobre las líneas celulares de *Escherichia coli* DH5 α (Grant et al., 1990)(Tabla M3 M&M) y D1210 (Sandler & Clark, 1990) (Tabla M3 M&M), empleadas en ensayos de conjugación bacteriana.

El objetivo de este estudio era comprobar si el compuesto NMM de unión a estructuras G-quadruplex afectaba a la conjugación bacteriana. NMM (N-Metil-Mesoporfirina) es un conocido compuesto que une con gran afinidad DNA G-quadruplex paralelo (Smith et al., 2010) (Tippiana et al, 2014). Además, esta unión en muchos casos es capaz de estabilizar la estructura G-quadruplex. En el caso de la familia de las proteínas del tipo RecQ, NMM estabiliza el DNA G-quadruplex y obstaculiza el reconocimiento y la resolución del DNA al que está unido (Wu et al, 2001)(Huber et al, 2002). Antes de estudiar el efecto del NMM sobre la conjugación, era necesario demostrar previamente que dicho compuesto no afectaba al crecimiento bacteriano.

A partir de un cultivo saturado de células en medio LB, se realizó una dilución 1/1000 en medio mínimo (1% (p/v) de sales de M9, 0,5 % (p/v) de casaminoácidos, 0,4% (p/v) de glucosa, 1 mM CaCl₂, 1 mM Tiamina y 1 mM MgSO₄) con concentraciones crecientes de NMM (desde 0,1 hasta 30 mM). De cada una de las muestras de diferente concentración de NMM se emplearon 100 μ l, que se depositaron en cada uno de los pocillos de una placa de 96. Finalmente, utilizando un equipo VICTOR™ 1420 MULTILABEL COUNTER (PERKIN ELMER), se recogieron las lecturas de DO (Densidad Óptica) de cada uno de los cultivos a 600 nm, cada 5 minutos.

De este modo, se ensayó el efecto de concentraciones crecientes de NMM sobre el crecimiento de las líneas celulares D1210 y DH5 α . Los resultados obtenidos pueden observarse en las Figura R51, y Figura R52, representadas a continuación.

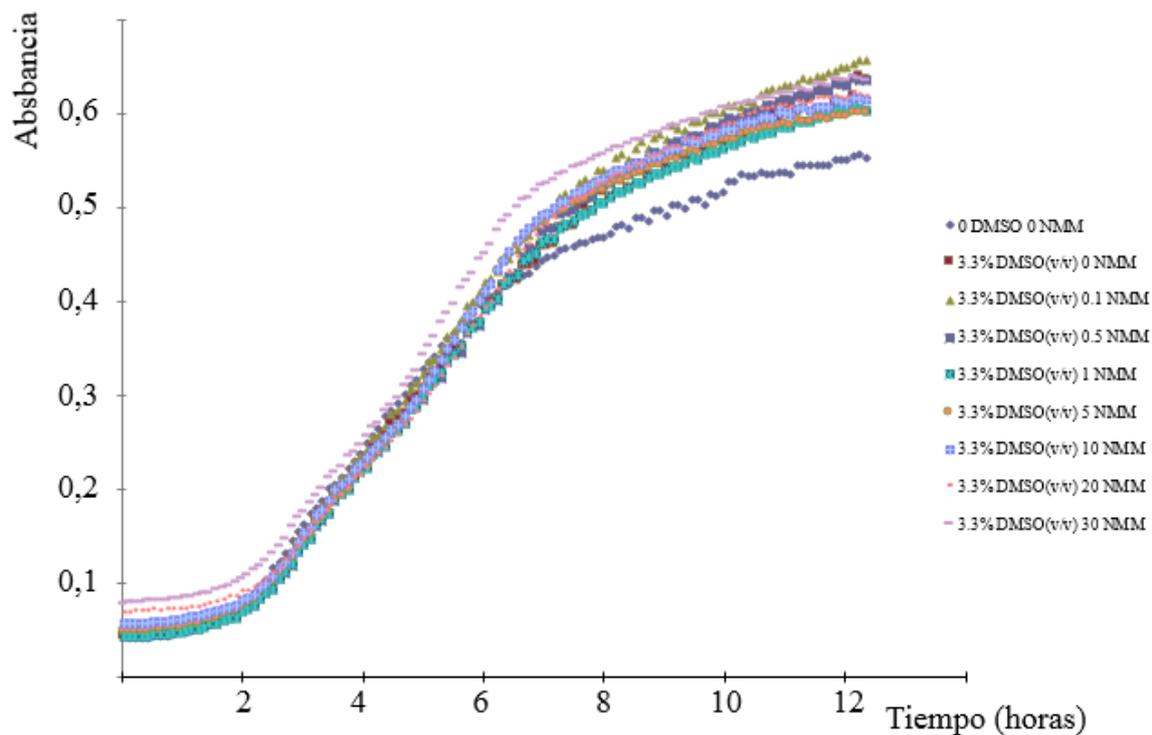


Figura R51. Curvas de crecimiento de la cepa D1210 expuesta a diferentes concentraciones de NMM. Como controles, se emplearon una muestra sin DMSO ni NMM y una muestra con únicamente DMSO al 3.3% (v/v), (porcentaje de DMSO empleado para disolver el compuesto NMM en todas las muestras). El resto de curvas corresponden a muestras cultivadas a concentraciones crecientes de NMM, desde 0,1 mM hasta 30 mM (todas ellas en 3,3 % de DMSO).

Para la línea celular D1210, los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de NMM, eran similares. Podía concluirse que el NMM no interfería en su crecimiento.

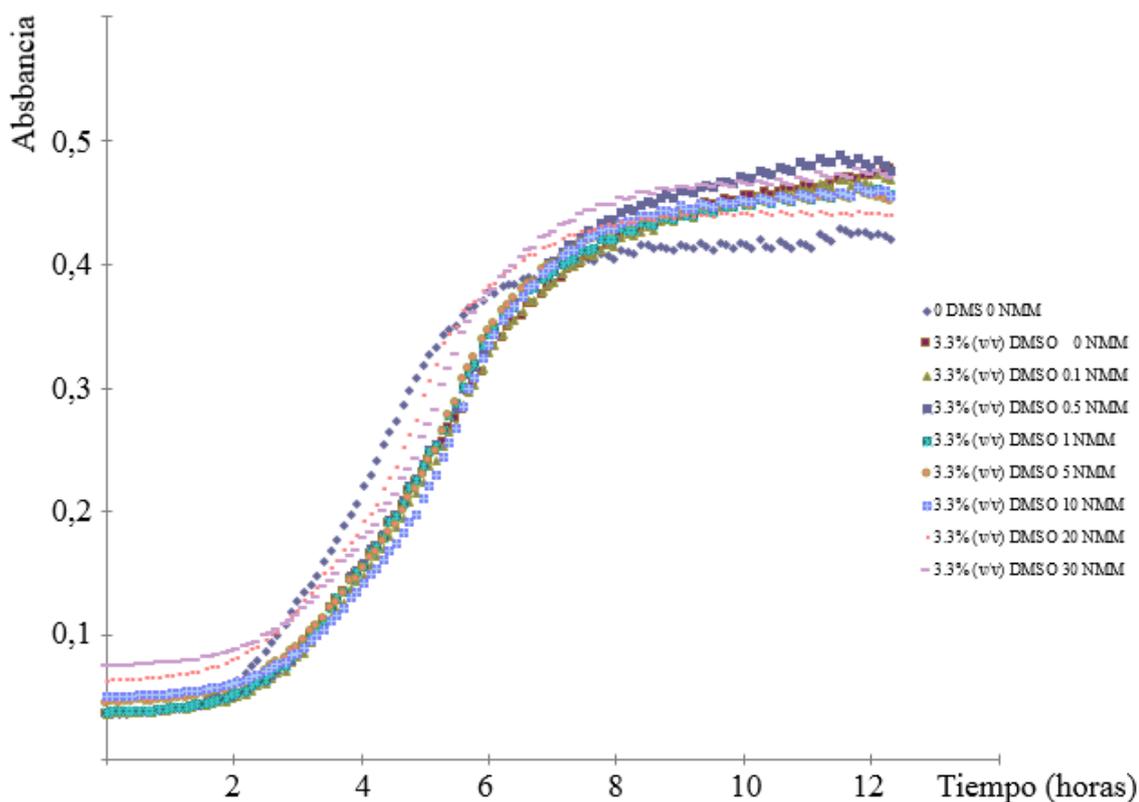


Figura R52. Curvas de crecimiento de DH5 α expuesta a diferentes concentraciones de NMM. Se empleó un control sin DMSO ni NMM y otro control con DMSO al 3,3% (v/v) y sin NMM. Para el resto de muestras se empleó una concentración del 3,3% (v/v) en DMSO y concentraciones crecientes de NMM, desde 0,1 mM hasta 30 mM.

