

Diseño de constructos para el estudio de la interacción FurA-DNA mediante métodos de molécula única

Autor: Bruscas Serrano, Jose Ignacio (Licenciado en Bioquímica, Profesor de Biología y Geología de Secundaria).

Público: Estudiantes de doctorado de bioquímica. **Materia:** Bioquímica. **Idioma:** Español.

Título: Diseño de constructos para el estudio de la interacción FurA-DNA mediante métodos de molécula única.

Resumen

Se ha diseñado y desarrollado el primer sistema de pinzas ópticas de nuestro país, y los primeros experimentos a realizar tras su calibración, van a consistir en la medición de las fuerzas de interacción de la proteína FurA de *Anabaena*, con distintas secuencias dianas. Este trabajo consiste en el desarrollo de unos constructos con los que poder llevar a cabo estas medidas, mediante el establecimiento de unos protocolos de funcionalización, que se adecuen a las propiedades de la proteína FurA, de las cajas que se han diseñado, y a las condiciones de medida de los sistemas (AFM y pinzas ópticas).

Palabras clave: Molécula única, Pinzas ópticas, FurA-ADN.

Title: Design of constructs for the study of the FurA-DNA interaction by means of single molecule methods.

Abstract

The first system of optical tweezers of our country has been designed and developed, and the first experiments to be carried out after its calibration, will consist in the measurement of the interaction forces of the FurA protein of *Anabaena*, with different target sequences. This work consists of the development of some constructs with which to carry out these measures, by means of the establishment of functionalization protocols, which are adapted to the properties of the FurA protein, of the boxes that have been designed, and to the conditions of measurement of the systems (AFM and optical tweezers).

Keywords: Full-methods, FurA-DNA, *Anabaena*.

Recibido 2018-06-28; Aceptado 2018-07-04; Publicado 2018-07-25; Código PD: 097116

1- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Este Trabajo Académicamente Dirigido (TAD), está realizado en el Instituto Universitario de Investigación de Nanociencia de Aragón (INA), y el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza, bajo la dirección de las Dras. Ana Isabel Gracia Lostao y María F. Fillat.

El Dr. Baró ha diseñado y desarrollado el primer sistema de pinzas ópticas de nuestro país, y los primeros experimentos a realizar tras su calibración, van a consistir en la medición de las fuerzas de interacción de la proteína FurA de *Anabaena*, con distintas secuencias dianas o "iron boxes", a las que la proteína FurA se une para regular su síntesis.

Esta fuerza de interacción se va a intentar medir con el sistema de pinzas ópticas, y simultáneamente el sistema también se va a estudiar mediante Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM), para visualizar el modelo de unión de la proteína al DNA.

El objetivo de este trabajo ha consistido en desarrollar unos constructos con los que poder llevar a cabo estas medidas, mediante el establecimiento de unos protocolos de funcionalización, que se adecuen a las propiedades de la proteína FurA, de las cajas que se han diseñado, y a las condiciones de medida de los sistemas (AFM y pinzas ópticas).

En concreto, se realizarán:

- 1.- Constructos conteniendo diferentes secuencias diana de FurA mediante su unión a un brazo de DNA procedente del fago Lambda funcionalizado con biotina.
- 2.- La inmovilización de dichos constructos en microesferas con estreptavidina.
- 3.- La inmovilización de FurA con glutaraldehído a microesferas aminadas.
- 4.- El aislamiento y análisis del plásmido pGEMT albergando la secuencia promotora de *furA* con sus correspondientes cajas Fur.

Los resultados de las medidas, tanto de las pinzas ópticas como del AFM, se obtendrán a más largo plazo, pues son técnicas muy complejas basadas en el uso de complicado manejo, donde la optimización de las condiciones de la metodología requiere un periodo largo de tiempo, por lo que no son objeto de este estudio.

1.1- MÉTODOS DE MOLÉCULA ÚNICA

Los procesos químicos y bioquímicos hasta este momento han sido estudiados mediante el método de “réplica” en el cual muchas moléculas de una o varias especies son investigadas al mismo tiempo. En estas medidas macroscópicas, los cambios en las características de cada molécula individual que acompañan estas transformaciones se suman para proporcionar una señal cuantificable. Este método tiene limitaciones. La señal macroscópica corresponde realmente a la suma asincrónica de las contribuciones de cada una de las moléculas en el conjunto y, como tal, representa un promedio temporal y poblacional de los cambios experimentados por cada molécula. Sin embargo, muy pocas de las moléculas dentro del conjunto se comportan realmente como este promedio, e interpretar los cambios fluidos y continuos característicos de observaciones macroscópicas en términos de transformaciones igualmente fluidas y continuas en el nivel molecular es engañoso e incorrecto.

A nivel molecular, los procesos químicos ocurren de una manera estocástica. Las moléculas chocan y reaccionan unas con otras como entidades discretas para formar productos que pueden transformarse nuevamente en las especies reactantes iniciales.

Los métodos tradicionales o “bulk methods” son:

- Robustos, pero se tiene poco control de las fuerzas desarrolladas en el curso de una reacción química.
- Las medidas de las propiedades son el tiempo y los promedios de la población: Se eliminan las variables. Las fluctuaciones en su mayoría son anuladas.
- Una molécula es idealizada con una dinámica bien definida
- Se asume que la población es homogénea.

En los métodos de molécula única:

- Las moléculas muestran una exposición rápida y una dinámica instantánea.
- Aparecen comportamientos al azar o estocásticos
- Predominan las fluctuaciones.
- Se considera que las moléculas co-existen en diversos estados o poblaciones
- Las moléculas se pueden encontrar en estados alejados de la media de la población.

Los métodos recientes de manipulación mecánica directa de moléculas individuales, permiten entre otras cosas:

- Medir directamente las fuerzas que mantienen unidas las estructuras moleculares.
- Determinar las tensiones y el estrés generados en el curso de reacciones químicas y bioquímicas.
- Ejercer fuerzas externas para alterar el grado e incluso el destino de estas reacciones.
- Deducir las reglas que gobiernan la interconversión entre la energía química y la mecánica en estos procesos.

Las dos características que distinguen los experimentos de molécula única son:

- El papel desempeñado por las fuerzas o pares de torsión directos observables del experimento
- La importancia de las fluctuaciones

Las técnicas de molécula única permiten que tanto macromoléculas como células dinámicas sean seguidas en tiempo real.

Los conceptos de la manipulación y la observación son difíciles de conciliar en el mismo experimento, ya que la primera supone un ensayo activo y el segundo uno pasivo.

Al acercarnos a la escala molecular, la manipulación, complica inevitablemente el proceso de observación, por lo que ésta, ya no es pasiva. Como consecuencia de ello, la reacción podría ser modificada de una forma incontrolable. Por esta razón, antes de que un llevar a cabo un ensayo de molécula única, dos cuestiones se deben de tener en cuenta:

- Que nueva información podemos esperar obtener que no es accesible a la mayor parte de los ensayos bioquímicos.
- De qué forma la preparación de la muestra y de la acción de medir interferirá con la señal que se esperan obtener.

Estos métodos se usaron inicialmente en los estudios de la elasticidad de moléculas individuales de DNA. Actualmente, se han extendido a otros sistemas y constituyen una eficaz herramienta, cuya versatilidad permite seguir múltiples procesos químicos y bioquímicos a tiempo real.

Existen varios tipos de métodos de molécula única, y en este proyecto se van a utilizar dos, el Microscopio de Fuerzas Atómicas (AFM) y las pinzas ópticas.

1.2- MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS

El Microscopio de Fuerzas Atómicas o AFM puede escanear una superficie con una punta muy pequeña de unas pocas micras de largo y un diámetro más pequeño aún, de unos 20-40 nanómetros.

La punta está unida en el extremo de una palanca flexible o cantilever. Esta palanca miniaturizada se dobla cuando la punta hace contacto o se aproxima mucho a la muestra. La flexión del cantilever se mide a través de un detector al mismo tiempo que se efectúa un barrido sobre la superficie de la muestra. Dado que todo esto ocurre dentro de unas dimensiones muy pequeñas el barrido ocurre a gran velocidad, en comparación con lo que sucedería con una sonda y una barra flexible macroscópica.

El barrido puede consistir en mover la punta en distintas partes de la muestra o mover la muestra y dejar la punta fija. La deflexión del cantilever en cada punto se registra mediante una tarjeta electrónica conectada a ordenador y se genera un mapa del relieve o topografía de la muestra. Los AFM, a diferencia del microscopio de efecto túnel, se pueden usar para todo tipo de muestras, ya sean conductoras, aislantes o semiconductoras y en cualquier medio, vacío, aire o líquido.

Las fuerzas que actúan sobre el cantilever son varias. Una de ellas es la fuerza de Van del Waals que ocurre entre átomos. Esta fuerza puede ser de atracción o de repulsión, dependiendo de la distancia entre los átomos.

