

5.1. Mutagènesi

En el laboratori de la Prof. Margarita Salas s'han construït diversos mutants de la proteïna p4 amb substitucions de residus que alteren la unió de la proteïna p4 amb el DNA, la majoria d'ells explicables en termes de l'estructura cristal·lina de la proteïna p4 unida al lloc 3.

La deleció dels 14 primers residus de l'extrem N-terminal resulta en un mutant incapaç d'unir-se al seu lloc d'unió (Rojo i Salas, 1990). Aquesta deficiència en la unió es deu a l'absència del *loop* de reconeixement, estructura essencial en el reconeixement de la seqüència de DNA per p4.

Existeixen altres mutants puntuals detallats en la Taula 5.1:

Mutant	Efecte
Lys3Ala	Sense efecte
Thr4Ala	No interacciona amb DNA
Gln5Ala	Augment de l'activitat
Arg6Ala	No interacciona amb DNA
Tyr9Ala	No interacciona amb DNA
His10Ala	Pèrdua parcial de la unió al DNA
Lys13Ala	Sense efecte
Tyr33Ala	Pèrdua parcial de la unió al DNA
Lys36Ala	Pèrdua parcial de la unió al DNA
Lys51Ala	Poca afectació de la unió al DNA
Arg54Ala	Poca afectació de la unió al DNA
Lys76Ala	Pèrdua parcial de la unió al DNA

Taula 5.1: Mutants construïts i el seu efecte.

Es poden distingir 4 grups de mutants segons la modificació que presenten en la seva habilitat en unir el DNA.

El primer grup estaria format pels mutants amb la capacitat poc afectada, els residus modificats dels quals serien Lys51Ala i Arg54Ala. Aquests residus són els que intervenen en la unió al DNA en la regió de dimerització. La poca repercussió que té la seva mutació en la unió al DNA ens indica que aquesta interacció no és essencial.

El segon grup estaria format pels mutants amb una capacitat d'unió al DNA bastant afectada. Els residus modificats en aquests mutants són His10Ala, Tyr33Ala, Lys36Ala i Lys76Ala. Tots ells intervenen en els contactes amb els fosfats en la zona del *loop* de reconeixement. Aquestes interaccions ajuden a corbar el DNA, reduint l'amplada del solc menor, i tal i com es demostra, la seva modificació compromet seriosament la unió de la proteïna al DNA.

El tercer grup compren els mutants que no poden unir-se al DNA. Els residus alterats en aquests mutants són Thr4Ala, Arg6Ala i Tyr9Ala. El residu Thr4, tal i com s'explica en l'apartat de resultats, és un residu bàsic per mantenir l'estructura del *loop* de reconeixement, establint diferents contactes que estableixen el gir de tipus β , i també contacta amb un grup fosfat. El residu Arg6 reconeix un dels dos nucleòtids reconeguts específicament, un nucleòtid de guanina. La seva mutació impedeix la unió al DNA per incapacitat de reconèixer la seqüència. Curiosament el residu Tyr9 no intervé en els contactes amb el DNA però la seva modificació també impedeix que el mutant s'uneixi al DNA. L'explicació l'hem de buscar en la funció que realitza aquest residu, servint de nucli hidrofòbic per unir el *loop* de reconeixement amb el cos de la proteïna (Figura 5.1). La proteïna p4 és rígida, i aquesta característica és la que permet corbar el DNA en la unió i mantenir el *loop* de reconeixement en la posició adient per interaccionar amb els solcs majors separats 2 voltes del DNA. Canvis en aquesta rigidesa probablement farien que la proteïna no unís el DNA eficientment.

