

# Estudio de la unión de la proteína pV<sup>vgjΦ</sup> del bacteriófago VGJΦ de *V. Cholerae* a ADN de cadena simple en ambiente salino

Alina Falero-Morejón, Sonia Trigueros-Soler\* y Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Bioquímica, Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Playa, La Habana, Cuba, alina.falero@cnic.edu.cu \*Oxford Martin Institute of Nanoscience for Medicine Department of Physics, University of Oxford, Parks road, Oxford OX1 3PU, United Kingdom.

Recibido: 20 de julio de 2011

Aceptado: 21 de octubre de 2011

Palabras clave: ADN de cadena simple, proteínas de unión a DNA, sales, *Vibrio cholerae*.

Key words: single stranded DNA, single stranded DNA binding proteins, salts, *Vibrio cholerae*.

**RESUMEN.** PV<sup>vgjΦ</sup> es la proteína de unión a ADN de cadena simple del fago filamentoso VGJΦ, expresada en *V. cholerae* infectado con VGJΦ. Esta proteína fue caracterizada previamente como una proteína homodimérica que tiene un dominio C-terminal (CTD) desordenado y flexible. Este CTD pudiera estar involucrado en la actividad biológica de esta proteína, lo cual coincide con la función descrita para el dominio C-terminal ácido, característico de las PUACs, esencial para el crecimiento del fago y la replicación del ADN. En este trabajo se investigó el efecto de diferentes sales sobre la interacción de la proteína pV<sup>vgjΦ</sup> con ADNcs en la formación del complejo proteína-ADNcs. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que la unión de la proteína al ADNcs fue favorecida en presencia de las sales más cosmotrópicas para todas las concentraciones de sales estudiadas. Para las menos cosmotrópicas, se observó que la unión fue afectada a partir de una concentración de sal en la que se obtuvo un máximo de actividad biológica, siendo esta concentración diferente para cada sal estudiada. Estos resultados indican la presencia de cationes marcadamente cosmotrópicos en el sitio de unión de la proteína al ADNcs y que la formación del complejo proteína-ADN bajo condiciones de elevada concentración salina involucra interacciones iónicas.

**ABSTRACT.** PV<sup>vgjΦ</sup> is the single stranded DNA binding protein (SSB) from filamentous phage VGJΦ, it is expressed in *V. cholerae*, infected with VGJΦ. This protein was previously characterized as a homodimeric protein that has a disordered and flexible C-terminal domain (CTD). This CTD could be involved in the biological activity of this protein, which agree with the described function for the acidic C-terminal domain characteristic for the SSB proteins, which is essential for phage growing and the DNA replication. This paper studied the effect of different salts on the pV<sup>vgjΦ</sup> protein interaction with ssDNA in the protein-ssDNA complex formation. According to the obtained results it was concluded that the protein binding to ssDNA was favored in the presence of salts more kosmotropics for all salt concentrations studied. For the less kosmotropics salts it was observed that the binding was affected from a salt concentration which yielded a maximum of biological activity, which was different for each salt concentration studied. These results indicate that the presence of cations highly kosmotropics in the protein-ssDNA binding site and that the protein-DNA complex formation under environment of high saline concentration involves ionic interactions.

## INTRODUCCIÓN

Las proteínas de unión a ADN de cadena simple (PUACs), están presentes en todas las formas de vida celular y la mayoría de los virus. Están involucradas en los procesos biológicos esenciales, tales como la replicación, recombinación y reparación.<sup>1</sup> Estas proteínas interactúan con el ADN de cadena simple (ADNcs) de una manera independiente de secuencia, con lo que impiden que el ADNcs se renaturalice o forme de nuevo la doble hélice y a su vez lo protegen de la degradación de las nucleasas.<sup>2</sup> La mayoría de las PUACs se unen al ADNcs no específicamente, de acuerdo con diferentes modos de unión en dependencia de su estructura, su grado de cooperatividad, nivel de oligomerización y las condiciones ambientales: fuerza iónica, composición de la disolución

reguladora, etc.<sup>3</sup> El tipo de complejo formado entre las proteínas y el ADN depende de la concentración de sales monovalentes (cationes y aniones) y cationes bivalentes, pH, temperatura y concentración de las PUACs.<sup>4</sup>

Las PUACs de células procariotas comparten una estructura de dominio común que ha sido conservado, aún en los casos que carecen de homología en su secuencia aminoacídica. Estos dominios de unión oligosacárido-oligonucleótido (OB), están compuestos por residuos aromáticos rodeados por aminoácidos cargados positivamente.<sup>5</sup> La unión se realiza mediante interacciones electrostáticas entre los residuos cargados con el esqueleto fosfato del ADN, por una parte y por otra, entre los aminoácidos aromáticos por interacciones hidrofóbicas con las bases del ADN.<sup>6</sup>