Para la línea celular DH5 α , los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de NMM fueron similares. El compuesto NMM no interfería sobre el crecimiento de la línea celular DH5 α .

4.4.3.2. Efecto del compuesto N-Metil-Mesoporfirina en la conjugación bacteriana

Se diseñó un experimento de conjugación con concentraciones crecientes de NMM. Como donadora, se empleó la cepa DH5 α (Tabla M3 M&M), portadora del plásmido R388 a transferir. Como receptora, la cepa D1210 (Tabla M3 M&M). Los resultados se describen a continuación, en la Tabla R1:

Cepa _{donadora} / Plásmido	Cepa _{receptora}	Condiciones ensayo	Frecuencia _{conjugación}
DH5 α /R388	D1210	0 % DMSO 0 μ M NMM	$3,6 * 10^{-2}$
DH5 α /R388	D1210	3,3 % DMSO 0 μ M NMM	$3,0 * 10^{-2}$
DH5 α /R388	D1210	10 μ M NMM en 3,3 % DMSO	$5,1 * 10^{-2}$
DH5 α /R388	D1210	20 μ M NMM en 3,3 % DMSO	$3,2 * 10^{-2}$

Tabla R1. Ensayo de conjugación de DH5 α (donadoras con el plásmido R388) y D1210 (receptoras). Se describen 4 ensayos diferentes, llevados a cabo en las condiciones indicadas en la Tabla y según los experimentos de conjugación indicados en la sección de M&M.

Tal y como se observa en los datos de la tabla, los resultados no difirieron significativamente entre las 4 condiciones experimentales. Las frecuencias de conjugación fueron muy similares en todos los casos. Como conclusión podemos decir que, al menos en las condiciones de estos ensayos, el compuesto NMM no interfiere en la conjugación. Sin embargo, no disponemos de datos suficientes para poder concluir si estos resultados negativos se deben a que el compuesto no es accesible al interior de la bacteria o bien, que aún siendo efectiva su unión a estructuras G-quadruplex, éstas sean prescindibles para el mecanismo conjugativo o el propio crecimiento bacteriano.

4.4.3.3. Efecto del compuesto N-Metil-Mesoporfirina en la actividad ATPasa de TrwB dependiente de G4-DNA

TrwB se une a estructuras G-quadruplex con una elevada afinidad (Matilla et al., 2010), con un valor de $K_d = 0,3$ nM. Además, este tipo de estructuras favorecen la hexamerización de TrwB y estimulan su actividad ATPasa, ligada a la capacidad del motor para translocar DNA.

Según el equilibrio de formación de algunas estructuras G-quadruplex, su estabilidad es muy lábil, y depende de la presencia de unos valores muy concretos en factores como el pH, la sal, etc (Smargiasso et al., 2008). Tal y como se ha indicado anteriormente, el compuesto NMM (N-metil-mesoporfirina) es capaz de reconocer DNA G-quadruplex y estabilizarlo (Beaume et al., 2013). De esta forma, la unión y estabilización de estos compuestos a estructuras G-quadruplex podría ser una forma de influir en la interacción de TrwB con el DNA plasmídico en el mecanismo de la conjugación. Por este motivo, además de llevar a cabo ensayos de conjugación en ausencia y presencia de NMM (presentados en la sección anterior 4.4.3.2.), decidimos probar el efecto de este compuesto *in vitro*, con el fin de comprobar si afectaba a la interacción de TrwB con estructuras G-quadruplex.

Una forma sencilla y accesible para demostrar si NMM interfería en la interacción de TrwB con las estructuras G-quadruplex de R388 era incluirla en ensayos ATPasa de TrwB. Por este motivo, el efecto de esta molécula (NMM), se analizó en ensayos ATPasa de TrwB en presencia de DNA G-quadruplex.

Efecto de la molécula NMM sobre la actividad ATPasa de TrwB dependiente de DNA G4

Los ensayos ATPasa se llevaron a cabo tal y como se ha indicado en la Sección 3.7.5. (M&M), si bien en este caso el DNA se incubó previamente con el compuesto NMM en el buffer de ensayo y la reacción se inició añadiendo TrwB al mismo. Los resultados se indican a continuación, en la Figura R53:

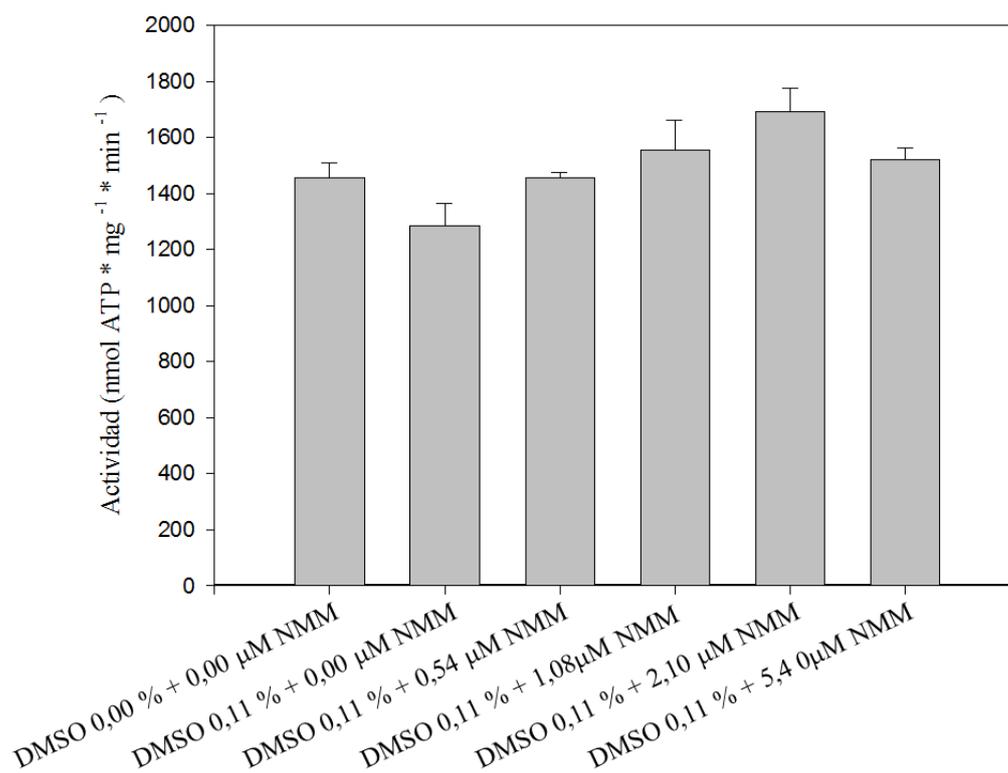


Figura R53. Ensayo de Actividad ATPasa de TrwBΔN70 (1 μM) frente a DNA G-quadruplex (10 μMbases) y concentraciones crecientes de NMM. Para el ensayo, se empleó un buffer ATPasa con 50 mM Pipes pH 6,2, 35 mM NaCl, 5 mM MgAc₂, 5% (v/v) de Glicerol, 0,5 mM Fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM ATP, 60 μg/ml de Piruvato Kinasa, 60 μg/ml de Lactato Deshidrogenasa, y concentraciones crecientes de NMM.

Los resultados obtenidos fueron muy similares en todas las concentraciones de NMM analizadas, indicando que este compuesto no interfería en la actividad ATPasa de TrwB con DNA G-quadruplex.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

TraB es un motor molecular de la familia de las translocasas SpoIII_E/FtsK, responsable de la transferencia del plásmido pSVH1 en el proceso conjugativo de *Streptomyces venezuelae*. Transfiere el plásmido en forma de DNA de cadena doble en un único paso que involucra exclusivamente a TraB y a una secuencia del plásmido, la secuencia TRS (GACCCGGA), ubicada en una región de unas 200 pb llamada región *clt* (Thoma et al., 2012). La disposición de las secuencias TRS en la región *clt* es similar a la que presentan las secuencias repetidas de iterones que están presentes en el origen de transferencia de plásmidos conjugativos de bacterias gram negativas.