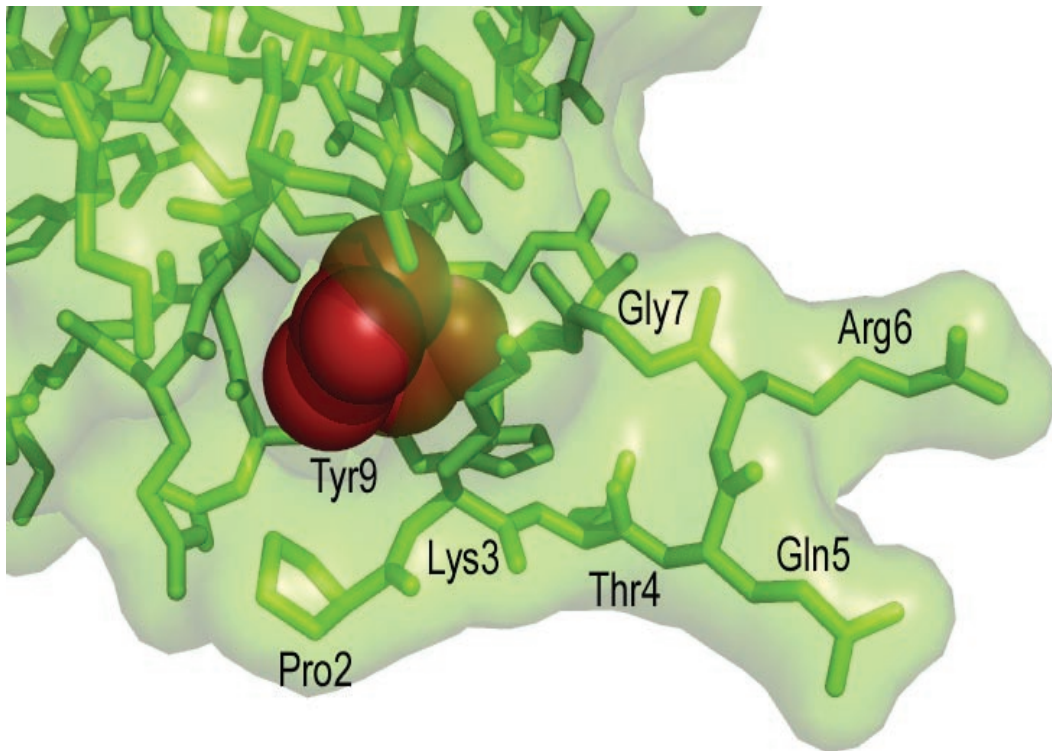


Figura 5.1: El residu Tyr9, en representació d'esferes de Van der Waals, fa contactes hidrofòbics amb els residus del *loop* de reconeixement, sobretot Lys3 i amb varis residus del cos de la proteïna.

El quart i últim grup el forma el mutant Gln5Ala, que té un efecte sorprenent, per inesperat, d'augmentar l'afinitat en la unió al DNA. Aquest augment en l'afinitat és difícil d'explicar, ja que es perd una interacció. En absència de l'estructura del complex d'aquesta proteïna mutant amb el DNA només podem especular. Per exemple: una possible causa seria una reordenació en el *loop* de reconeixement que suplís la interacció perduda.

5.2. Comparació amb les altres proteïnes homòlogues

Comparant la proteïna p4 del bacteriòfag $\phi 29$ amb les dels bacteriòfags B103, Nf i GA1 ens adonem que hi ha una gran conservació en les seqüències. Aquesta conservació arriba fins al 77 % en el cas de B103 i Nf (Figura 5.2).

En els bacteriòfags B103 i Nf, observant els residus que formen el nucli hidrofòbic i que contacten el DNA, veiem que es conserven plenament, amb la remarcable excepció de la substitució Gln5Ala, que tal i com hem vist en el cas dels mutants, no impedeix la unió al DNA sinó que l'augmenta.