Diferentes organismos de todas las formas de vida y muchos virus procariotas y eucariotas codifican estas proteínas de unión a ADN como parte de la maquinaria molecular que mantiene la integridad del genoma y asegura su replicación.<sup>7</sup> En el ciclo de vida de los fagos filamentosos, la proteína encargada de esta función es la del gen 5 (pV). Su síntesis comienza inmediatamente después de la conversión de la cadena viral parental a la forma duplex circular y después de la infección, cuando alcanza un nivel considerable comienza a enlazar estrecha y cooperativamente con la cola de simple cadena del intermediario del círculo rodante. De esta forma, promueve el cambio de la síntesis de la forma replicativa a la síntesis del ADN viral de cadena simple. Después de formado, el complejo ADNcs-pV es transportado a la membrana celular de la célula hospedera donde tiene lugar simultáneamente el ensamblamiento y la extrusión del fago.<sup>8</sup>

Recientemente, fue descubierto que el fago filamentosos VGJΦ es capaz de transmitir la capacidad de producir la toxina del cólera a cepas no patogénicas de *Vibrio cholerae*, mediante la trasmisión horizontal de genes.<sup>9</sup> Partiendo de este conocimiento, se hace necesario estudiar todos los mecanismos involucrados en el ciclo de vida de este fago para poder incidir en el control de la rápida y continua evolución de las cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*.

La proteína de unión a ADN del fago filamentosos VGJΦ, definida como pV<sup>VGJΦ</sup>, es expresada en *V. cholerae* infectado con VGJΦ<sup>10</sup> y fue caracterizada previamente<sup>11</sup> como una proteína con una arquitectura homodimérica, similar a la encontrada en las PUACs de los fagos filamentosos. Es de resaltar que tiene un dominio C-terminal desordenado y flexible, que puede estar involucrado en su actividad biológica, lo cual coincide con la función descrita para el dominio C-terminal ácido, característico de las PUACs, esencial para el crecimiento del fago y la replicación del ADN.<sup>6</sup>

Este trabajo se propuso investigar el papel que desempeñan distintos iones en la interacción de la proteína pV<sup>VGJΦ</sup>-ADNcs durante la formación del complejo, para lo cual se adicionaron a la reacción de formación del complejo diferentes sales en un amplio intervalo de concentraciones. La reacción se siguió usando un método descrito anteriormente que nos permitió evaluar su actividad biológica, en condiciones salinas diversas.<sup>10</sup>

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento y purificación de la proteína pV<sup>VGJΦ</sup>

La proteína pV<sup>VGJΦ</sup> fue obtenida de *Vibrio cholerae* y purificada bajo condiciones desnaturalizantes, mediante SDS-PAGE preparativo, según el protocolo descrito anteriormente.<sup>10</sup> Para la cuantificación de la proteína se usó el método de Lowry,<sup>12</sup> en el que se emplea como patrón albúmina de suero bovino. El análisis de la proteína se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, en condiciones desnaturalizantes. Los geles fueron analizados mediante el sistema de documentación de geles GENE GENIUS (Syngene Synoptics Ltd, Cambridge, UK).

### Ensayo de variación de la movilidad electroforética

La actividad biológica fue determinada por el retardo del ADNcs genómico del fago VGJΦ en electroforesis de geles de agarosa al 0,5 %, en disolución estabilizadora Tris-acetato 40 mmol/L, con EDTA 20 mmol/L, de acuerdo con el método reportado anteriormente.<sup>10</sup> Brevemente,

diferentes cantidades de cada proteína y 500 µg de ADNcs del fago VGJΦ fueron mezclados con glicerol 20 %, EDTA 0,25 mmol/L, albúmina de suero bovino 0,3 µmol/L y Tris-HCl 20 mmol/L hasta un volumen total de 40 µL. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se aplicó al gel de agarosa para evaluar la movilidad electroforética del complejo proteína-ADN. La electroforesis fue corrida hasta la salida del colorante, a 100 V y 4 °C. Para teñir las bandas de ADNcs se usó bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL, durante 30 min. Los geles fueron documentados mediante el sistema GENE GENIUS, mencionado anteriormente.

El efecto de la concentración salina sobre la formación del complejo proteína-ADN fue evaluado a través de la reacción de unión en presencia de las sales siguientes: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0 a 0,6 mol/L), NaCl (0 a 1 mol/L), KI (0 a 1 mol/L) y KCl (0 a 0,3 mol/L). Se empleó el sistema documentador de geles referido para analizar los geles, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio.