Esto da lugar a distintos modos de operación: el modo de contacto, donde la punta mantiene un contacto físico suave con la muestra; el modo de no-contacto, donde se excita el cantilever cerca de su frecuencia de resonancia de modo que vibre cerca de la superficie de la muestra, a una distancia comprendida entre 10 y 100 Å; y el modo de contacto intermitente, donde la punta está en contacto intermitente con la superficie a la vez que la barre.

La mayoría de los AFM comerciales detectan la posición del cantilever con métodos ópticos, uno de los sistemas mas comunes es usar un rayo láser que se refleja en el extremo del cantilever y luego actúa sobre un fotodetector. El detector contiene particiones que permiten detectar cambios pequeños en la posición del haz incidente, incluso de unos pocos angstroms. El camino óptico ente el cantilever y el detector produce una amplificación mecánica de la señal del láser y como consecuencia el sistema llega a detectar movimientos verticales de la punta con una precisión inferior a un angstrom. Una vez que el AFM detecta la flexión del cantilever en cada punto se puede generar un mapa topográfico de la muestra. Esta operación puede hacerse en modos distintos: manteniendo la altura, la fuerza o la amplitud constante.

El AFM no sólo permite la obtención de imágenes por escaneado sino la obtención de fuerzas de interacción intermoleculares mediante lo que se denomina espectroscopia de fuerzas.

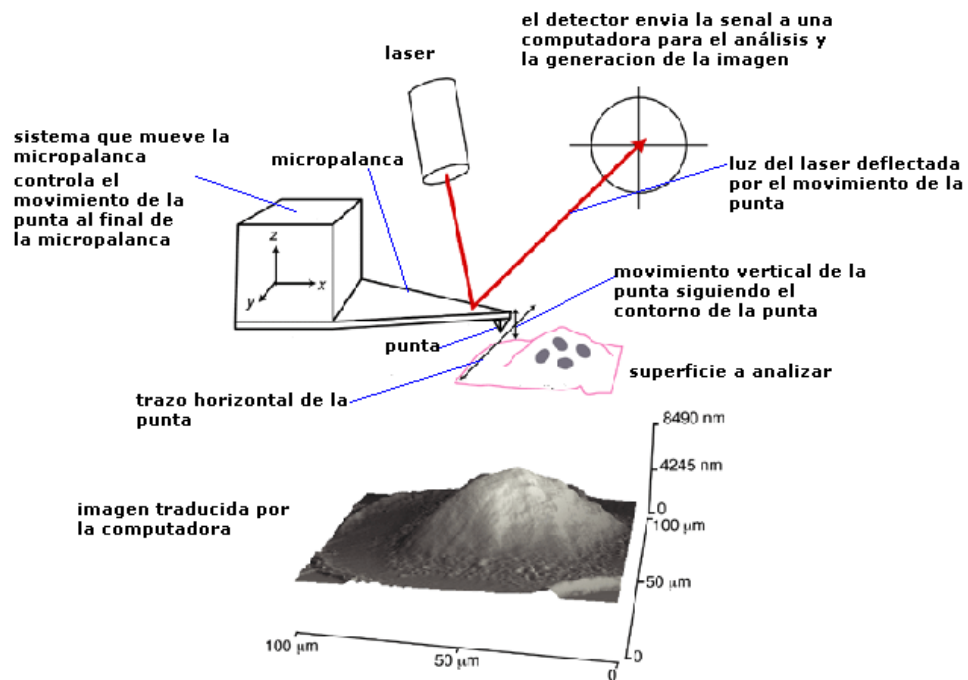


Fig.1 -Esquema del funcionamiento general de un AFM.

Se va a utilizar la técnica del AFM para visualizar el modelo de unión de la proteína FurA con las iron boxes introducidas en un plásmido. Esto permitirá ver si la proteína se une al DNA como dímero, trímero, tetrámero, u otros, y en que condiciones se da esta unión. Se va a utilizar un plásmido para trabajar con un DNA más sencillo y con menos enrollamiento que el de un cromosoma bacteriano, con una mayor concentración efectiva de secuencias diana al objeto de obtener unas imágenes claras que no se solapen. Se utilizará el Modo Jumping, modo de contacto intermitente, para la realización de dichas medidas.

1.3- PINZAS ÓPTICAS

Las pinzas ópticas son un método basado en la luz que permite la manipulación en tiempo real de las células y moléculas individuales para medir sus interacciones.

Los objetos de tamaño microscópico o más pequeños pueden ser capturados y centrados firmemente por un rayo láser. Esto permite medir los desplazamientos en el rango de sub-nanómetro y las fuerzas de décimas de picoNewton con milisegundos de duración.

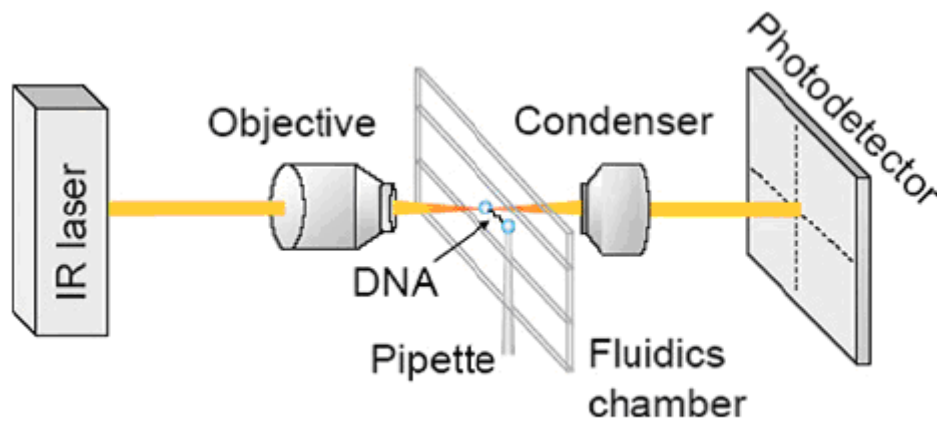


Fig.2- Esquema de funcionamiento de las pinzas ópticas que se van a utilizar (Hormeño et. al. 2006)

En lo que se refiere a los fundamentos de la física, una trampa óptica se puede lograr, debido a que la presión de las radiaciones impartidas por fotones se utilizan para equilibrar una fuerza externa que actúa sobre un objeto material. Sobre la base de este principio, hacer mediciones de fuerza y la manipulación de las pequeñas partículas es posible. Por otra parte, el uso de la radiación visible y del infrarrojo cercano hace que las pinzas ópticas sean relativamente no invasivas para experimentos biológicos.

A nivel de una sola molécula es posible, por ejemplo, medir en tiempo real la fuerza concomitante generada durante los cambios conformacionales experimentada por una proteína en su cinética de plegamiento/desplegamiento, o estudiar el ciclo catalítico de una enzima, la mecánica del ADN, el comportamiento de los motores moleculares.

También se pueden estudiar orgánulos, o cromosomas de células enteras.

En el contexto de la biología celular y molecular, los nuevos tipos de información que pueden facilitar, y las aplicaciones en las que se pueden usar pinzas ópticas, hacen que esta sea una técnica potencialmente más ventajosa que otros métodos de molécula única.

Procesos bioquímicos investigados hasta la fecha han puesto de manifiesto que las fuerzas que en ellos se desarrollan, están en el rango de los piconewton, y, de entre las técnicas existentes, las pinzas ópticas son las que mejor se adaptan a este rango; las pinzas magnéticas normalmente cubren fuerzas de hasta 10 pN, y el AFM funciona mejor por encima de decenas de pN.

Las pinzas ópticas, así como pinzas magnéticas y el AFM, son un instrumento capaz de medir el tiempo, la distancia y la fuerza simultáneamente, y después del análisis de los datos obtenidos, se pueden obtener velocidades, energías, pausas, y también funciones termodinámicas, tiempos de relajación y constantes de velocidad. A nivel molecular, en donde las reacciones químicas están involucradas, la energía es también muy representativa.

La fuerza ejercida por un campo óptico sobre una partícula depende de su índice de refracción. Debido a esto, las partículas pueden clasificarse en general en di-eléctricas (no absorbentes) y metálicas (absorbentes).

Se ha demostrado que las partículas di-eléctricas son atraídas a las regiones de mayor intensidad de campo. Por el contrario, las partículas metálicas son sometidas a fuerzas que las empujan fuera de las regiones de mayor intensidad (Arias-Gonzalez and Nieto-Vesperinas, 2002, 2003). Biomoléculas y células han demostrado que se comportan como partículas di-eléctricas, pero los átomos, por el contrario, tienen una mayor complejidad de comportamiento.

1.3.1- Pinzas ópticas en biología

La capacidad de las pinzas ópticas para ejercer y medir las fuerzas de pequeñas moléculas, es adecuada para investigar una gran variedad de fenómenos tanto en la biología celular como en la molecular. Además, al igual que el AFM, permite realizar la medida en líquido, ya que las microesferas de trabajo quedan sumergidas dentro de la cámara fluidica.