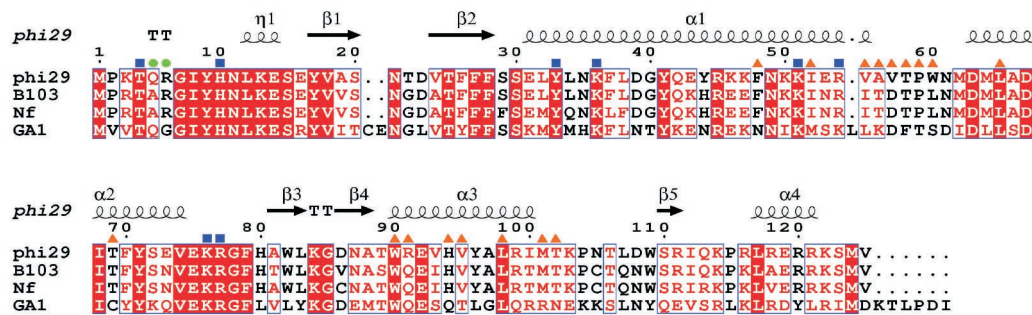


Figura 5.2: Alineament de seqüències de les 3 proteïnes homòlogues de p4. Els quadrats blaus marquen els residus que contacten els grups fosfat, els cercles verds els residus que contacten específicament les bases i els triangles taronges els residus que intervien en la dimerització.

El bacteriòfag GA1 presenta una identitat molt menor que les altres 2 proteïnes, essent aquesta del 41%. Els residus implicats en la interacció amb grups fosfat es conserven i la majoria de residus implicats en la dimerització mantenen el seu caràcter hidrofòbic. Novament és en els residus que uneixen DNA específicament on trobem alguna diferència. El canvi Arg6Gly que presenta la proteïna p4 de GA1, però en canvi, manté el residu Gln5. Aquest canvi sorprèn una mica menys quan observem els llocs d'unió a p4 del bacteriòfag GA1. Aquests llocs són poli A/T però no presenten cap G (que seria reconeguda pel residu Arg6) als extrems (Hocajadas *et al.*, 1999).

La regió carboxi terminal, implicada amb el contacte amb el αCTD i amb la proteïna p6, es troba conservada, incloent el residu clau en la funcionalitat de la regió, el residu Arg120. Aquest residu però, no es conserva novament en el cas del bacteriòfag GA1, on és substituït per un residu de tirosina.

5.3. Unió al DNA de p4

El paper principal de p4 en la regulació parteix de la capacitat que té p4 d'unir-se específicament en 3 llocs concrets de la regió intergènica que regula 3 dels promotors principals del fag $\phi 29$, els promotors A2b, A2c i A3.

Cada lloc d'unió de p4 (Barthelemy *et al.*, 1989), tal i com s'observa en l'estructura resolta es demostra i comprova que compren 31 parells de bases, contant 2 bases en sentit 5' a partir de la G reconeguda pel residu Arg6, que es distancien en 27 parells de bases.

L'estructura de la proteïna p4 unida al lloc 3 permet explicar les zones protegides en els *footprinting* dels llocs d'unió en presència de p4, protegint-se 3 zones per dímer. Aquestes proteccions corresponen, dues d'elles, a la unió per la zona del *loop* de reconeixement situat a l'extrem amino terminal de la proteïna i la tercera a la unió per la zona de dimerització.

El lloc 3, per el que p4 mostra una major afinitat, es troba intrínsecament corbat, el que ens indica que en el mecanisme d'unió al DNA intervé una gran component de reconeixement de forma, sumat al component electrostàtic, sobretot en l'extrem amino terminal, sempre important en la unió al DNA.

La importància de l'extrem amino terminal correlaciona amb la seqüència consens dels llocs d'unió de p4, TTGAAAAA-15pb-TTTTACAA (Barthelemy *et al.*, 1989), a més de demostrar-se per mutagènesi. Aquesta seqüència és específicament reconeguda per l'extrem amino terminal i la regió central consisteix en una seqüència que permet ser deformada, consistent en regions de poliadenines o de politimines.

5.4. Regió carboxi terminal de p4: l'hèlix $\alpha 4$

S'han descrit dos mecanismes de regulació transcripcional, un que implica solament la proteïna p4 i un segon que implica la formació d'un complex entre la proteïna p4 i la proteïna p6, en el que hi ha una cooperativitat en la unió, augmentant l'afinitat de la proteïna p4 pels seus llocs d'unió.