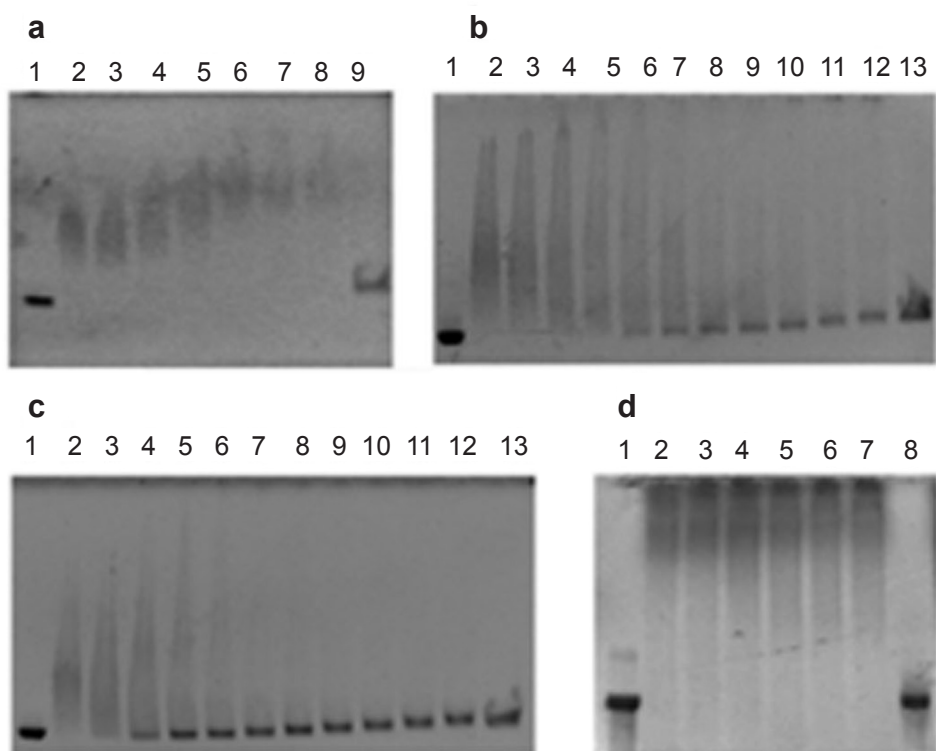
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tomando en consideración que *Vibrio cholerae* es una bacteria halotolerante, que puede ser encontrada naturalmente en ambientes acuáticos con un amplio intervalo de salinidad y conociendo el papel importante que desempeñan los iones durante el proceso de unión de las proteínas al ADN, se investigó el efecto de diferentes sales sobre la interacción de la proteína pV<sup>VGJΦ</sup> con el ADNcs del fago VGJΦ. El conocimiento básico de los factores que influyen en la replicación de este fago es de gran importancia, teniendo en cuenta el papel que representa en la trasmisión horizontal de los genes de virulencia en esta bacteria para, en última instancia, influir en la diseminación de la enfermedad.

Particularmente, estos estudios se realizaron teniendo en cuenta la naturaleza cosmotrópica de las sales, según su ubicación en la serie de Hofmeister: Aniones: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Cl<sup>-</sup> > I<sup>-</sup>; Cationes: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos en la interacción proteína-ADN en presencia de las diferentes sales en el ensayo de variación de la movilidad electroforética, indicaron que el retardo mayor se obtiene con el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fig. 1a) y el KCl (Fig. 1d), las sales más cosmotrópicas de las comprendidas en el estudio. La menor movilidad electroforética correspondiente a los complejos proteína-ADN fue obtenida con estas sales para todas las concentraciones estudiadas, mostrando una mayor interacción pV<sup>VGJΦ</sup>-DNACs. Sin embargo, en presencia de las sales menos cosmotrópicas, se observó una disminución de la interacción pV<sup>VGJΦ</sup>-DNACs con el incremento de la concentración salina, dado por un aumento de la movilidad electroforética del complejo a partir de una concentración dada, la cual fue característica para cada sal: 0,4 mol/L para NaCl y 0,2 mol/L para KI.

Pudo apreciarse que el retardo del complejo proteína-ADN está relacionado con la posición de los iones en la serie de Hofmeister, siendo favorecida la unión en la medida que aumenta el carácter cosmotrópico de la sal. Pudo observarse que cuando el anión se mantiene constante (KCl y NaCl), el retardo está en función del carácter cosmotrópico del catión. Por otra parte, cuando se mantiene constante el catión (KCl y KI) el retardo está favorecido con el carácter cosmotrópico del anión, según su posición en la serie de Hofmeister.