El tipo de experimentos que se pueden configurar es diverso y sigue creciendo. Básicamente, la muestra y el movimiento o cambio de conformación que se espera llevar a cabo, dictan la estrategia del experimento, con la participación de la preparación bioquímica de la muestra y de la configuración de la óptica del sistema. En la caso de las pinzas ópticas, las condiciones fisiológicas de la muestra están influenciadas porque se coloca en la vecindad de una región irradiada. Además, las moléculas son sujetadas mecánicamente, normalmente a través de microesferas, lo que no ocurre en las condiciones normales de vida.

Se pretende usar las pinzas ópticas para medir la fuerza de la interacción entre la proteína FurA y distintas secuencias diana, utilizando unos constructos para poder realizar la medida mediante este método.

1.4- PROTEÍNA FUR (FERRIC UPTAKE REGULATOR)

El hierro es un componente esencial del grupo hemo y de los centros sulfoférricos de numerosas proteínas, y por ello tiene gran importancia en muchos procesos vitales para la célula, tales como la fotosíntesis, la protección frente al estrés oxidativo, la asimilación de nitrógeno, la respiración y la síntesis de ribonucleótidos, entre otros .

A pesar de ser uno de los elementos más abundantes de la naturaleza, en los ambientes acuáticos aeróbicos la mayor parte del hierro se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos insolubles, de modo que su disponibilidad biológica es muy baja. Por este motivo, la deficiencia de hierro es uno de los estreses más comunes en muchos organismos. Por otro lado, un exceso de hierro puede provocar la aparición de ROS (especies reactivas de oxígeno). El hierro, en cualquiera de sus dos estados de oxidación, es capaz de catalizar la formación de los radicales hidroxilo -OH, los cuales son extremadamente reactivos y pueden dañar todos los componentes celulares. Por estos motivos, la incorporación y el almacenamiento de hierro tienen que estar estrictamente regulados, y en la mayoría de los procariontes una de las proteínas encargadas de esta regulación es la proteína Fur (ferric uptake regulator).

Inicialmente descritas como reguladores de la homeostasis de hierro, actualmente se conoce que la proteínas Fur son reguladores globales de la transcripción en procariontes (Hernández et al. 2002). Estas proteínas son de pequeño tamaño, entre 13kDa y 19kDa, de acuerdo con su composición aminoacídica. El alineamiento de la secuencia de todas ellas muestra varias regiones altamente conservadas, como el motivo de histidinas H₃₋₅X₂CX₂C considerado como característico de esta familia. Es importante la escasa abundancia de residuos triptófano en las proteínas Fur, ya que varían entre 0 y 2, lo que influye en sus coeficientes de extinción molar, haciéndolos bajos y complicando su detección espectrofotométrica.

En 2003, se publicó la primera estructura tridimensional de una proteína Fur, en concreto Fur de *Pseudomonas aeruginosa*. Es una estructura con una resolución de 1.8 Å que se presenta como un dímero, con un sitio de unión de zinc y otro sitio diferente de unión de hierro en cada monómero.

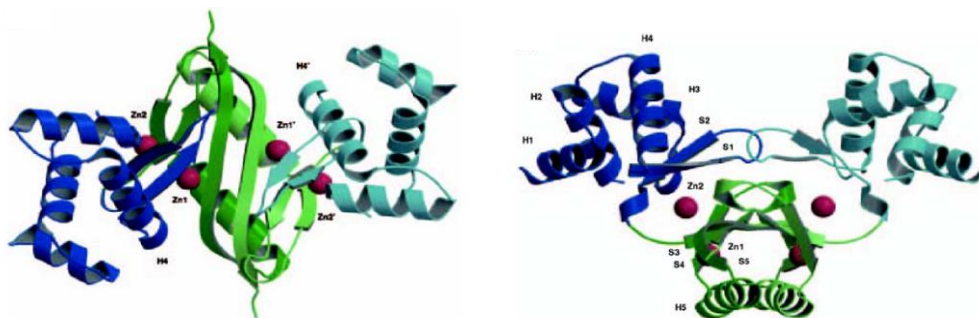


Fig.3 - Estructura de Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Pohl et al. 2003)

El mecanismo, muy simplificado, que se propone para Fur es el de un represor clásico: Cuando los niveles de hierro aumentan, esta proteína se une de forma específica, utilizando el Fe²⁺ como corepresor, a los promotores de los genes que

regula, modulando su expresión. Estos genes, suelen codificar proteínas que actúan como quelantes de hierro, y que son usadas por la célula para captarlo, cuando este escasea en el medio. Así, si la concentración de hierro es suficiente se une al DNA impidiendo la unión de la RNA polimerasa y con ello la transcripción de esos genes. En ausencia de hierro el promotor deja de estar reprimido ya que en esas condiciones Fur no es capaz de unirse al DNA (Figura 4).

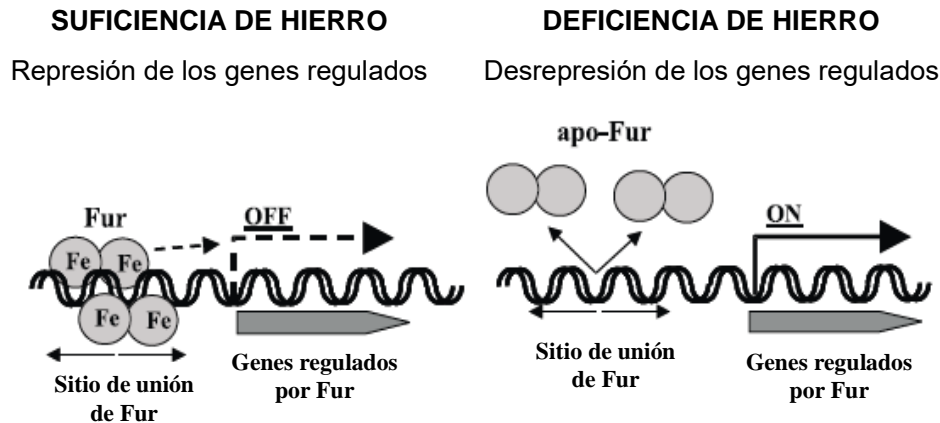


Fig.4 - Metabolismo de Fur en condiciones de deficiencia o de suficiencia de hierro.

1.4.1.-FurA de *Anabaena* sp PCC 7120

FurA es una de las 3 proteínas Fur identificadas en el genoma de *Anabaena* (cita Hernández et al.2004). Es la más abundante, tiene 151 aminoácidos y en su estructura primaria encontramos 12 residuos de histidina y 5 residuos de cisteínas (tres de las cuales se encuentran en el dominio C-terminal mientras que las dos restantes forman parte del motivo de histidinas típico de la familia Fur). Posee un peso molecular de 1742 Da., su punto isoeléctrico teórico estimado para la proteína según su secuencia primaria es de 6'9.

La proteína FurA presenta un espectro en la región del ultravioleta visible con un máximo situado a 276 nm. Se puede realizar un cálculo del coeficiente de extinción molar teórico, basándonos en el contenido en aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe) en la secuencia proteica y en el estado redox de los residuos de cisteína. FurA posee un residuo de triptófano, cinco residuos de tirosina y tres residuos de fenilalanina, lo que dio un valor teórico de $12940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 276 nm.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- PREPARACIÓN DEL SISTEMA PARA PINZAS ÓPTICAS

Se prepararon unos constructos para poder medir la fuerza de la interacción entre la proteína FurA y distintas iron boxes, utilizando la siguiente estrategia:

- Se funcionalizaron microesferas con estreptavidina en su superficie con un fragmento del DNA del fago λ , al que por un extremo se unió la biotina para su unión con la estreptavidina, y en el otro, se unieron las distintas cajas con las que se quiere medir la interacción con FurA. Se ha elegido este DNA, porque tiene una longitud adecuada, ya que las microesferas han de estar como mínimo a 2 micras, aunque si es más mejor, y este fragmento de fago de 24500 pb tiene 8 micras, lo cual es una distancia óptima.

- Se funcionalizaron microesferas con grupos amino en su superficie con la proteína FurA, a través del uso de un crosslinker homobifuncional, que permitió entrecruzar los grupos amino de la microesfera con los grupos amino de las lisinas de la proteína.

2.1.1- Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 2 oligonucleótidos conteniendo cada uno de ellos una secuencia de reconocimiento de FurA en *Anabaena*. Una de ellas coincide con el consenso de reconocimiento propuesto para Fur en heterótrofos, que se denominó “consensus” y la otra es una secuencia de reconocimiento determinada en *Anabaena* experimentalmente (Hernández et al. 2006) llamada site I. Ambos oligos llevan en un extremo una secuencia complementaria para unirse al DNA cortado con la enzima de restricción *Xba* I.

Paralelamente se diseñaron 2 oligonucleótidos complementarios a los descritos excepto en las 4 bases de la zona de restricción de la enzima.