En tots dos mecanismes hi ha la mateixa regió de p4 implicada en els contactes. Aquesta regió és l'extrem carboxi terminal de la proteïna que contacta amb la RNA polimerasa, reclutant-la, en particular interaccionant amb el domini carboxi terminal de la subunitat α de la RNA polimerasa (α CTD). També interaccionant amb la proteïna p6, servint-li de centre de nucleació per poder polimeritzar a partir d'aquest punt i formar el complex de nucleoproteïna.

Un cop determinada l'estructura cristal·logràfica de la proteïna p4 unida al lloc 3, veiem com la regió de contacte amb el α CTD de la RNA polimerasa està continguda en una hèlix α mòbil ($\alpha 4$), que permetria adaptar-se al α CTD per afavorir la interacció.

En el mecanisme que implica el contacte entre les proteïnes p4 i p6 per iniciar la formació d'un complex de nucleoproteïna, tal i com hem apuntat, també hi intervé la mateixa regió de la proteïna p4, l'extrem carboxi terminal.

Els residus implicats en la interacció amb la proteïna p6 són diferents que els que contacten amb el α CTD. Això suposa que en un petit motiu d'estructura secundària ($\alpha 4$) existeixen dues superfícies especialitzades en el contacte específic amb dues proteïnes molt diferents en funció i en estructura.

Per una part, els residus més importants implicats en el contacte amb α CTD serien Arg116, Leu117 i sobretot Arg120, mentre que en el contacte amb la proteïna p6

serien els residus Arg118, Arg121 i Lys122. Tal i com mostren els residus implicats, en totes dues interaccions hi ha implicada una gran component electrostàtica.

5.5. Model d'interacció amb la RNA polimerasa

La proteïna p4 realitza la seva funció regulatòria de l'expressió gènica mitjançant la seva interacció amb la RNA polimerasa. Més concretament, la interacció es realitza amb la subunitat α i en particular el domini carboxi terminal (α CTD).

Hi ha diverses estructures resoltes de diferents α CTD (PDBiD: 1COO, 1DOQ, 1LB2), algunes d'elles formant complexos amb DNA i proteïnes reguladores de la transcripció. Malauradament no disposem de l'estructura de *B. subtilis*.

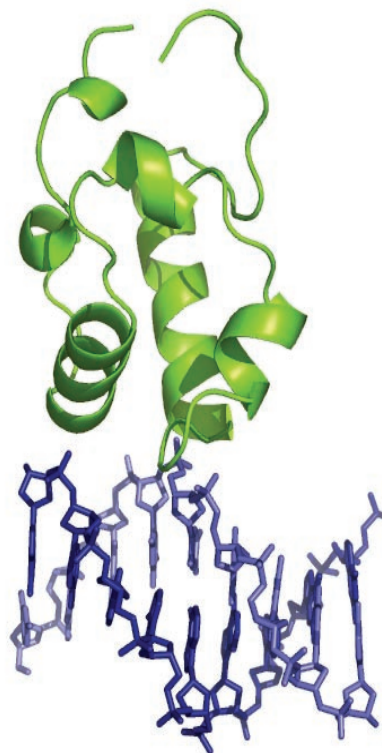


Figura 5.3: Representació de cintes del domini carboxi terminal la subunitat α de la RNA polimerasa de *E.coli*

A *E. coli*, el α CTD és un domini globular de 65 residus, amb una topologia tot- α , format per 4 hèlix α (Figura 5.3). Aquest domini interacciona amb el solc menor del DNA, per la inserció d'un *loop* dins el solc, i pels contactes de les hèlix $\alpha 1$ i $\alpha 2$.