Estos resultados pudieran explicarse por la presencia de cationes muy cosmotrópicos en el sitio de unión, los cuales contribuyen de forma importante a la termodinámica de formación del complejo proteína-ADN. Ha sido descrito anteriormente<sup>13</sup> que la presencia de cationes en



**Fig. 1.** Efecto de las sales sobre la reacción de unión a ADNcs de la proteína pVVGJ $\Phi$ . (a)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0 a 600 mmol/L). Líneas 1 y 9, control ADNcs de VGJ $\Phi$  (500 ng), sin y con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (600 mmol/L), respectivamente. Líneas 2 a 8: igual a la línea 1 + proteína pVVGJ $\Phi$  (5,0  $\mu\text{g}$ ) +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0 a 600 mmol/L,  $\Delta = 100$ ), respectivamente. (b) NaCl (0 a 1 mol/L). Líneas 1 y 13: control ADNcs de VGJ $\Phi$  (500 ng), sin y con NaCl (1 mol/L), respectivamente. Líneas 2 a 12: igual a la línea 1 + proteína pVVGJ $\Phi$  (5,0  $\mu\text{g}$ ) + NaCl (0 a 1,0 mol/L,  $\Delta = 0,1$ ), respectivamente. (c) KI (0 a 1 mol/L). Líneas 1 y 13, control ADNcs de VGJ $\Phi$  (500 ng), sin y con KI (1 mol/L), respectivamente. Líneas 2 a 12, igual a la línea 1 + proteína pVVGJ $\Phi$  (5,0  $\mu\text{g}$ ) + KI (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 mol/L), respectivamente. (d) KCl (0 a 300 mmol/L). Líneas 1 y 8 control, ADNcs de VGJ $\Phi$  (500 ng), sin y con KCl (300 mmol/L), respectivamente. Líneas 2 a 7: igual a la línea 1 + proteína pVVGJ $\Phi$  (23  $\mu\text{g}$ ) + KCl (0, 100, 150, 200, 250, 300 mmol/L), respectivamente.

la interfase entre las regiones de potencial electrostático negativo sobre la proteína y el ADN podría reducir la repulsión entre las macromoléculas interactuantes, favoreciendo por tanto su interacción y la formación del complejo proteína-ADN, cuando se incrementa la naturaleza cosmotrópica del disolvente.

Aunque estos resultados fueron obtenidos *in vitro*, deben servir como referencia para estudios posteriores *in vivo*, encaminados a controlar la propagación del fago e influir indirectamente en el control de la diseminación de la enfermedad.

La dependencia de la sal en la unión a ADN de la proteína T4 gen32 fue reportada anteriormente.<sup>14</sup> Se demostró que el mecanismo por el cual los ácidos nucleicos interactúan con gp32 involucra un cambio conformacional, dependiente de la concentración salina, en el cual participa el dominio ácido C-terminal de la proteína. Dicho mecanismo pudiera ser representado como un modelo “cerrado”  $\rightarrow$  “abierto”, asignándole la posición de “cerrado” a la unión intramolecular del C-terminal al sitio de unión del ADN y “abierto” cuando se libera el C-terminal por la unión de la proteína al sitio de unión del ADN, de manera que un número compensatorio de contra iones son liberados del ADN y enlazados al C-terminal nuevamente expuesto. Esta interacción es regulada por la apertura del C-terminal que es muy dependiente de la concentración salina.<sup>15</sup>

Previamente se había demostrado que el C-terminal de la proteína gen 2.5 funciona como un interruptor de

dos vías que coordina y modula las interacciones entre la proteína y el ADN, así como con otras proteínas y que actúa como un escudo electrostático protector del sitio de unión al ADN. Este mecanismo es usado por muchas proteínas celulares como una herramienta para la coordinación de las interacciones proteína-ADN y proteína-proteína dentro de la “maquinaria” macromolecular que asegura su replicación.<sup>7</sup>

Conociendo de antemano que la proteína pVVGJ $\Phi$  es una proteína de unión a ADN de simple cadena, que tiene un dominio C-terminal desordenado y flexible y que la movilidad de un residuo sobre la superficie de la proteína está muy vinculada a su función, se considera que el dominio C-terminal de esta proteína podría estar involucrado en el cambio conformacional que tiene lugar en estas proteínas durante el evento de unión. De esta manera, podría facilitar las interacciones proteína-ADN y proteína-proteína para contribuir favorablemente a la actividad funcional de la proteína pVVGJ $\Phi$ . Varios autores han reportado la importancia de la flexibilidad en los procesos biológicos, tales como reconocimiento molecular y actividad catalítica.<sup>13,16</sup> De hecho, la unión de la proteína pVVGJ $\Phi$  a ADNcs en ambiente salino en presencia de las sales más cosmotrópicas pudiera ser explicado asumiendo que el dominio C-terminal permanezca “abierto” bajo condiciones de elevada concentración salina en la disolución, lo que indica que la formación del complejo proteína-ADN en estas condiciones está dada por las interacciones iónicas.