Para la caja site I:

▪ *Xba* I *Ava* I → 5' CTAGAtccaaatatttttgttatattctcaattaacaagc 3'

(25% de G+C, Tm=53°C)

▪ rev *Ava* I → 5' gcttgtaattgagaatataacaaattttggat 3'

(22% de G+C, Tm=50°C)

Para la caja consenso canónica:

▪ *Xba* I-Fur consensus → 5' ctgacccagataatgataatcattaTcgg 3'

(36% de G+C, Tm=52°C)

▪ rev-Fur consensus → 5' CCGATAATGATTATCATTATCtGG Gt 3'

(34% de G+C, Tm=48°C)

Se diseñó otro oligonucleótido, que se denominó SOC-LE, que tiene 12 bases complementarias al extremo 5' del fago, y al que se le han añadido 12 adeninas para facilitar la reacción posterior con la transferasa terminal que uniremos al otro extremo del DNA, para biotinizarlo.

▪ SOC-LE → 5'- AGG TCG CCG CCC AAA AAA AAA AAA -3'

Los 5 oligos (Invitrogen) se prepararon en agua a una concentración de 100 µM.

2.1.2- Preparación del DNA

Biotinización de SOC-LE

Se añaden nucleótidos que tienen biotina al extremo del oligo SOC-LE, mediante la terminal transferasa. Se sigue el protocolo “DIG Oligonucleotide Tailing Kit”

Mezcla de reacción: - Oligo SOC-LE (100 µM) => 5 µl (496 pmol, 3,68 µg)

- Reaction buffer 5x => 16 µl

- Disolución de CoCl₂ => 16 µl

- dNTPs-Biotina => 4 µl

- dATP (100 mM) => 4 µl

- Terminal Transferasa => 4 µl

- Agua => 31 µl

(Volumen total = 80 µl)

La mezcla se incubó en un baño húmedo a 37 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo en hielo, añadiendo 4 µl de EDTA (0,2 M) a pH 8.

Purificación de SOC-LE-Biotina

Se purificó el oligo biotinilado, utilizando el protocolo del kit QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen), para su posterior unión al fragmento del fago λ .

A los 84 μ l de disolución, se añadió 840 μ l de tampón PN y se trasvasó a una columna del kit unida al tubo colector. Se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm y se descartó el sobrenadante (que se quedó en el tubo colector)

Se añadió 750 μ l del buffer PE y se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm. El fluido se descartó y se volvió a centrifugar 1 minuto a 1000 rpm. Se colocó la columna en un eppendorf nuevo, y se añadieron 200 μ l de buffer EB y tras esperar 1 minuto, se centrifugó otro minuto a 13000 rpm para desechar después la columna.

Aquí se obtuvieron aproximadamente unos 2,108 mM o pmol/ μ l (asumiendo el 15 % de pérdida).

Fosforilación de SOC-LE-Biotina

Se coloca un grupo fosfato en el extremo 5' del oligo purificado, para poder generar un enlace fosfodiéster con el extremo del fago λ .

Aquí se tienen 200 μ l del paso anterior.

Mezcla => SOC-LE-Biotina purificado =>	200 μ l
- T4 PNK (New England Biolabs)=>	25 μ l
- T4 ligase buffer 10x (Biolabs) =>	40 μ l
- dATP (100 mM) (Biolabs)=>	4 μ l
- Agua =>	131 μ l

(Volumen final => 400 μ l)

La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 1 hora y posteriormente para inactivar la enzima a 70 °C durante 20 minutos.

Se asume la pérdida del 50 % del oligo => 0,62 pmol/ μ l de P-SOC-LE-Biotina

Digestión del fago λ

Se corta el DNA del fago λ con la enzima de restricción *Xba* I, para utilizarlo como soporte de DNA donde se unirán tanto las cajas cuya interacción con FurA queremos estudiar, como el oligo biotinilado en los pasos anteriores.

Mezcla =>	- DNA del fago λ =>	8 μ l (4 μ g)
	- NE buffer 10x (Biolabs) =>	20 μ l
	- BSA 100x (Biolabs) =>	2 μ l
	- <i>Xba</i> I (Biolabs) =>	2 μ l
	- Agua =>	168 μ l

(Volumen final => 200 μ l a 20 ng/ μ l de DNA)

La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche y la inactivación de la enzima fue a 70°C durante 20 minutos. La conservación se realiza a -20°C.

De aquí se separa una alícuota de 50 μ l para controles

Ligación de SOC-LE-Biotina al fago λ -*Xba* I

Creación del enlace fosfodiéster entre el oligo biotinilado, y el extremo no cortado por *Xba* I del fago λ .

Preparación de Annealing buffer 5x => -50 μ l de Tris-Cl 1 M pH 7

-50 μ l de Tris-Cl 1 M pH 8

-10 μ l de Solución de MgCl₂

-890 µl de Agua

(Volumen final => 1000 µl a 100 mM en Tris-Cl y 10 mM en MgCl₂)

- Mezcla de reacción: -Fago λ-Xba I => 150 µl (3 µg)
- P-SOC-LE-Biotina => 18 µl (11,1 pmol)
- Annealing buffer 5x => 42 µl

(Volumen final => 210 µl)

La mezcla se incubó durante 10 minutos a 68°C y luego durante 1 hora a 42 °C. Se guardaron alícuotas de 70 µl para controles y de 70 µl para cada una de las cajas.

Fosforilación y apareamiento de los oligos (cajas)

Se realiza la fosforilación y la hibridación de las cajas de oligonucleótidos, que posteriormente uniremos al fragmento del fago λ mediante el enlace fosfodiéster.

Hay que hacer el proceso para cada una de las cajas (Av I y consensus)

Mezcla de fosforilación:

- Xba I Av I => 1,24 µl
- rev Av I => 1,32 µl
- T4 PNK (Biolabs) => 7 µl
- Buffer ligasa (Biolabs) => 10 µl
- dATP (Biolabs) => 1 µl
- Agua => 70,5 µl

(Volumen final => 91 µl a 1,36 nmol/ml o 1,36 µM del oligo directo)

Mezcla de fosforilación:

- Xba I-Fur consensus => 1,24 µl
- rev-Fur consensus => 1,32 µl
- T4 PNK (Biolabs) => 7 µl
- Buffer ligasa (Biolabs) => 10 µl
- dATP (Biolabs) => 1 µl
- Agua => 70,5 µl

(Volumen final => 91 µl a 1,36 nmol/ml o 1,36 µM del oligo directo)

Las mezclas de fosforilación se mantienen 1 hora a 37°C

Las preparaciones para control, no hace falta fosforilarlas, porque no las vamos a unir al fragmento del fago λ.

Mezcla para controles: -Xba I Av I => 4,96 µl

- rev Av I => 5,28 µl
- Agua => 390 µl

(Volumen final => 400 µl a 1,24 nmol/ml o 1,24 µM del oligo directo)

Mezcla para controles: - Xba I-Fur consensus => 4,96 µl

- rev-Fur consensus => 5,28 µl
- Agua => 390 µl

(Volumen final => 400 μ l a 1,24 nmol/ml o 1,24 μ M del oligo directo)

El Annealing se realizó en un gradiente de temperaturas de 95°C a 4° en 2 horas, tanto de las mezclas de fosforilación como de las mezcla control, para hibridar las cajas.

-Se pusieron a 95°C durante 1 minuto, y luego se colocaron en dos litros de agua, que había alcanzado previamente el punto de ebullición. Fue introducido en la cámara fría (a 4°C) donde se fue enfriando lentamente.

Se asume de nuevo la pérdida del 50% de los oligos en este paso => 0,68 nmol/ml de las mezclas de fosforilación, y 0,62 nmol/ml de las mezclas control

Ligación de cajas al fago-*Xba* I-SOC-LE-Biotina

Unión de las cajas ya hibridadas y fosforiladas, mediante la formación de un enlace fosfodiéster al fragmento del fago λ , por el extremo cortado por la enzima *Xba* I.

De nuevo se realiza para ambas cajas, consensus y Av-I

Las cajas están a 680 fmol/ μ l, y se realiza primero una dilución a aproximadamente 20 fmol/ μ l:

4,52 μ l de oligo + 135,5 μ l de Agua => 21,9 fmol/ μ l

Mezcla de ligación =>

-Caja a 21,9 fmol/ μ l => 2 μ l (En una mezcla con Av I y en otra con consensus)

- λ -SOC-LE-Biotina => 20 μ l

-Ligase buffer (Biolabs) => 4 μ l

-T4 DNA ligasa (Biolabs) => 4 μ l

-dATP (100 mM) (Biolabs) => 0,2 μ l

-Agua => 9,8 μ l

(Volumen final => 40 μ l)

La mezcla se incubó toda la noche a temperatura ambiente y la enzima se inactivó a 70°C durante 10 minutos.

2.1.3- Funcionalización de microesferas con DNA

Preparación de microesferas

Se utilizaron microesferas de poliestireno de 2 μ m de diámetro recubiertas de estreptavidina al 0,5% (w/v) de la casa Kisker.

Previamente a su uso, se cambió la solución de partida en la que vienen las esferas para ponerlas en el medio adecuado para el experimento.

La solución, se mezcló y se homogeneizó (porque las microesferas tienden a agregarse). De ella se tomó 200 μ l y se centrifugó a 1000 xg durante 3'. El sobrenadante fue decantando suavemente (porque las microesferas, en seguida se resuspenden), y las microesferas se resuspendieron en 200 μ l de PBS-0,1 mg/ml de BSA.