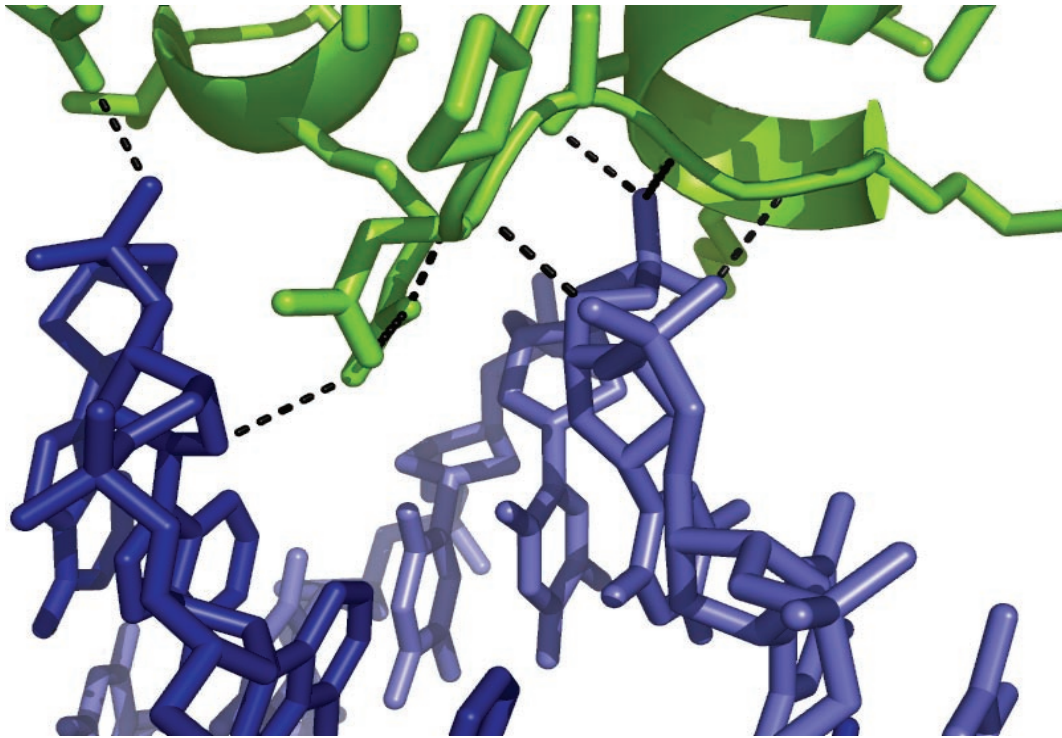


Figura 5.4: representació de les interaccions entre el α CTD i el fragment de DNA que contacta.

Tots els contactes són amb els fosfats, menys el residu Arg265, que interacciona amb un sucre de l'esquelet de DNA (Figura 5.4).

Si mirem el mapa de potencial electrostàtic del domini proteic veiem, com esperàvem, una regió de caràcter bàsic per on la proteïna contacta amb el DNA. La resta del domini es caracteritza per ser predominantment acídica (Figura 5.5).

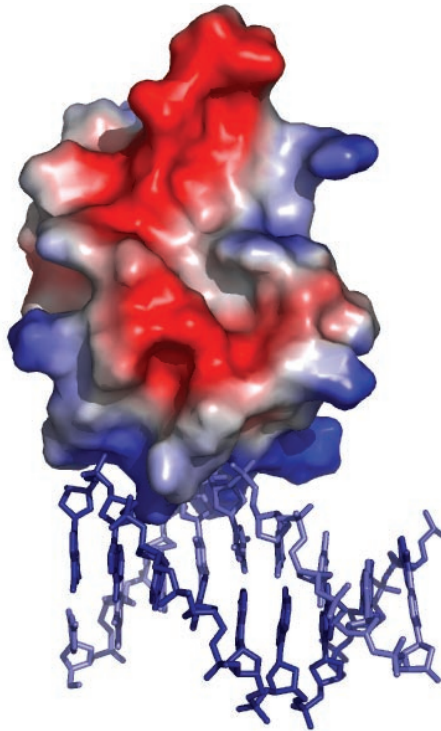


Figura 5.5: representació en forma de superfície de potencial electrostàtic del α CTD calculat amb GRASP (Nicholls, 1991).