TraB posee tres dominios: un dominio N-terminal de unión a membrana, un dominio motor ATPasa, de alta homología con el dominio motor de todas las ATPasas de la familia RecA/AAA+ ATPasas y por último, un dominio “Winged Hélix-Turn-Helix” (WHTH) o dominio- γ de reconocimiento, responsable de reconocer la secuencia de 8pb GACCCGGA ó secuencia TRS (Sepulveda et al., 2011). Este último dominio es muy similar a los dominios γ de FtsK y SpoIII_E, responsables del reconocimiento de las secuencias KOPS y SRS respectivamente, ambas secuencias también de 8 bases (Sivanathan et al., 2006) (Cattoni et al., 2014). Los motores moleculares FtsK y SpoIII_E, implicados en la transferencia de DNA cromosómico en los procesos de división y esporulación, respectivamente, han sido ampliamente estudiados desde un punto de vista bioquímico y estructural. Sin embargo, este no es el caso de TraB, un motor de gran interés desde un punto de vista evolutivo, ya que está implicado en la transferencia de un plásmido conjugativo pero en forma de DNA de cadena doble. El mecanismo parece a priori más parecido al utilizado en los procesos de división y esporulación, en los que también el DNA se transloca en forma de cadena doble, que al de conjugación en gram negativas basado en un T4SS (sistema de secreción tipo IV), en el que el sustrato que se transfiere es DNA de cadena simple.

En esta Tesis, por lo tanto, nos planteamos llevar a cabo un exhaustivo estudio sobre TraB, caracterizando su actividad y determinando sus sustratos óptimos. Para llevar a cabo este trabajo y, debido a las dificultades de trabajar con una proteína integral de membrana, se construyó un clon de TraB con una delección de los primeros 270 aminoácidos del extremo N-terminal (TraB Δ N270). El objetivo principal de esta tesis ha sido caracterizar bioquímicamente esta proteína y comparar su análisis con otra construcción en la que hemos delecionado además los últimos 79 aminoácidos del dominio C-terminal que constituyen el dominio γ (TraB Δ N270 Δ C79).

El bombeo de DNA desde la célula donadora a la receptora en el proceso conjugativo requiere energía. Para transferir DNA, TraB obtiene la energía necesaria procedente de la hidrólisis de ATP. Durante el desarrollo de esta tesis, se ha caracterizado la actividad ATPasa de TraBΔN270 bajo diferentes condiciones. El primer parámetro estudiado fue el pH. Se obtuvo un pH óptimo de 6,2. A este valor de pH, la proteína presenta una actividad de 4.200 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹. Esta dependencia del valor de pH explica los bajos valores de actividad descritos previamente (820 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹)(Reuther y cols., 2006). Estos autores llevaron a cabo sus experimentos a pH 8. Nuestros datos demuestran que a ese valor de pH, TraB apenas presenta actividad ATPasa. Una vez optimizado el pH, se llevaron a cabo ensayos de actividad en presencia de ssDNA y dsDNA. Con estos experimentos, hemos podido concluir que TraB presenta una actividad ATPasa dependiente de DNA. Este dato, de nuevo, está en contraposición a los datos obtenidos por Reuther y cols. que no fueron capaces de determinar una actividad ATPasa dependiente de DNA debido a las condiciones de ensayo empleadas (Reuther et al., 2006). El sustrato que estimula mejor la actividad ATPasa de TraB es dsDNA (55.000 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹), algo que a priori cabría esperar puesto que se trata del sustrato biológico de TraB en el proceso de transferencia. Además, hemos caracterizado la actividad del motor en presencia de diferentes sales (sales de magnesio, sodio, potasio, etc...), definiendo los parámetros óptimos de actividad de esta proteína.

La actividad ATPasa se caracterizó también en el mutante TraBΔN270ΔC79, con el fin de determinar la influencia del dominio γ en presencia de diferentes sustratos de DNA. Los resultados obtenidos indican que el dominio γ no influye en la actividad ATPasa de TraB con ninguno de los sustratos de DNA empleados, puesto que los valores de actividad obtenidos fueron similares para ambas construcciones. Este resultado difiere al observado con SpoIIIE, donde el dominio γ, además de inactivar el enzima en ausencia de DNA, estimula la actividad ATPasa al interactuar con la secuencia SRS dispuesta en la orientación permitida (Besprozvannaya et al., 2013). Según el modelo propuesto, SpoIIIE estimula su actividad a través del dominio γ en presencia de la secuencia SRS pero, tras el estímulo, transloca con la misma intensidad a pesar de encontrar secuencias SRS dispuestas en la orientación contraria (Besprozvannaya et al., 2013). En nuestros estudios con TraB, observamos una actividad en presencia de dsDNA de aproximadamente 70 moléculas de ATP hidrolizadas por segundo y por molécula de TraB (55.000 nmol ATP * mg⁻¹ * min⁻¹). En el caso de SpoIIIE, los valores de actividad ATPasa obtenidos varían entre 100 y 500 moléculas-ATP * segundo⁻¹ * molécula⁻¹ (Besprozvannaya et al., 2013)(Fiche et al., 2013). La explicación para la diferencia entre estos valores reside probablemente en la función biológica de ambas: TraB transloca un plásmido de 12 Kb mientras que SpoIIIE debe translocar todo el contenido cromosómico de la bacteria. Por último, cabe citar que si tomáramos como referencia los valores de SpoIIIE, teniendo en cuenta que es capaz de translocar 2 bases por molécula de ATP hidrolizada (Besprozvannaya et al., 2013), podemos decir que TraBΔN270 sería capaz de translocar 140 bases del plásmido por segundo. Es decir, TraB sería capaz de translocar las 12 Kb del plásmido pSVH1 en poco más de un minuto.

TraB interactúa con la región *clt* del plásmido que debe transferir a través de las secuencias TRS. Esta interacción es imprescindible para la conjugación en *Streptomyces* (Thoma et al., 2012). *In vitro*, se ha observado que la unión de TraB al DNA es aún más fuerte empleando secuencias de DNA con más de una repetición TRS (Vogelmann et al., 2011). En el desarrollo de nuestro trabajo, nos dimos cuenta de que las secuencias TRS son secuencias ricas en “Gs”, de forma que la región *clt* del plásmido, formada por varias repeticiones de la secuencia TRS, cumplía con la secuencia consenso de formación de estructuras G-quadruplex. TrwB, , con quien comparte una importante similitud estructural en el dominio motor, reconoce estructuras G-quadruplex con una afinidad muy alta ($K_d = 0,3 \text{ nM}$), siendo éste su sustrato de DNA preferente (Matilla et al., 2010). TrwB no dispone de dominio γ , pero reconoce el sustrato G-quadruplex a través de su dominio motor, sin la necesidad de una disponer de una secuencia específica. El estudio de afinidad de TraB por estructuras G-quadruplex llevado a cabo en esta tesis, indica también una gran afinidad de este motor por estas estructuras G-quadruplex. A pesar de que los valores de afinidad de TraB Δ N270 y TraB Δ N270 Δ C79 por el DNA G-quadruplex difieren en un orden de magnitud ($K_d_{\text{TraB}\Delta\text{N}270} = 23 \text{ nM}$ y $K_d_{\text{TraB}\Delta\text{N}270\Delta\text{C}79} = 193 \text{ nM}$), ambos valores son muy superiores a los obtenidos para cualquier otro sustrato de DNA. Estos resultados indican no sólo que el G-quadruplex es el sustrato preferente, sino que además el dominio motor es el responsable de su reconocimiento, puesto que la afinidad de este dominio por el sustrato es muy elevada. De esta forma, al igual que TrwB, TraB es capaz de reconocer estructuras G-quadruplex sin necesidad del dominio γ o una secuencia específica.

Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren un mecanismo de reconocimiento del DNA común para esta familia de motores implicados en transferir DNA a través de membranas biológicas. En el caso de FtsK, su afinidad por el DNA es máxima en presencia de varios fragmentos KOPS consecutivos (Sivanathan et al., 2006). Estos segmentos de DNA con 3 KOPS consecutivos denominados tKOPS (triple KOPS), cumplen también con la secuencia consenso de formación de DNA G-quadruplex. La estructura del dominio γ de FtsK se ha resuelto por cristalografía de rayos X (Löwe et al., 2008). La estructura muestra 3 dominios γ unidos a una secuencia de 16 pares de bases de dsDNA que contiene la secuencia KOPS (Löwe et al., 2008). Un análisis de la vista frontal de esta estructura (Figura D1) permite observar que las 3 subunidades γ rodean la doble hélice de DNA, dejando espacio para un cuarto dominio γ que en la estructura resuelta no está presente, probablemente por la falta de una secuencia más larga que permita su unión. Esta estructura resulta muy controvertida ya que FtsK, al igual que el resto de motores de esta gran familia de proteínas, es activo en forma hexámerica. Es difícil, con la información disponible saber cuál puede ser la disposición de los dominios γ restantes que conforman el hexámero, pero resulta tentadora la idea de que el motor pueda adquirir conformacionalmente algún tipo de estructura con simetría cuatro que le permita reconocer la estructura del G4 DNA (o G-quadruplex).