Este lavado se llevó a cabo 3 veces => Se obtuvo la "Solución de microesferas o ME"

Funcionalización

Con el objetivo de unir el DNA a las esferas, se incuban las microesferas disueltas en PBS-0,1 mg/ml de BSA, con distintas concentraciones de Biotina -SOC-LE -fago-*Xba* I-Caja de DNA.

Se genera un enlace entre la biotina del fragmento de DNA y la estreptavidina que recubre la superficie de las microesferas.

Se realizaron las siguientes mezclas:

I		II	III	
Biotina-SOC-LE-Fago λ -XbaI-cajas (μ l)	Microesferas con estreptavidina (μ l)	Concentración final de fago λ -XbaI (ng/ μ l)	Biotina-SOC-LE-Fago λ -XbaI sin cajas (μ l)	Microesferas con estreptavidina (μ l)
7	3	0,25	1,75	48,25
		0,178	1,25	48,75
6	1	0,305	2,14	47,86
		3,18	22,26	27,74

La tabla II, indica las concentraciones finales resultantes de las tablas I y de la III.

Las reacciones en las condiciones de la tabla I, las llevamos a cabo para cada uno de los dos fagos modificados unidos a las dos cajas, Av I y Consensus 2.

Las reacciones de la tabla III, las llevamos a cabo únicamente para el fago modificado que no lleva ninguna de las cajas unidas, y estas preparaciones nos servirán como controles de las medidas.

Una vez hechos los pules de reacción, se vortearon suavemente, y se les dio una pequeña centrifugación, para juntar los reactivos. Posteriormente, todas las reacciones, se incubaron de 30' a 60' a RT agitando suavemente, tras lo que se guardan en la nevera (4°C).

2.1.4- Funcionalización de microesferas con FurA

La proteína FurA oligomeriza y precipita a pH neutro, sobre todo cuando está a mayor concentración de 0,5 mg/ml, y solo podemos trabajar con ella a pH ácidos y a pH básicos. Además las reducciones se deben de realizar suavemente, por lo que hemos adaptado el protocolo para que la proteína no resultara dañada durante la bioconjugación.

Se utilizaron microesferas de poliestireno de 2 μ m de diámetro con una monocapa de grupos amino en su superficie al 0,5% (w/v) de la casa Kisker.

El lavado y la preparación de la solución de glutaraldehído, se deben realizar simultáneamente, para que las disoluciones que se obtienen estén recién preparadas en el momento de usarlas.

Preparación de las microesferas

Al igual que en el caso anterior, las microesferas vienen en una solución que se eliminó para adecuarlas a nuestras condiciones de trabajo.

Se parte de 100 μ l de microesferas aminadas 50% (w/w), que se centrifugaron a 1000 xg durante 3'. El sobrenadante fue decantado suavemente porque las microesferas en seguida se resuspenden. Las microesferas se resuspendieron en 200 μ l de PBS.

Este lavado se repite 3 veces y la en la última, se dejaron las microesferas precipitadas.

Preparación del glutaraldehído

Es el agente de entrecruzamiento que crea un enlace amida con las aminas de la superficie de la microesfera, y con aminas primarias de la proteína FurA.

El glutaraldehído es fotosensible, por lo que a partir de ahora, todas las disoluciones se ocultan completamente de la luz, hasta que se retire del medio. Como ya se ha dicho, éste, como la mayoría de los reactivos de entrecruzamiento, hay que prepararlos en el momento de usarlos.

Se tomaron 50 µl de glutaraldehído 50% (w/w) (Sigma-Aldrich) y se añadieron 450 µl de agua destilada filtrada, obteniendo 500 µl de solución de glutaraldehído al 10% (w/w), que se ha de mantener siempre oculto de la luz.

Unión del entrecruzador a microesferas

Se genera el enlace amida entre la microesfera aminada y el aldehído del cross-linker.

Se resuspendieron las microesferas precipitadas (que se obtienen en el lavado), con 500 µl de la solución al 10% (w/w) de glutaraldehído. Es necesaria una buena resuspensión, vortex y agitación fuerte, tras lo cual, se dejan 2 horas a RT en agitación, y oculto de la luz. Al terminar la reacción, se observa la aparición de un precipitado en el eppendorf, debido a la gran hidrofobicidad de estas microesferas aminadas, que agregan rápidamente.

Estabilización del enlace imida

Este reductor, tiene la función de estabilizar el enlace amida formado por la condensación entre aldehído del cross-linker y las aminas de las ME y la proteína. El reductor hace que se forme amina estable.

-32 mg de NaCNBH₃

-50 µl de solución 100mM de NaOH (0,1 g de NaOH en 25 ml)

-450 µl de agua.

Unión de la proteína

Unión de FurA mediante un enlace amida al extremo libre (el otro está unido ya a la microesfera) del glutaraldehído.

Se lavó 3 veces con PBS, y posteriormente 2 veces más con agua destilada y filtrada, con objeto de eliminar el glutaraldehído no reaccionado del medio. En el último lavado, el precipitado se resuspendió en 430 µl de agua destilada y filtrada. Después se añadió 20 µl 1M de NaCNBH₃, e inmediatamente 50 µl de la proteína FurA (10 mg/ml en NaAc, a pH 4,4). Se realizó una buena mezcla con la pipeta, y se comprobó el pH de la mezcla final con 5 µl en una tira de pH.

Como el pH no era básico (pH<8-9), se añadió más reductor, comprobando el pH constantemente para no basificar en exceso (Aproximadamente se añadió 50µl más de NaCNBH₃, para conseguir basificar el pH ácido en el que nos venia la proteína).

Se dejó 50' a RT en agitación y oculto de la luz.

Para detener la reacción se añadieron 50 µl de 1M TRIS pH 9.0 y se incubó 15' para inactivar los aldehídos no reaccionados.

Se realizó después una precipitación en la centrífuga, y se guardó el sobrenadante que se usó para comprobar la eficacia de la funcionalización (ver 3.1.1).

Se lavó 5 ó 6 veces en 10 mM TRIS pH 9, 0,4M en glicina, y se guardó en 500 µl de ese tampón a 4°C.

2.2- PREPARACIÓN DEL CALIBRADO DE LAS PINZAS ÓPTICAS

Se prepararon unos constructos para poder calibrar las interacciones de las fuerzas y posteriormente poder usar las pinzas ópticas en las medidas de la interacción entre la proteína FurA y sus cajas de DNA.

- Se funcionalizaron microesferas con proteína G en su superficie y con un anticuerpo antidigoxigenina, con un fragmento de DNA del fago λ el cual lleva por el extremo de unión a esta microesfera, la proteína digoxigenina unido, y por el otro unos oligos biotinilados.

- Se utilizan también microesferas funcionalizadas con estreptavidina.

-Se utilizó siempre tampón filtrado en todo el proceso.

Oligonucleótidos

Se diseñaron unos oligonucleótidos. Uno de ellos, va a ser complementario a un extremo del DNA del fago λ , y otro lleva en un extremo una secuencia complementaria para unirse al DNA cortado con la enzima de restricción *Xba* I, y paralelamente se diseñó el complementario de este excepto en las 4 bases de la zona de restricción de la enzima.

Los 3 oligos (Invitrogen) se prepararon a una concentración de 100 μ M

Preparación: centrifugar a 1000 rpm unos 5 minutos, y suspender en TE pH8:

Añadiendo 72,4 μ l a SOC-LE; 67,2 μ l a *Xba* I50 y 84,0 μ l a *Xba* I5D para:

-*Xba* I50 => 100 μ M (0,730 μ g/ μ l)

-*Xba* I5D => 100 μ M (0,617 μ g/ μ l)

-SOC-LE => 100 μ M (0,736 μ g/ μ l)

Digestión del fago λ

Se corta el DNA del fago λ con la enzima de restricción *Xba* I, para utilizarlo como soporte de DNA.

Mezcla => - DNA del fago λ => 2 μ l (1 μ g ó 31,2 fmol)

- NE buffer 10x => 5 μ l

- BSA 100x => 2 μ l

- *Xba* I => 1,5 μ l

- Agua => 41 μ l

(Volumen final => 50 μ l a 20 μ g/ μ l de DNA λ -*Xba* I)

Se incubó a 37°C toda la noche, y luego se inactivó la enzima a 70°C durante 20 minutos.

Se conservan a -20°C

Preparación de SOC-LE-DIG

Se añaden nucleótidos que tienen digoxigenina al extremo del oligo SOC-LE, mediante la terminal transferasa. Se sigue el protocolo "DIG Oligonucleotide Tailing Kit"

Mezcla de reacción:

- Oligo SOC-LE (100 μ M) => 1,25 μ l (124 pmol, 0,92 μ g)

- (1) Reaction buffer 5x => 4 μ l

-(2) Disolución de CoCl_2 => 4 μ l

- (3) dNTPs-DIG => 1 μ l

- (4) dATP (100 mM) => 1 μ l

- (5) Terminal Transferasa => 1 μ l

- Agua => 7,75 μ l

(Volumen total = 20 μ l)

La mezcla se incubó en un baño húmedo a 37 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo en hielo, añadiendo 2 μ l de EDTA (0,2 M) a pH 8.