En el promotor A3 el lloc d'unió al DNA del α CTD es troba centrat en la posició -49 respecte l'inici de transcripció (Camacho i Salas, 2004). Aquesta posició es troba a dos passos de volta del DNA de distància respecte a la situació de l'hèlix $\alpha 4$ de p4, que es trobaria sobre la posició -70.

A l'hora de construir un model de interacció ens adonem que la distància és massa gran per que puguin interaccionar les dues proteïnes i per tant, l'única manera per reduir la distància és que el DNA es corbi per poder superar els 20 Å que separen la proteïna p4 del α CTD (Figura 5.6).

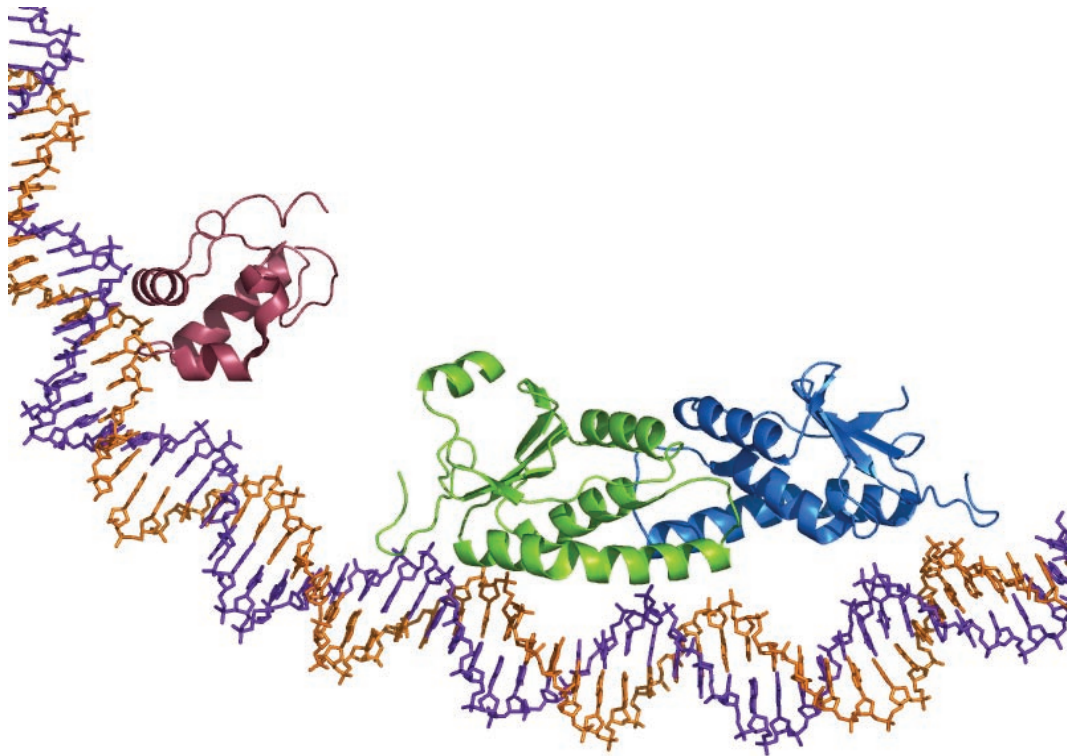


Figura 5.6: Model del complex ternari p4- α CTD-DNA, basat en els complexos p4-DNA i α CTD-DNA.

Observant el residu Arg120 de $\alpha 4$ de p4, ens adonem que aquest no es troba exposat al solvent, impossibilitant la seva interacció amb α CTD. Forçosament ha d'ocórrer un canvi conformacional en la regió de l'hèlix $\alpha 4$ que permeti exposar el residu Arg120 i que aquest interaccioni amb α CTD realitzant la seva funció reguladora de l'expressió.

La regió candidata a moure's, com s'ha apuntat repetides vegades al llarg de la memòria, és la regió que hi ha entre el final de $\beta 5$ i el principi de $\alpha 4$, al voltant del residu Pro115 (Figura 5.7). Aquesta regió és la més mòbil, tal i com es demostra en les diferents superposicions i en el fet de que $\alpha 4$ només es vegi en un monòmer atrapat per l'empaquetament del cristall.