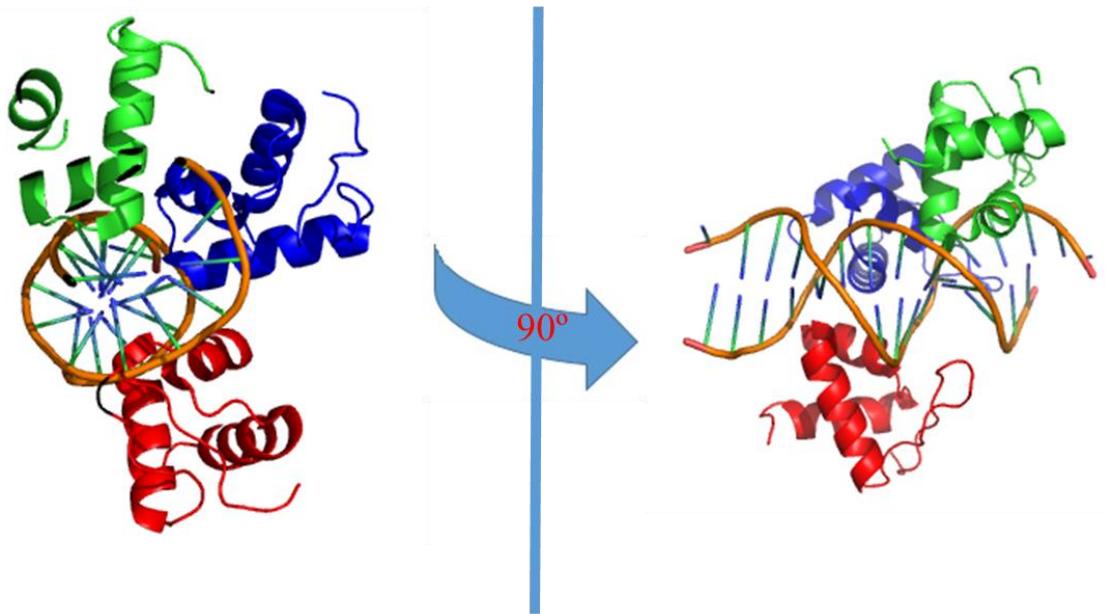


Figura D1. Vista lateral y frontal de 3 subunidades γ de FtsK unidas a la secuencia específica de dsDNA ACCAGGGCAGGGCGAC. Figura tomada de Löwe et al., (2008) (pdb: 2VE9).

Tal y como se había descrito previamente (Vogelmann et al., 2016), las secuencias TRS estimulan la interacción de TraB con el DNA sólo en presencia del dominio γ . El dominio γ es, por tanto, el responsable de la interacción de TraB con secuencias específicas. En nuestro trabajo, estudiamos la interacción con secuencias TRS dispuestas en las dos orientaciones: 5'-3' y 3'-5', no encontrando entre ambas diferencias significativas. Estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de detectar una posible direccionalidad en el movimiento de translocación de TraB, tal y como se había detectado en otros motores de la familia (Löwe et al., 2008)(May et al., 2015)(Besprozvannaya et al., 2013). Los resultados obtenidos en nuestros ensayos EMSA, además de los obtenidos al cuantificar la actividad ATPasa sugieren la inexistencia de direccionalidad en la interacción de TraB con las secuencias TRS.

Las similitudes entre los dominios motores de TraB y TrwB, su capacidad para reconocer estructuras G-quadruplex, junto con el hecho de que en ambos el sustrato biológico es un plásmido, podría apuntar a un único mecanismo molecular sin direccionalidad en su interacción con el DNA. Tal y como hemos señalado varias veces a lo largo de la Tesis, el sustrato preferente de TrwB es el DNA G-quadruplex (Matilla et al., 2010). Sin embargo, el mecanismo de transferencia del plásmido conjugativo también requiere la unión específica a una región determinada del plásmido: el origen de transferencia. La unión viene determinada por la proteína TrwA, una proteína accesoria que reconoce de forma específica una repetición invertida (IR) en el origen de transferencia (Moncalián et al., 2004). TrwA se une al DNA a través de su extremo N-terminal, mientras que el C-terminal está implicado en la unión a la proteína TrwB y en la estimulación de su actividad ATPasa (Tato et al., 2007). Todos estos datos sugieren una relación evolutiva entre esta familia de motores, de forma que el papel de reconocimiento de una secuencia específica del dominio γ en TraB, FtsK o SpoIIIE podría ser equivalente al de TrwA. Estudios filogenéticos llevados a cabo con un elevado número de proteínas de esta familia sugiere que si bien es cierto que todas ellas comparten un origen común, deben hacerse algunas matizaciones. El dominio motor de las proteínas del tipo FtsK divergió de forma separada al grupo de TrwB y, curiosamente, TraB parece haber divergido hacia una rama diferente una vez producida la separación entre las familias FtsK- y TrwB-like (Peña et al., 2012).

Al analizar los valores de afinidad de TraB por secuencias TRS y compararlos con los obtenidos con un fragmento de DNA del mismo tamaño extraído de la región *clt* del plásmido pSVH1, comprobamos que TraB presentaba mejores valores de afinidad por este último. Al estudiar en profundidad este fragmento comprobamos que tanto el fragmento *clt* como su complementario eran capaces de formar en disolución estructuras de DNA secundarias compatibles con la forma G-quadruplex. Tras estudiar la interacción de TraB Δ N270 con ssDNA correspondiente al fragmento *clt* y a su complementario, analizamos también la interacción del enzima con ambos fragmentos de forma simultánea. El valor de afinidad obtenido era comparable al valor obtenido con DNA G-quadruplex. En contraposición, la afinidad por un sustrato dsDNA formado por el tratamiento de hibridación de ambas cadenas de DNA (y eliminación de la estructura por el tratamiento) era muy baja. Este resultado sugiere que el sustrato biológico de TraB podría consistir en una horquilla de dsDNA cuyas hebras abiertas se estructurarían como DNA G-quadruplex, reconociendo TraB ambas cadenas de forma simultánea. A partir de este resultado, proponemos un modelo basado en el reconocimiento simultáneo de secuencia específica a través del dominio γ de TraB y de reconocimiento de estructura a través de su dominio motor. La siguiente figura muestra un esquema del modelo propuesto:

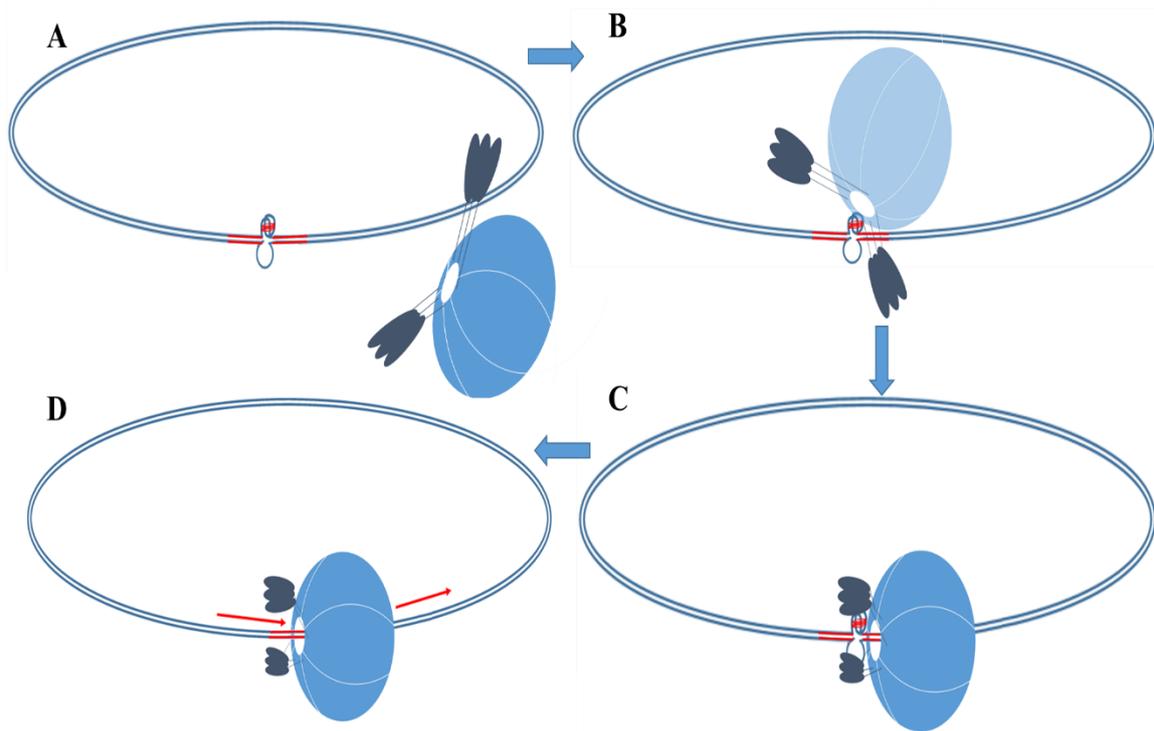


Figura D2. Modelo molecular propuesto para la interacción de TraB Δ N270 con el plásmido conjugativo pSVH1. (A) plásmido pSVH1 con la región *cIt* marcada en rojo y estructurada en forma de G-quadruplex intramolecular. Además, se representa el hexámero de TraB Δ N270 próximo a la molécula plasmídica, con el dominio motor en color azul y el dominio γ en negro. (B, C) TraB hexamérico ensamblado en torno a dsDNA de pSVH1. El dominio motor reconocería la estructura G-quadruplex y el dominio γ la secuencia TRS de forma simultánea o secuencial. (D) posible relajación del DNA G4 y translocación de dsDNA.