Purificación de SOC-LE-DIG

Se purificó el oligo biotinilado, utilizando el protocolo del kit QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen), para su posterior unión al fragmento del fago λ .

A los 22 μl de disolución, se añadió 220 μl de tampón PN y se trasvasó a una columna del kit unida al tubo colector. Se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm y se descartó el sobrenadante (que se quedó en el tubo colector)

Se añadió 750 μl del buffer PE y se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm. El fluido se descartó y se volvió a centrifugar 1 minuto a 1000 rpm. Se colocó la columna en un eppendorf nuevo, y se añadieron 50 μl de buffer EB y tras esperar 1 minuto, se centrifugó otro minuto a 13000 rpm para desechar después la columna.

Aquí se obtuvieron aproximadamente unos μl 0,92 μg si recuperáramos el 100% (asumir el 15 % de pérdida).

El buffer EB es como Tris 10mM pH8,5

Fosforilación de SOC-LE-DIG

Se coloca un grupo fosfato en el extremo 5' del oligo purificado, para poder generar un enlace fosfodiéster con el extremo del fago λ

Aquí se tiene 50 μl del paso anterior.

Mezcla =>	- SOC-LE-Biotina purificado =>	50 μl
	- T4 PNK =>	8 μl
	- T4 ligase buffer 10x =>	10 μl
	- dATP (100 mM) =>	1 μl
	- Agua =>	31 μl

(Volumen final => 100 μl)

La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 1 hora y posteriormente para inactivar la enzima a 70 °C durante 20 minutos.

Asumimos la pérdida del 50 % del oligo => 620 fmol/ μl (0,62 pmol/ μl) de P-SOC-LE-DIG

Preparación de Xba I50-Biotina

Se añaden nucleótidos que tienen biotina al extremo del oligo Xba I50, mediante la terminal transferasa. Se sigue el protocolo "DIG Oligonucleotide Tailing Kit"

Mezcla de reacción:

- Oligo SOC-LE (100 μM) =>	1,11 μl (111 pmol, 0,81 μg)
- (1) Reaction buffer 5x =>	4 μl
-(2) Disolución de CoCl_2 =>	4 μl
- (3) dNTPs-Biotina =>	1 μl
- (4) dATP (100 mM) =>	1 μl
- (5) Terminal Transferasa =>	1 μl
- Agua =>	7,89 μl

(Volumen total = 20 μl)

La mezcla se incubó en un baño húmedo a 37 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo en hielo, añadiendo 2 μl de EDTA (0,2 M) a pH 8.

Purificación de SOC-LE-Biotina

Se purificó el oligo biotinilado, utilizando el protocolo del kit QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen), para su posterior unión al fragmento del fago λ .

A los 22 μl de disolución, se añadió 220 μl de tampón PN y se trasvasó a una columna del kit unida al tubo colector. Se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm y se descartó el sobrenadante (que se quedó en el tubo colector)

Se añadió 750 µl del buffer PE y se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm. El fluido se descartó y se volvió a centrifugar 1 minuto a 1000 rpm. Se colocó la columna en un eppendorf nuevo, y se añadieron 50 µl de buffer EB y tras esperar 1 minuto, se centrifugó otro minuto a 13000 rpm para desechar después la columna.

Aquí se obtuvieron aproximadamente unos 0,92 µg en 50 µl, si recuperáramos el 100%. Asumiendo el 15 % de pérdida, tenemos 0,0156 µg/ µl.

El buffer EB es como Tris 10mM pH8,5

Fosforilación y apareamiento de los oligos Xba I50-Biotina y Xba I5D

Se coloca un grupo fosfato en el extremo 5' del oligo purificado Xba-I50, para poder generar un enlace fosfodiéster con el extremo del fago λ.

Se introduce también el oligo complementario Xba-I5D, para realizar tras la fosforilación, la hibridación entre los oligos.

Mezcla de fosforilación:

-Xba I50-Biotina puro =>	50 µl
-Xba I5D =>	1,13 µl
-T4 PNK =>	8 µl
-Buffer ligasa =>	10 µl
- dATP 100mM =>	1 µl
- Agua =>	29,9 µl

(Volumen final => 100 µl)

La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 1 hora y posteriormente para inactivar la enzima a 70 °C durante 20 minutos

(Las mezclas de oligos, de los controles, no hace falta fosforilarlas, porque no las uniremos al fago λ)

El Annealing se realizó en un gradiente de temperaturas de 95°C a 4°C en 2 horas, tanto de las mezclas de fosforilación como de la mezcla control, para hibridar las cajas.

-Se pusieron a 95°C durante 1 minuto, y luego se colocaron en dos litros de agua, que había alcanzado previamente el punto de ebullición. Fue introducido en la cámara fría (a 4°C) donde se fue enfriando lentamente.

Se asume de nuevo la pérdida del 50% de los oligos en este paso => 0,55 pmol/µl

Ligación de p-soc-le-dig al fago λ-Xba I

Creación del enlace fosfodiéster entre el oligo con digoxigenina, y el extremo no cortado por la enzima Xba I del fago λ.

Hacer Annealing buffer 5x => -50 µl de Tris-Cl 1 M pH 7

-50 µl de Tris-Cl 1 M pH 8

-10 µl de Solución de MgCl₂

-890 µl de Agua

(Volumen final => 1000 µl a 100 mM en Tris-Cl y 10 mM en MgCl₂)

Mezcla de reacción:

-Fago λ-Xba I => 50 µl (1 µg)

-P-SOC-LE-DIG=> 6 µl (3,72 pmol)

-Annealing buffer 5x => 14 µl

(Volumen final => 70 µl)

La mezcla se incubó durante 10 minutos a 68°C y luego durante 1 hora a 42 °C.

Fago λ-SOC-DIG esperada es 0,45 fmol/μl ó 7 ng/μl

Ligación de Fago λ-SOC-DIG y Xba I5-Biotina

Creación del enlace fosfodiéster entre el extremo no cortado por la enzima Xba I del fago λ con la digoxigenina y los oligos hibridados Xba I5 biotinilados.

Se realiza primero una dilución a aproximadamente a 20 fmol/μl:

5 μl de Xba I5-Biotina + 132,5 μl de Agua => 20 fmol/μl

Mezcla =>	-XbaI5-biotina	20 fmol/μl =>	1 μl
	-λ-SOC-LE-DIG =>		10 μl
	-Ligase buffer =>		2 μl
	-T4 DNA ligasa =>		2 μl
	-dATP (100 mM) =>		0,1 μl
	-Agua =>		4,9μl

(Volumen final => 20 μl)

La mezcla se incubó toda la noche a temperatura ambiente y la enzima se inactivó a 70°C durante 10 minutos.

La concentración final es de 0,225 fmol/ μl

Preparación de las microesferas con estreptavidina

Se tomaron 200 μl de esferas recubiertas con estreptavidina, de 0.5% (w/v) de Kisker.

Se centrifugó a 10000g durante 3 minutos y después se eliminó el sobrenadante.

Se resuspendió en 200 μl de PBS - 0,1 mg/ml BSA (los pasos 2-3-4 se repiten varias veces)

Unión del anticuerpo Anti-Dig a las microesferas con proteína G

Se Reconstruyó el anticuerpo Anti-Dig (Roche 1333089) disolviendo los 200 μg que vienen en 1 ml de PBS. Se fragmentó en 10 alícuotas de 100 μl cada una con una concentración de 200 μg/μl.

La alícuota en uso se guarda a 4°C y el resto se conserva congeladas.

Se tomaron 200 μl de la dilución de esferas con proteína G de 0.5% (w/v) (PGP-20-5 Kisker) y se lavaron 3 veces quitando el sobrenadante y resuspendiéndolas en 200 μl de PBS, salvo en la última resuspensión, que se diluyeron finalmente en 20 μl de PBS.

Se añadieron 5 μl del anticuerpo Anti-Dig ya reconstruido.

Se incubaron en una Rotisserie a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Después se lavaron 3 veces en 200 μl de PBS y se volvieron a resuspender en 20 μl de PBS.

Union de Biotin-24kDNA-Dig a microesferas con ANTI-Dig

-Se realizó la unión de las microesferas con anti-dig y el DNA con biotina y digoxigenina. (Mezcla de unión) (El volumen se completó hasta 25 μl con PBS).

-Después se realizó una dilución de todas las alícuotas de 5 μl de la mezcla de unión anterior en 100 μl de PBS-0,05 mg/ml en BSA.