El moviment proposat seria el següent:

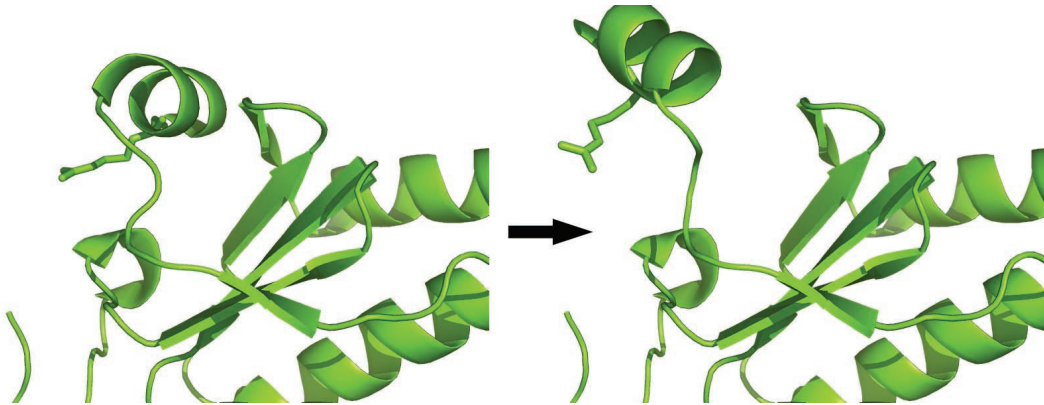


Figura 5.7: esquema del moviment de l'hèlix $\alpha 4$

Aquest moviment permetria encarar l'hèlix, i en concret el residu Arg120, cap on hipotèticament se situaria la molècula de α CTD.

En resum, aquest model proposa un canvi conformacional del que hi ha diferents evidències per suggerir que és el que realment té lloc. Per una part, en totes les estructures menys una, aquesta regió no presenta densitat electrònica, suggerint que la regió està desestructurada o que és mòbil. La segona evidència és que en l'única estructura on trobem densitat electrònica en la regió de $\alpha 4$, el residu clau per la interacció amb α CTD, el Arg120, es troba poc exposat al solvent, impeding la possibilitat de realitzar una interacció i que el diagrama de Ramachandran demostra que el residu proposat per fer el moviment es troba en una conformació forçada.

5.6. Discussió del rol de la proteïna p4 en la regulació transcripcional

El promotor disposa d'una col·lecció d'elements, que la seva combinació permet activar o reprimir la transcripció i la proteïna p4, amb la seva unió i la seva capacitat per interaccionar amb els altres elements que intervenen en aquesta regulació, forma el nucli central a partir del qual s'estructuren les diferents proteïnes que estan

implicades en la transcripció.

La proteïna p4, en unir-se al seu lloc d'unió, actua reclutant la RNA polimerasa o impedit la seva unió al promotor, depenent de la posició que ocupa dins dels llocs d'unió. En els llocs 1 i 3 impedeix la unió de la RNA polimerasa en els promotors A2b i A2c però promou la seva unió en el promotor A3. En el lloc 2, afavoreix la unió de la RNA polimerasa en el lloc A2c.

El reclutament de la RNA polimerasa al promotor pot activar la transcripció o inhibir-la. El diferent efecte ve determinat per l'estructura del promotor, en concret per la presència o absència de la regió -35 en el promotor.

L'estabilització de la proteïna p4 en els diferents llocs d'unió ve determinat per la diferent afinitat que presenta per cada lloc i per la capacitat que té la proteïna p6 per estabilitzar-la en cada lloc. Els llocs principals i, per tant, més afins són el 3 i el 1. Del lloc 1 pot ser desplaçada cap al 2 per efecte de la RNA polimerasa. La proteïna p6 és capaç d'estabilitzar la unió de la proteïna p4 als llocs 1 i 3, impedit qualsevol desplaçament de la proteïna p4 per part de la RNA polimerasa.