En este modelo, se representa a TraB Δ N270 pre-ensamblada en forma hexamérica. Según los resultados de esta Tesis, TraB existe también en un estado oligomérico superior en solución, al menos en las condiciones de ensayo empleadas en este trabajo. Estudios de filtración en gel muestran que la proteína es capaz de formar un estado oligomérico de orden superior, con una MW aproximada de 2.400 KDa. Esta muestra no forma agregados, sino que se trata de una muestra homogénea y monodispersa, tal y como se aprecia en las micrografías obtenidas por microscopía electrónica. Un análisis preliminar de dichas muestras indica que la proteína está formando una estructura con un eje de simetría cuatro y, dada la masa molecular observada, podría tratarse de un ensamblaje de cuatro hexámeros. Es difícil saber, en este estadio, si este complejo de gran tamaño se corresponde con el estado funcional de la proteína *in vivo* o si, por el contrario, se trata de un artefacto producido *in vitro* en nuestras condiciones de purificación. En SpoIIIE la presencia de hexámeros y asociaciones de mayor tamaño está confirmada por microscopía de super-resolución, observándose complejos de ~45 nm que son reclutados a los puntos de formación del septo. Tras la inducción del proceso de esporulación, estos complejos contienen 47 +/- 20 moléculas de SpoIIIE, una mayoría de las cuales se encuentra ensamblada en forma de hexámeros (Fiche et al., 2013). En células creciendo de forma exponencial, los clusters observados en los septos en formación contienen 20 +/- 4 moléculas de SpoIIIE, lo cual apoya un modelo de translocación de DNA a través de un poro acuoso que en el que SpoIIIE prevendría la fusión de membranas hasta que el proceso de segregación cromosómica hubiera ocurrido al completo. En vista de estos resultados, un ensamblaje de cuatro hexámeros por cada brazo cromosómico que se transloca es perfectamente plausible. Cada hexámero tiene un tamaño de unos ~12 nm (Massey et al., 2006) y el tamaño de nuestra estructura de TraB de elevada MW es de ~24 nm, lo cual es compatible con este tipo de disposición de grandes complejos observado en SpoIIIE por microscopía.

Existen dos modelos para explicar la interacción de SpoIIIE/FtsK con el DNA (Cattoni et al., 2014). El primer modelo, descrito para SpoIIIE, presenta a la secuencia SRS como un sitio de carga, capaz además de estimular su función translocasa a través de la interacción de SRS con el dominio γ . El segundo modelo propone que SpoIIIE, en forma de anillo hexamérico abierto, interacciona con el dsDNA de forma inespecífica y, a continuación, difunde a lo largo del DNA hasta encontrar la secuencia SRS. Una vez localizada la secuencia, SpoIIIE se activaría por medio de la interacción de SRS con los dominios γ . Los resultados obtenidos en esta tesis en relación a las estructuras G-quadruplex parecen indicar que, efectivamente, este tipo de estructuras secundarias en el DNA podrían servir para ser reconocidas de forma rápida y eficiente antes de establecer una unión con una secuencia específica. El diámetro del poro del hexámero de TraB es de aproximadamente 3,1 nm, resuelto mediante microscopía electrónica (Vogelmann et al., 2011). Si bien este valor obtenido a partir de micrografías no es nada exacto, es un diámetro similar al de FtsK (obtenido a partir de su estructura atómica)(Massey et al., 2006). Este tamaño de poro es compatible con la función propuesta para este grupo de proteínas: translocar DNA de doble cadena y difiere del diámetro de poro de TrwB, de 2 nm, más estrecho al estar diseñada para translocar ssDNA.

Al analizar los valores de actividad de TrwB, éstos sólo son comparables a los obtenidos con TraB cuando TrwB interactúa con la proteína TrwA. En presencia de TrwA, los valores de actividad de TrwB Δ N70 aumentan un orden de magnitud (Tato et al., 2007). En esta tesis, analizamos la actividad de TrwB con DNA G-quadruplex en presencia de TrwA, alcanzando valores de 30.000 nmol ATP * mg⁻¹* min⁻¹. Los valores obtenidos con ssDNA y dsDNA fueron mucho más bajos (ambos 5.000 nmol ATP * mg⁻¹* min⁻¹). Este dato sugiere que este tipo de estructuras podrían estar jugando un papel importante en la actividad de TrwB *in vivo*. Por este motivo, analizamos los plásmidos R388 y pSVH1, sobre los que actúan TrwB y TraB, respectivamente, en busca de secuencias candidatas a estructurarse como G-quadruplex. En R388 se encontraron dos posibles secuencias: la primera sobre la secuencia de *trwC* y la segunda próxima al gen *stbC*. Ambas se encontraban cercanas a la secuencia de reconocimiento del relaxosoma. El contacto entre TrwB y DNA G-quadruplex promueve la hexamerización de la proteína (Tato et al., 2005), por lo que podemos especular que determinadas secuencias en R388 podrían estar estructuradas como DNA G-quadruplex, sirviendo como señal de hexamerización y carga de TrwB en el DNA. De esta forma, el motor se ensamblaría en torno al DNA, orientándolo con el *oriT* hacia el canal de secreción. En el caso del plásmido pSVH1 hemos encontrado siete posibles secuencias G-quadruplex; verificando la capacidad de estructurarse de una de ellas: en la región *clt* del plásmido donde se encuentran repetidas las secuencias TRS. El análisis de esta secuencia indica que es capaz de estructurarse con gran facilidad por lo que, en condiciones fisiológicas, el DNA de esta región es probable que se encuentre formando este tipo de estructuras. Además, las siete secuencias TRS están localizadas exclusivamente sobre el tercio de la molécula donde reside el gen *traB*. Este evento, cuya probabilidad asociada corresponde a un valor de $(1/3)^7$, junto a los valores de afinidad obtenidos con TraB y DNA G-quadruplex, sugiere un papel esencial para este tipo de estructuras, de forma que la interacción podría ayudar a TraB a orientarse de forma correcta sobre el DNA plasmídico.