(Las diluciones pertinentes (1/10 y 1/20), se prepararon en eppendorfs distintos, para poder añadir 5 μl y obtener un volumen final de 25 μl sin tener que completar con PBS)

MEZCLA DE UNIÓN				
Disoluciones de partida	Biotin-DNA-dig (0,225 fmol/ µl)	Microesferas-Antidig	Volumen final	Etiqueta
Volumenes añadidos	5 µl	20 µl	25 µl	1
	10 µl	20 µl	30 µl	2
	2,5 µl	20 µl	25 µl	3
	1 µl	20 µl	25 µl	4
	5 µl de dilución 1/10	20 µl	25 µl	5
	5 µl de dilución 1/20	20 µl	25 µl	6

Se guardarán a 4 °C

2.3- PREPARACIÓN DEL SISTEMA PARA AFM

2.3.1- Clonaje de cajas Fur en p-GEMT

Se amplificó por PCR una parte del promotor del gen *furA* conteniendo las secuencias de reconocimiento del regulador y se ligó al plásmido p-GEMT.

El inserto, que incluye todo el promotor, desde el inicio de la transcripción (negrita y subrayado), las cajas TATA, y dos cajas represoras (iron boxes) a las que FurA se une para inhibir la transcripción (en sombreado y cursiva):

5'-AGCAATTTAACAACACTACTGTTACTTATAGGAACTTTTGCATTTAATTA
AAATGTATTTTTGCAAAGCATTGCTTGAAACATAAAAATAGCAACCATTGATATTACATAAAGTCAATAACTAAGATGCCTGTGTAGCTT
GAGATTCACGATTAATAATTTTATATTATTGAACCTGTAATTTTCGATTTTAAATTGTTAATAATAAGCATTGTTACTAGGTTTTTGTAGGT
GATTTTCACTAATCTTGATTAATAAGTTAATAAATATTCTCAATAAGCAATGTTTGTGCAAATCACTCCAAATATTTGTTATATTCTCAAT
TACAAGCTTTGTTGAGAAAAATTAGTATGA-3'

-Para amplificar la secuencia promotora, se partió de DNA cromosómico de *Anabaena* y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos en la reacción de PCR:

Primer directo => **ProN** 5'-CTCGCCTAGCAATTTAACAAC-3'

Primer inverso => **ProC** 5'-GCCTTGAGCGAAGTATTTGTG-3'

Los oligonucleótidos se adquirieron a Sigma, con grado de purificación HPLC y desalados y la mezcla de dNTPs fue adquirida a Invitrogen.

Como DNA-polimerasas, se recurrió a la enzima Taq DNApolimerasa recombinante (Invitrogen, Gibco BRL), que se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante.

El termociclador empleado fue el modelo PTC-100 de MJ Research Inc.

El programa aplicado fue:

- Desnaturalización inicial 3 min a 95°C

-30 ciclos de: desnaturalización 1 min a 95°C, hibridación 1 min a 58°C, extensión 1 min a 72°C.

-Finalización con una incubación 10 min a 72°C

- A 4°C hasta que se retiren las muestras.

El producto de amplificación se purificó con el kit GFX de *GE Biosciences* y se ligó al plásmido pGEMT de Promega, aprovechando que tiene T protuberantes y que la Taq polimerasa deja A en 3' de cada una de las hebras del producto de amplificación.

El producto de amplificación se ligó a pGEM-T y esta mezcla se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α

2.3.2- Aislamiento del plásmido con las cajas de unión a Fur

Se tomó una colonia de *E. coli* sembrada en LB con ampicilina y se inoculó en un tubo falcon con 10 ml de LB (medio de cultivo), tal y como se indica a continuación:

Se añadieron 25 μ l de solución de ampicilina 20 mg/ml (concentración final \Rightarrow 50 μ g/ml), junto con 300 μ l de *E. coli* con el plásmido p-furA-PGEMT en glicerol y se dejaron O/N a 37 $^{\circ}$ C

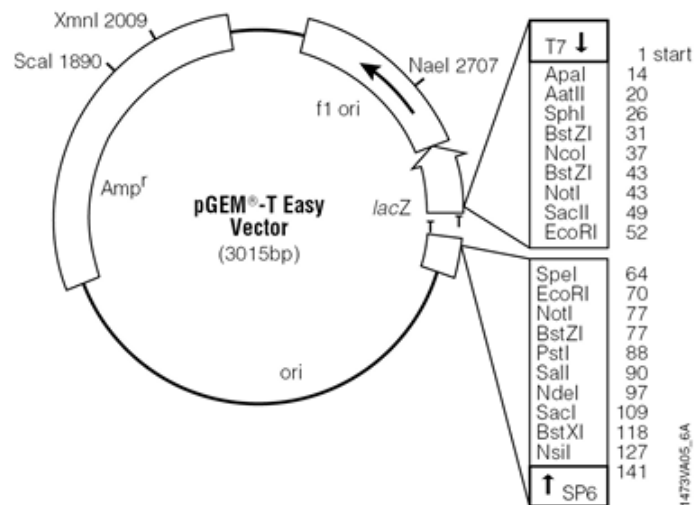


Fig. 5 – Mapa de pGEMT

El plásmido se purificó de acuerdo con el protocolo indicado en el kit “GenElute plasmid mini-prep kit”.

Se repartieron los 10 ml de LB en 3 falcons \Rightarrow 3ml, 3ml y 4ml (Este último para guardar para hacer gliceroles).

Se centrifugaron un minuto a 12000 xg, y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 200 μ l de solución de resuspensión, y se vortearon para homogeneizarla mezcla.

Después se añadió 200 μ l de solución de lisis \Rightarrow invertir el tubo cuidadosamente para mezclar bien y se dejó clarificar durante 2 minutos, tras los cuales se añadieron 350 μ l de solución de neutralización, que se mezcló bien, pero con cuidado, y se centrifugó 10 minutos a 12000 xg.

Para activar la columna, fue introducida en un tubo colector y se le añadió 500 μ l de solución de preparación, tras lo que se centrifugó 0,5-1 min. a 12000 xg y se desechó el eluido.

Después se cargó el lisado clarificado en la columna de afinidad, se centrifugó 0,5-1 min. a 12000 g y se desechó el eluido. Se añadieron 500 μ l de solución de lavado a la columna, se centrifugó 0,5-1 min. a 12000 xg, y se descartó el fluido.

Se añadieron 750 μ l de solución de lavado, se centrifugó 0,5-1 min, a 12000 xg y se descartó el fluido. Seguido se centrifugó 1 min. a 12000 xg para secar la columna, que fue introducida en un eppendorf etiquetado y limpio. Por último se añadió 70 μ l de agua mili-Q estéril y se centrifugó 1 minuto, disolviendo el precipitado de la columna.

2.4- Medidas de AFM

Se han llevado a cabo medidas preliminares –no mostradas- de la unión de FurA al plásmido con las iron boxes mediante AFM en unas condiciones similares a las empleadas en los ensayos de retardo en gel (EMSA) realizados habitualmente para analizar esta interacción (Hernández et al. 2005).

Se utilizó un tampón 10 mM bis-Tris, pH7,5 / 40 mM KCl / 0,1 mM MnCl₂ / 1mM MgCl₂ /1-2 mM DTT.

La mezcla de proteína y DNA para este ensayo se realiza en las proporciones siguientes:500 nM FurA/ 850 ng plásmido con caja.

La punta usada es de 20 pN/nm de Veeco.

El DTT ha de ser recién preparado puesto que es oxidado rápidamente por el medio.

2.5- Medidas de pinzas ópticas

En el momento de la presentación de esta memoria no hemos tenido la oportunidad de ensayar los constructos preparados para este proyecto con el sistema de pinzas ópticas. En los próximos meses, se prevé realizar una estancia en el laboratorio dirigido por el Dr. Baró, donde se encuentran las pinzas y verificar la adecuabilidad de dichos constructos.

Inicialmente, las medidas de unión en el sistema de pinzas ópticas se realizarán en las siguientes condiciones:

-Tampón: 10 mM bis-Tris, pH7,5 / 40 mM KCl / 0,1 mM MnCl₂ / 1mM MgCl₂ /1-5 mM DTT / 0,4M Glicina (opcional)

El DTT se preparará en el momento de llevar a cabo las medidas

3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1- PREPARATORIO DEL SISTEMA ESTUDIADO

3.1.1-Verificación de la funcionalización con proteína de las microesferas aminadas

Para las microesferas funcionalizadas con proteína, al contrario que las microesferas sin funcionalizar que presentaban esa gran tendencia a agregarse y a precipitar, hizo falta aumentar considerablemente las revoluciones a 12000 xg, para conseguir un pellet lo suficientemente compacto para que permita decantar, pues se disgregan muy fácilmente.

No obstante, hay que procurar resuspender rápidamente, para evitar posibles agregaciones. Añadimos glicina para prevenir la posible agregación de las microesferas funcionalizadas.