## CONCLUSIONES

La unión de la proteína pV<sup>VGJΦ</sup> a ADNcs es favorecida con la presencia de las sales más cosmotrópicas para todas las concentraciones estudiadas, mientras que con las sales menos cosmotrópicas la unión es afectada a partir de una concentración determinada, la cual resulta diferente en ambas sales: 0,5 mol/L para NaCl y 0,2 mol/L para KI. Estos resultados indican la presencia de cationes marcadamente cosmotrópicos en el sitio de unión de la proteína al ADNcs y que la formación del complejo proteína-ADN bajo condiciones de elevada concentración salina involucra interacciones iónicas.

Los resultados de este trabajo pudieran aportar información útil para futuros estudios encaminados al control y propagación del cólera, a través de su agente causal: el fago VGJΦ.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chase JW and Williams KR. Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:103-136.
2. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:61-92.
3. Hamon L, Pastré D, Dupaigne P, LeBreton C, Le Cam E and Piétremen O. High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein-DNA complexes. *Nucleic acids Research.* 2007;35 e58,doi:10.1093/nar/gkm147.
4. Bujalowski W, Overman LB, Lohman TM. Binding mode transitions of *Escherichia coli* single stranded binding protein-single-stranded DNA complexes. Cation, anion, pH and binding density effects. *J Biol Chem.* 1988;163:4629-4640.
5. Shokri L, Rouzina I and Williams MC. Interaction of bacteriophage T4 and T7 single-stranded DNA binding proteins with DNA. *Phys Biol.* 2010;6:1478-3975.
6. Kowalczykowski SC, Lonberg N, Newport JW and Hippel PH. Interactions of Bacteriophage T4-coded Gene 32 Protein with Nucleic Acids I. Characterization of the Binding Interactions. *J Mol Biol.* 1981;145:75-104.
7. Marintcheva B, Marintchev A, Wagner G and Richardson CC. Acidic C-terminal tail of the ssDNA-binding protein of bacteriophage T7 and ssDNA compete for the same binding surface. *PNAS.* 2008;105:1855-1860.
8. Folmer RHA, Nilges M, Konings RNH and Hilbers CW. Solution structure of the single-stranded DNA binding protein of the filamentous *Pseudomonas* phage Pf3: ssimilarity to other proteins binding to single-stranded nucleic acids. *The EMBO Journal.* 1995;14:4132-4142.
9. Campos J, Martinez E, Marrero K, Silva Y, Rodriguez BL, Suzarte E, et al. Novel type of specialized transduction for CTX or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJΦ in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2003;185:7231-7240.
10. Falero A, Caballero A, Ferran B, Izquierdo Y, Fando R and Campos J. DNA binding proteins of the filamentous phages CTXΦ and VGJΦ of *Vibrio cholerae* *J Bacteriol.* 2009;191:5873-5876.
11. Falero A, Caballero A, Trigueros S, Pérez C, Campos J, Marrero K, et al. Characterization of the single-stranded DNA binding protein pV<sup>VGJΦ</sup> of VGJΦ phage from *Vibrio cholerae*. *Biochim et Biophys Acta.* 2011;1814(9):1107-1112.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
13. O'Brien R, DeDecker B, Fleming KG, Sigler PB and Ladbury JE. The effect of salt on the TATA binding protein-DNA interaction from a hyperthermophilic Archaeon. *J Mol Biol.* 1998;279:117-125.
14. Pant K, Karpel RL, Rouzina I and Williams MC. Salt dependent binding of T4 gene 32 protein to single and double-stranded DNA: single molecule force spectroscopy measurements. *J Mol Biol.* 2005;349:317-330.
15. Rouzina I, Pant K, Karpel RL and Williams MC. Theory of electrostatically regulated binding of T4 gene 32 protein to single and double-stranded DNA *Biophys J.* 2005;89(3):1941-1956.
16. Schlessinger A, Yachdav G and Rost B. PROFbval: predict flexible and rigid residues in proteins. *Bioinformatics.* 2006;22:891-893.