Finalmente, en un intento de relacionar la actividad observada en estas proteínas en presencia de G-quadruplex, caracterizamos también la actividad ATPasa de RecQ en presencia de diferentes sustratos de DNA. RecQ es un motor implicado en resolver estructuras de DNA G-quadruplex, con un dominio de unión a DNA de alta afinidad por estas estructuras (Huber et al., 2006). Nuestros resultados muestran que la helicasa RecQ de *E. coli* presenta valores de actividad de la misma magnitud que TraB y casi idénticos a los encontrados a TrwB Δ N20 en presencia de DNA G-quadruplex. En definitiva, los resultados obtenidos en esta Tesis apuntan a un mecanismo de reconocimiento del DNA similar en este tipo de motores moleculares implicados en transferir DNA a través de membranas biológicas. Este mecanismo implicaría la existencia de estructuras del tipo G-quadruplex en el DNA, de forma que este tipo de estructuras, al igual que ocurre en eucariotas, estaría jugando un papel fundamental en el proceso de reconocimiento y translocación del DNA. Futuros estudios, principalmente a nivel estructural, serán necesarios para poder resolver el papel exacto que juegan este tipo de estructuras en el mecanismo de transferencia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. TraB presenta una actividad ATPasa dependiente del valor del pH del medio, con valores óptimos de actividad a pH 6.2. La caracterización de esta actividad ATPasa en presencia de diferentes sales y sustratos nos ha permitido determinar los parámetros óptimos de actividad.
2. La actividad ATPasa de TraB es dependiente de DNA. Los valores máximos de actividad se obtienen en presencia de dsDNA, siendo el ssDNA menos efectivo en la estimulación de dicha actividad.
3. El dominio γ de TraB no produce ningún efecto sobre la actividad ATPasa de TraB en presencia de los sustratos de DNA empleados en esta tesis. La actividad ATPasa de TraB observada depende exclusivamente del dominio motor.
4. El dominio γ de TraB favorece la interacción con dsDNA en presencia de secuencias específicas (secuencias TRS). El mutante TraB Δ N270 Δ C79, carente de este dominio, no presenta afinidad por este tipo de secuencias.
5. TraB forma estructuras oligoméricas de elevada masa molecular. La muestra es homogénea y monodispersa y su observación al microscopio electrónico revela complejos proteicos con simetría 4. Los datos obtenidos son compatibles con un complejo formado por cuatro hexámeros de TraB.
6. TraB presenta una gran afinidad por sustratos G-quadruplex, una afinidad superior a la que presenta por sustratos específicos con secuencias TRS. Podemos concluir que el G-quadruplex es el sustrato preferente de TraB, tanto en presencia como en ausencia del dominio γ , sugiriendo que el dominio motor es el responsable de la unión a este tipo de sustratos.
7. La actividad de TraB fue comparada con la de otros motores que utilizan G-quadruplex como sustrato. La actividad ATPasa de TrwB se estimula en presencia del sustrato G-quadruplex, alcanzando velocidades de reacción 5 y 30 veces superiores a las obtenidas con dsDNA y ssDNA, respectivamente. Aún así, estos valores de actividad están un orden de magnitud por debajo de los obtenidos con TraB. Únicamente en presencia de TrwA, se alcanzan estos valores de velocidad máxima.
8. RecQ presenta mayor actividad ATPasa con sustratos ssDNA y G-quadruplex, siendo menos efectivo con dsDNA. A pesar de ser un motor cuya función específica es separar estructuras G-quadruplex, es igual de eficiente con ssDNA. Los valores de actividad obtenidos con este motor son comparables a los obtenidos con TraB, y a los obtenidos con TrwB en presencia de TrwA.
9. En nuestras condiciones de ensayo, no hemos sido capaces de observar una actividad de translocación para TraB o TrwB. Los únicos motores analizados capaces de moverse sobre el DNA con una fuerza capaz de disociar la unión de estreptavidina al DNA han

sido TrwC y Dda. Dda es capaz de resolver la estructura G-quadruplex dando lugar a cadenas sencillas de DNA, una actividad no descrita hasta el momento.

10. Un análisis de los plásmidos R388 y pSVH1 muestra que ambos contienen potenciales secuencias capaces de formar estructuras G-quadruplex. La secuencia *clt* del plásmido pSVH1, que contiene varias repeticiones TRS y es responsable de la unión a TraB a través del dominio γ , se ha analizado *in vitro*, mostrando una estructura secundaria compatible con estructuras G-quadruplex intramoleculares.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Atmakuri, K., Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Molecular Microbiology*, *54*(5), 1199–1211.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04345.x>
- Beaume, N., Pathak, R., Yadav, V. K., Kota, S., Misra, H. S., Gautam, H. K., & Chowdhury, S. (2013). Genome-wide study predicts promoter-G4 DNA motifs regulate selective functions in bacteria: Radioresistance of *D. radiodurans* involves G4 DNA-mediated regulation. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), 76–89.
<http://doi.org/10.1093/nar/gks1071>
- Bernstein, D. A., Zittel, M. C., & Keck, J. L. (2003). High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core. *The EMBO Journal*, *22*(19), 4910–21.
<http://doi.org/10.1093/emboj/cdg500>
- Besprozvannaya, M., Pivorunas, V. L., Feldman, Z., & Burton, B. M. (2013). SpoIIIE Protein Achieves Directional DNA Translocation through Allosteric Regulation of ATPase Activity by an Accessory Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(40), 28962. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.484055>
- Bharti, S. K., Sommers, J. A., Zhou, J., Kaplan, D. L., Spelbrink, J. N., Mergny, J.-L., & Brosh, R. M. (2014). DNA sequences proximal to human mitochondrial DNA deletion breakpoints prevalent in human disease form G-quadruplexes, a class of DNA structures inefficiently unwound by the mitochondrial replicative Twinkle helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(43), 29975–93.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M114.567073>
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A., & Christie, P. J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology*, *164*(6), 620–39.
<http://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
- Bose, B., Reed, S. E., Besprozvannaya, M., Burton, B. M., Wu, L., Errington, J., ... Errington, J. (2016). Missense Mutations Allow a Sequence-Blind Mutant of SpoIIIE to Successfully Translocate Chromosomes during Sporulation. *PLOS ONE*, *11*(2), e0148365. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148365>
- Brooks, T. A., Kendrick, S., & Hurley, L. (2010). Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *The FEBS Journal*, *277*(17), 3459–69.
<http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07759.x>
- Bugaut, A., & Balasubramanian, S. (2012). 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Research*, *40*(11), 4727–41.
<http://doi.org/10.1093/nar/gks068>
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (n.d.). SURVEY AND SUMMARY Quadruplex DNA: sequence, topology and structure.
<http://doi.org/10.1093/nar/gkl655>
- Burton, B. M., Marquis, K. A., Sullivan, N. L., Rapoport, T. A., & Rudner, D. Z. (2007). The ATPase SpoIIIE transports DNA across fused septal membranes during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell*, *131*(7), 1301–12.

- <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.009>
- Byrd, A. K., & Raney, K. D. (2006). Displacement of a DNA binding protein by Dda helicase. *Nucleic Acids Research*, *34*(10), 3020–9. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl369>
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(1).
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, *1*(2), 137–149. <http://doi.org/10.1038/nrmicro753>
- Cattoni, D. I., Thakur, S., Godefroy, C., Gall, A. Le, Lai-Kee-Him, J., Milhiet, P.-E., ... Nöllmann, M. (2014). Structure and DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* SpoIIIE DNA translocase revealed by single-molecule and electron microscopies. *Nucleic Acids Research*, *42*(4), 2624. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt1231>
- César, C. E., & Llosa, M. (2007). TrwC-mediated site-specific recombination is controlled by host factors altering local DNA topology. *Journal of Bacteriology*, *189*(24), 9037–43. <http://doi.org/10.1128/JB.01152-07>
- César, C. E., Machón, C., de la Cruz, F., & Llosa, M. (2006). A new domain of conjugative relaxase TrwC responsible for efficient *oriT*-specific recombination on minimal target sequences. *Molecular Microbiology*, *62*(4), 984–996. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05437.x>
- Chambers, V. S., Marsico, G., Boutell, J. M., Di Antonio, M., Smith, G. P., & Balasubramanian, S. (2015). High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nature Biotechnology*, *33*(8), 877–81. <http://doi.org/10.1038/nbt.3295>
- Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(6), 343–359. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3456>
- Datta, N., & Hedges, R. W. (1972). R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group. *Annales de l'Institut Pasteur*, *123*(6), 849–52. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/4347775>
- Day, H. A., Pavlou, P., & Waller, Z. A. E. (2014a). Bioorganic & Medicinal Chemistry i-Motif DNA : Structure , stability and targeting with ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *22*(16), 4407–4418. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.047>
- Day, H. A., Pavlou, P., & Waller, Z. A. E. (2014b). i-Motif DNA: structure, stability and targeting with ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *22*(16), 4407–18. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.047>
- de la Cruz, F., & Grinsted, J. (1982). Genetic and molecular characterization of Tn21, a multiple resistance transposon from R100.1. *J. Bacteriol.*, *151*(1), 222–228. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/151/1/222.short>
- Durand, E., Oomen, C., & Waksman, G. (2010). Biochemical Dissection of the ATPase TraB, the VirB4 Homologue of the *Escherichia coli* pKM101 Conjugation Machinery. *Journal of Bacteriology*, *192*(9), 2315–2323. <http://doi.org/10.1128/JB.01384-09>

- Ellis, N. A., Lennon, D. J., Proytcheva, M., Alhadeff, B., Henderson, E. E., & German, J. (1995). Somatic intragenic recombination within the mutated locus BLM can correct the high sister-chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells. *American Journal of Human Genetics*, *57*(5), 1019–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7485150>
- Enemark, E. J., & Joshua-Tor, L. (2008). On helicases and other motor proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *18*(2), 243–57. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.01.007>
- Errington, J., Bath, J., & Wu, L. J. (2001). DNA transport in bacteria. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *2*(7), 538–45. <http://doi.org/10.1038/35080005>
- Fernández-López, R., Garcillán-Barcia, M. P., Revilla, C., Lázaro, M., Vielva, L., & de la Cruz, F. (2006). Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(6), 942–66. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00042.x>
- Fiche, J.-B., Cattoni, D. I., Diekmann, N., Langerak, J. M., Clerte, C., Royer, C. A., ... Nöllmann, M. (2013). Recruitment, Assembly, and Molecular Architecture of the SpoIIIE DNA Pump Revealed by Superresolution Microscopy. *PLoS Biology*, *11*(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001557>
- Gehring, K., Leroy, J.-L., & Guéron, M. (1993). A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature*, *363*(6429), 561–565. <http://doi.org/10.1038/363561a0>
- Ghosh, S. K., Hajra, S., Paek, A., & Jayaram, M. (2006). Mechanisms for chromosome and plasmid segregation. *Annual Review of Biochemistry*, *75*, 211–41. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.124037>
- Goddard, K. A., Yu, C. E., Oshima, J., Miki, T., Nakura, J., Piussan, C., ... Wijsman, E. M. (1996). Toward localization of the Werner syndrome gene by linkage disequilibrium and ancestral haplotyping: lessons learned from analysis of 35 chromosome 8p11.1-21.1 markers. *American Journal of Human Genetics*, *58*(6), 1286–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8651307>
- Gomis-Rüth, F. X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezón, E., de la Cruz, F., & Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature*, *409*(6820), 637–41. <http://doi.org/10.1038/35054586>
- Gonzalez-Rivera, C., Bhatti, M., & Christie, P. J. (2016). Mechanism and Function of Type IV Secretion During Infection of the Human Host. *Microbiology Spectrum*, *4*(3). <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0024-2015>
- Grandoso, G., Llosa, M., Zabala, J. C., & Cruz, F. (1994). Purification and Biochemical Characterization of TrwC, the Helicase Involved in Plasmid R388 Conjugal DNA Transfer. *European Journal of Biochemistry*, *226*(2), 403–412. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20065.x>
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(12), 4645–4649. <http://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4645>
- Guasch, A., Lucas, M., Moncalián, G., Cabezas, M., Pérez-Luque, R., Gomis-Rüth, F. X., ... Coll, M. (2003). Recognition and processing of the origin of transfer DNA

- by conjugative relaxase TrwC. *Nature Structural Biology*, 10(12), 1002–1010. <http://doi.org/10.1038/nsb1017>
- Harami, G. M., Nagy, N. T., Martina, M., Neuman, K. C., & Kovács, M. (2015). The HRDC domain of *E. coli* RecQ helicase controls single-stranded DNA translocation and double-stranded DNA unwinding rates without affecting mechanoenzymatic coupling. *Scientific Reports*, 5, 11091. <http://doi.org/10.1038/srep11091>
- Harris, L. M., & Merrick, C. J. (2015). G-quadruplexes in pathogens: a common route to virulence control? *PLoS Pathogens*, 11(2), e1004562. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004562>
- Huber, M. D., Duquette, M. L., Shiels, J. C., & Maizels, N. (2006). A Conserved G4 DNA Binding Domain in RecQ Family Helicases. *Journal of Molecular Biology*, 358(4), 1071–1080. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.077>
- Huber, M. D., Lee, D. C., & Maizels, N. (2002). G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition. *Nucleic Acids Research*, 30(18), 3954–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235379>
- Huppert, J. L., & Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research*, 33(9), 2908–16. <http://doi.org/10.1093/nar/gki609>
- Huppert, J. L., & Balasubramanian, S. (2007). G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 406–13. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl1057>
- Hwang, W., & Lang, M. J. (2013). Nucleotide-dependent control of internal strains in ring-shaped AAA+ motors. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 6(1), 65–73. <http://doi.org/10.1007/s12195-012-0264-5>
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., & Aravind, L. (n.d.). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology*, 146(1–2), 11–31. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.10.010>
- Jin, W., Liu, H., Zhang, Y., Otta, S. K., Plon, S. E., & Wang, L. L. (2008). Sensitivity of RECQL4-deficient fibroblasts from Rothmund-Thomson syndrome patients to genotoxic agents. *Human Genetics*, 123(6), 643–53. <http://doi.org/10.1007/s00439-008-0518-4>
- Jin, Y., Yu, J., & Yu, Y. G. (2002). Identification of hNopp140 as a Binding Partner for Doxorubicin with a Phage Display Cloning Method. *Chemistry & Biology*, 9(2), 157–162. [http://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00096-0](http://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00096-0)
- Juhas, M. (2015). Horizontal gene transfer in human pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 101–108. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2013.804031>
- Keller, A. N., Xin, Y., Boer, S., Reinhardt, J., Baker, R., Arciszewska, L. K., ... Grainge, I. (2016). Activation of Xer-recombination at dif: structural basis of the FtsK γ -XerD interaction. *Scientific Reports*, 6, 33357. <http://doi.org/10.1038/srep33357>
- Kendrick, S., & Hurley, L. H. (2010). The role of G-quadruplex/i-motif secondary structures as cis-acting regulatory elements. *Pure and Applied Chemistry. Chimie Pure et Appliquee*, 82(8), 1609–1621. <http://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-09-29>
- Kikin, O., D'Antonio, L., & Bagga, P. S. (2006). QGRS Mapper: a web-based server for

- predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue), W676-82. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl253>
- Kreuzer, K. N., & Jongeneel, C. V. (1983). Escherichia coli phage T4 topoisomerase. *Methods in Enzymology*, 100, 144–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6312256>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <http://doi.org/10.1038/227680a0>
- Liu, J., Chen, C., Xue, Y., Hao, Y., & Tan, Z. (2010). G-quadruplex hinders translocation of BLM helicase on DNA: a real-time fluorescence spectroscopic unwinding study and comparison with duplex substrates. *Journal of the American Chemical Society*, 132(30), 10521–7. <http://doi.org/10.1021/ja1038165>
- Llosa, M., Grandoso, G., Hernando, M. A., & de la Cruz, F. (1996). Functional domains in protein TrwC of plasmid R388: dissected DNA strand transferase and DNA helicase activities reconstitute protein function. *Journal of Molecular Biology*, 264(1), 56–67. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0623>
- Lopatkin, A. J., Huang, S., Smith, R. P., Srimani, J. K., Sysoeva, T. A., Bewick, S., ... You, L. (2016). Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nature Microbiology*, 1(6), 16044. <http://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.44>
- Löwe, J., Ellonen, A., Allen, M. D., Atkinson, C., Sherratt, D. J., & Grainge, I. (2008). Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Molecular Cell*, 31(4), 498–509. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.027>
- Lusetti, S. L., Shaw, J. J., & Cox, M. M. (2003). Magnesium ion-dependent activation of the RecA protein involves the C terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 16381–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M212916200>
- Marquis, K. A., Burton, B. M., Nollmann, M., Ptacin, J. L., Bustamante, C., Ben-Yehuda, S., & Rudner, D. Z. (2008). SpoIIIE strips proteins off the DNA during chromosome translocation. *Genes & Development*, 22(13), 1786–95. <http://doi.org/10.1101/gad.1684008>
- Massey, T. H., Mercogliano, C. P., Yates, J., Sherratt, D. J., & Lö We, J. (2006). Double-Stranded DNA Translocation: Structure and Mechanism of Hexameric FtsK. *Molecular Cell*, 23, 457–469. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.019>
- Matilla, I., Alfonso, C., Rivas, G., Bolt, E. L., de la Cruz, F., & Cabezon, E. (2010). The Conjugative DNA Translocase TrwB Is a Structure-specific DNA-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17537–17544. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.084137>
- Matlock, D. L., Yeruva, L., Byrd, A. K., Mackintosh, S. G., Langston, C., Brown, C., ... Raney, K. D. (2010). Investigation of translocation, DNA unwinding, and protein displacement by NS3h, the helicase domain from the hepatitis C virus helicase. *Biochemistry*, 49(10), 2097–109. <http://doi.org/10.1021/bi901977k>
- May, P. F. J., Zawadzki, P., Sherratt, D. J., Kapanidis, A. N., & Arciszewska, L. K. (2015). Assembly, translocation, and activation of XerCD-dif recombination by FtsK translocase analyzed in real-time by FRET and two-color tethered fluorophore motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), E5133-41. <http://doi.org/10.1073/pnas.1510814112>

- Medagli, B., & Onesti, S. (2013). Structure and Mechanism of Hexameric Helicases (pp. 75–95). Springer New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4614-5037-5_4
- Mendoza, O., Bourdoncle, A., Boulé, J.-B., Brosh, R. M., & Mergny, J.-L. (2016). G-quadruplexes and helicases. *Nucleic Acids Research*, gkw079-. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw079>
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289–98. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0399>
- Moncalian, G., Cabezon, E., Alkorta, I., Valle, M., Moro, F., Valpuesta, J. M., ... de la Cruz, F. (1999). Characterization of ATP and DNA Binding Activities of TrwB, the Coupling Protein Essential in Plasmid R388 Conjugation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36117–36124. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36117>
- Moncalián, G., & de la Cruz, F. (2004). DNA binding properties of protein TrwA, a possible structural variant of the Arc repressor superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1701(1), 15–23. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.05.009>
- Osman, F., Ahn, J. S., Lorenz, A., & Whitby, M. C. (2016). The RecQ DNA helicase Rqh1 constrains Exonuclease 1-dependent recombination at stalled replication forks. *Scientific Reports*, 6, 22837. <http://doi.org/10.1038/srep22837>
- Peña, A., Matilla, I., Martín-Benito, J., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., De La Cruz, F., ... Arechaga, I. (2012). The hexameric structure of a conjugative VirB4 protein ATPase provides new insights for a functional and phylogenetic relationship with DNA translocases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39925–39932. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.413849>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of Bacillus subtilis. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Qian, X., He, Y., & Luo, Y. (2007). Binding of a second magnesium is required for ATPase activity of RadA from Methanococcus voltae. *Biochemistry*, 46(20), 5855–63. <http://doi.org/10.1021/bi6024098>
- Qin, W., Liu, N.-N., Wang, L., Zhou, M., Ren, H., Bugnard, E., ... Xi, X. G. (2014). Characterization of Biochemical Properties of Bacillus subtilis RecQ Helicase. *Journal of Bacteriology*, 196(24), 4216–4228. <http://doi.org/10.1128/JB.06367-11>
- Reuther, J., Gekeler, C., Tiffert, Y., Wohlleben, W., & Muth, G. (2006). Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes : a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip, 61(June), 436–446. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05258.x>
- Reuther, J., Wohlleben, W., & Muth, G. (2006). Modular architecture of the conjugative plasmid pSVH1 from Streptomyces venezuelae. *Plasmid*, 55(3), 201–209. <http://doi.org/10.1016/j.plasmid.2005.11.007>
- Revilla, C., Garcillán-Barcia, M. P., Fernández-López, R., Thomson, N. R., Sanders, M., Cheung, M., ... de la Cruz, F. (2008). Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1472–80. <http://doi.org/10.1128/AAC.00982-07>
- Rhodes, D., & Lipps, H. J. (2015). G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Research*, 43(18), 8627–8637. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv862>

- Saikrishnan, K., Griffiths, S. P., Cook, N., Court, R., & Wigley, D. B. (2008). DNA binding to RecD: role of the 1B domain in SF1B helicase activity. *The EMBO Journal*, *27*(16), 2222–9. <http://doi.org/10.1038/emboj.2008.144>
- Sandler, S. J., & Clark, A. J. (1990). Factors affecting expression of the recF gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene*, *86*(1), 35–43. [http://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90111-4](http://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90111-4)
- Segura, R. L., Aguila-Arcos, S., Ugarte-Uribe, B., Vecino, A. J., de la Cruz, F., Goñi, F. M., & Alkorta, I. (2014). Subcellular location of the coupling protein TrwB and the role of its transmembrane domain. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1838*(1 Pt B), 223–30. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.016>
- Sepulveda, E., Vogelmann, J., & Muth, G. (2011). A septal chromosome segregator protein evolved into a conjugative DNA-translocator protein. *Mobile Genetic Elements*, *1*(3), 225–229. <http://doi.org/10.4161/mge.1.3.18066>
- Sinclair, D. A., Mills, K., & Guarente, L. (1997). Accelerated Aging and Nucleolar Fragmentation in Yeast sgs1 Mutants. *Science*, *277*(5330).
- Sivanathan, V., Allen, M. D., de Bekker, C., Baker, R., Arciszewska, L. K., Freund, S. M., ... Sherratt, D. J. (2006). The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(11), 965–72. <http://doi.org/10.1038/nsmb1158>
- Sivanathan, V., Emerson, J. E., Pages, C., Cornet, F., Sherratt, D. J., & Arciszewska, L. K. (2009). KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Molecular Microbiology*, *71*(4), 1031–1042. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06586.x>
- Smargiasso, N., Rosu, F., Hsia, W., Colson, P., Baker, E. S., Bowers, M. T., ... Gabelica, V. (2008). G-quadruplex DNA assemblies: Loop length, cation identity, and multimer formation. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(31), 10208–10216. <http://doi.org/10.1021/ja801535e>
- Smestad, J. A., & Maher, L. J. (2015). Relationships between putative G-quadruplex-forming sequences, RecQ helicases, and transcription. *BMC Medical Genetics*, *16*, 91. <http://doi.org/10.1186/s12881-015-0236-4>
- Smith, J. S., & Johnson, F. B. (2010). Isolation of G-Quadruplex DNA Using NMM-Sepharose Affinity Chromatography (pp. 207–221). http://doi.org/10.1007/978-1-59745-363-9_13
- Stegle, O., Payet, L., Mergny, J.-L., MacKay, D. J. C., & Leon, J. H. (2009). Predicting and understanding the stability of G-quadruplexes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*(12), i374–82. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp210>
- Tangeman, L., McIlhatton, M., Grierson, P., Groden, J., & Acharya, S. (2016). Regulation of BLM Nucleolar Localization. *Genes*, *7*(9), 69. <http://doi.org/10.3390/genes7090069>
- Tato, I., Matilla, I., Arechaga, I., Zunzunegui, S., Cruz, F. De, & Cabezon, E. (2007). The ATPase Activity of the DNA Transporter TrwB Is Modulated by Protein TrwA IMPLICATIONS FOR A COMMON ASSEMBLY MECHANISM OF DNA, *282*(35), 25569–25576. <http://doi.org/10.1074/jbc.M703464200>
- Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., & Cabezon, E. (2005). TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(23),

- 8156–8161. <http://doi.org/10.1073/pnas.0503402102>
- Thoma, L., Dobrowinski, H., Finger, C., Guezguez, J., Linke, D., Sepulveda, E., & Muth, G. (2015). A Multiprotein DNA Translocation Complex Directs Intramyceial Plasmid Spreading during *Streptomyces* Conjugation. *mBio*, *6*(3), e02559-14. <http://doi.org/10.1128/mBio.02559-14>
- Thoma, L., & Muth, G. (2012). Conjugative DNA transfer in *Streptomyces* by TraB: is one protein enough? *FEMS Microbiology Letters*, *337*(2), 81–8. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12031>
- Thoma, L., & Muth, G. (2015). The conjugative DNA-transfer apparatus of *Streptomyces*. *International Journal of Medical Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.020>
- Tippana, R., Xiao, W., & Myong, S. (2014). G-quadruplex conformation and dynamics are determined by loop length and sequence. *Nucleic Acids Research*, *42*(12), 8106–14. <http://doi.org/10.1093/nar/gku464>
- Todd, A. K., Johnston, M., & Neidle, S. (2005). Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Research*, *33*(9), 2901–7. <http://doi.org/10.1093/nar/gki553>
- Vogelmann, J., Ammelburg, M., Finger, C., Guezguez, J., Linke, D., Flötenmeyer, M., & Dieter, Y. (2016). Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK / SpoIIIE, *30*(11), 2246–2254. <http://doi.org/10.1038/emboj.2011.121>
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., & Waksman, G. (2010). Microreview: Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular Microbiology*, *12*(9), 1203–1212. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x>
- Wang, J. (2004). Nucleotide-dependent domain motions within rings of the RecA/AAA+ superfamily. *Journal of Structural Biology*, *148*(3), 259–267. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.07.003>
- Wang, Q., Liu, J., Chen, Z., Zheng, K., Chen, C., Hao, Y.-H., & Tan, Z. (2011). G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase. *Nucleic Acids Research*, *39*(14), 6229–37. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr164>
- Wu, L. J., & Errington, J. (1997). Septal localization of the SpoIIIE chromosome partitioning protein in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, *16*(8), 2161–9. <http://doi.org/10.1093/emboj/16.8.2161>
- Wu, X., & Maizels, N. (2001). Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Research*, *29*(8), 1765–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292849>
- Xu, Y., Feng, X., Du, W., Liu, X., Luo, Q., & Liu, B. F. (2008). Kinetic and thermodynamic characterization of telomeric G-quadruplex by nonequilibrium capillary electrophoresis: Application to G-quadruplex/duplex competition. *Analytical Chemistry*, *80*(18), 6935–6941. <http://doi.org/10.1021/ac801335y>
- Yen Shin, J., Lopez-Garrido, J., Lee, S.-H., Diaz-Celis, C., Fleming, T., Bustamante, C., & Pogliano, K. (2015). Visualization and functional dissection of coaxial paired SpoIIIE channels across the sporulation septum. *eLife*, *4*, e06474. <http://doi.org/10.7554/eLife.06474>