De la última precipitación de la unión de la proteína a las microesferas aminadas que ya tenían unido el entrecruzador (ver 2.1.4, Unión de la proteína), se midió la absorbancia del sobrenadante guardado a 276 nm y se calculó la absorbancia diferencial para ese volumen respecto a la cantidad de proteína de partida. Se realizó una dilución ½, para tener el volumen necesario para medir en la cubeta ($\epsilon = 13760 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

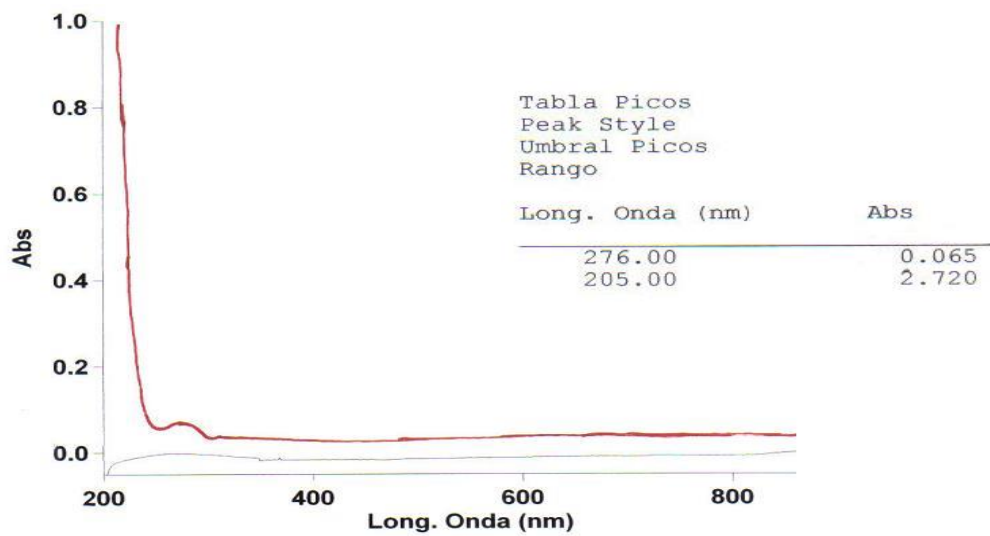


Fig.6 - Espectro de absorción del sobrenadante del último paso de la funcionalización de las microesferas aminadas con FurA y su tabla de los datos. La dilución era 1/2.

Abs = 0,065; $[FurA]_0 = 57,14 \mu M$; $[FurA]_{tras\ unión} = 9,45 \mu M$

Tras la unión, la absorbancia del sobrenadante correspondiente a la proteína libre fue un orden de magnitud menor, lo que indicó que se produjo unión de la proteína a la microesfera en una magnitud apreciable.

3.1.2- Comprobación de la pureza y concentración del aislamiento del pGEMT mediante electroforesis

Se preparó un gel al 0,7 % de agarosa (0,28 g) en 40 ml de TBE 0,5x, y con 40 μl de bromuro de etidio (1000x), donde se cargó 5 μl de cada una de las alícuotas que obtuvimos de plásmido (+ 5 μl de TBE + 3 μl de buffer de carga)

Se cargó además 3 μl de fago λ en un pocillo de concentración 1 $\mu g/3 \mu l$, para cuantificar aproximadamente la cantidad de plásmido (+7 μl TBE + 3 μl de buffer de carga).

Dejamos correr el gel, a 90 voltios durante 40'

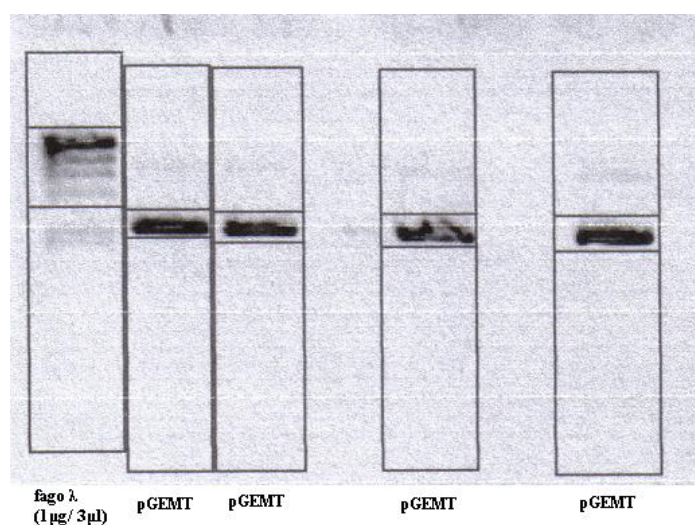


Fig.7 - Gel de electroforesis de las 4 alícuotas de plásmido y del fago λ .

3.1.3- Cuantificación del plásmido con Analyst-DOC 2000

Se utiliza un programa (Analyst) que asocia un valor numérico, que se relaciona con otro asociado a un DNA de concentración conocida que se coloca en el mismo gel de la electroforesis. En este caso un fago λ.

	Name	Mobility cm	Height Count	MW (kb)	Area cm*Count	% of Bands	Mass (ug)
Lane1 1	Band 1	1.55	213.86	N/A	50.41	100.00	31.85
Sum							31.85
In Lane							100.00
Lane2 1	Band 1	1.98	237.91	N/A	26.01	100.00	16.94
Sum							16.94
In Lane							100.00
Lane3 1	Band 1	1.99	223.97	N/A	24.21	100.00	15.75
Sum							15.75
In Lane							100.00
Lane4 1	Band 1	2.03	212.27	N/A	26.73	100.00	16.76
Sum							16.76
In Lane							100.00
Lane5 1	Band 1	2.04	208.61	N/A	27.51	100.00	17.05
Sum							17.05
In Lane							100.00

Fig. 8 - Tabla de datos que ofrece el programa Analyst al cuantificar el gel de electroforesis.

Haciendo las medias de las 4 alícuotas del plásmido y calculando en relación al valor de 1µg de plásmido, se obtiene una concentración de **0,103 µg/µl** de pGEMT con el inserto.

4- PROYECCIÓN

Los métodos de molécula única, permiten trabajar con técnicas mucho más sensibles que las que se usan convencionalmente para trabajar con interacción DNA-proteína como el EMSA (que se fundamenta en la incubación de un fragmento de DNA marcado radiactivamente con extractos proteicos, en unas condiciones que permitan la unión entre DNA y proteína, seguida de una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturante. Los complejos DNA-proteína tendrán una movilidad electroforética inferior al DNA libre, retardándose y se muestran como bandas discretas en una autorradiografía).

Las pinzas ópticas permitirán discriminar diferencias de afinidad entre cajas de un regulador global (como es FurA), que esta implicado en diversos microorganismos (por ejemplo en *Mycobacterium*), en procesos de patogenicidad. Este proceso, aplicado a esta o a proteínas similares de organismos patógenos, no solo puede contribuir a ampliar y complementar la información que ya se tiene sobre su metabolismo, sino que puede ser una puerta a la investigación de nuevos procesos y formas de interacción, que desde un punto de vista farmacológico pueden ser interesantes.

El AFM permitirá establecer el modelo de unión que presenta esta proteína con el DNA. La extrapolación de este modelo a otros tipos de proteínas de unión a DNA es interesante debido a la dificultad que conlleva el trabajo con dichas proteínas, por su baja estabilidad y su tendencia a la agregación.

Los constructos en si mismos, puede ofrecer una nueva forma de trabajar con este tipo de proteínas, que como se ha dicho presentan una alta tendencia a la agregación, porque al unir las individualmente, se imposibilita esta agregación y se les da una mayor estabilidad, que permitirá trabajar con ellas en diversos tipos de experimentos hasta ahora vedados por las propiedades de las proteínas de unión al DNA.

Bibliografía

- **Derek N. Fuller, Gregory J. Gemmen, John Peter Rickgauer, Aurelie Dupont, Rachel Millin, Pierre Recouvreux and Douglas E. Smith**
Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 2: "A general method for manipulating DNA sequences from any organism with optical tweezers"
- **José A. Hernandez, M. Teresa Bes, María F. Fillat, José L. Neira and M. Luisa Peleato.**
Biochem. J. (2002) 366, 315-322: "Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state"
- **F Ritort**
J. Phys.: Condens. Matter 18 (2006) R531–R583: "Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications"
- **Silvia Hormeño and J. Ricardo Arias-González**
Biol. Cell (2006) 98, 679–695: "Exploring mechanochemical processes in the cell with optical tweezers"
- **J.A. Hernandez, M.T. Bes, M.L. Peleato and M.F. Fillat**
Recent Res. Devel. Proteins, 1(2002):123-140: "Biological control by the Fur (ferric uptake regulator) family in prokaryotes: Its role as sensor of cellular stress"
- **J. A. Hernandez, S. Lopez-Gomollon, A. Muro-Pastor, A. Valladares, M. T. Bes, M. L. Peleato1 & M. F. Fillat.**
BioMetals (2005) 00:1–10: "Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: A reducing environment and the presence of Mn²⁺ are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters"
- **Hernández, J.A., López-Gomollón, S. Bes, M.T., Fillat, M.F. Peleato, M.L.**
FEMS Letters CLAVE: A. Volumen: 236, 275-282.(2004): "Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition"
- **Ehmke Pohl, Jon C. Haller, Ana Mijovilovich, Wolfram Meyer-Klaucke, Elspeth Garman and Michael L. Vasil.**
Molecular Microbiology (2003) 47 (4), 903–915: "Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator"