

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 156**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09785114 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **13.07.2011 EP 2342216**

54 Título: **Monitorización del difosfato de adenosina**

30 Prioridad:

19.09.2008 GB 0817166

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2013

73 Titular/es:

**MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
2nd Floor, David Phillips Building Polaris House,
North Star Avenue
Swindon, SN2 1FL , GB**

72 Inventor/es:

**WEBB, MARTIN, RONALD y
KUNZELMANN, SIMONE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 394 156 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Monitorización del difosfato de adenosina

Campo de la invención

5 La invención está en el campo de la monitorización del difosfato de adenosina (ADP). En particular, la invención se refiere a moléculas fijadoras de ADP que comprenden polipéptidos de la proteína bacteriana ParM y uno o más fluoróforos.

Antecedentes de la invención

10 La conversión del trifosfato de adenosina (ATP) en ADP es un proceso central en todos los organismos vivos y está catalizado por un gran número de enzimas diferentes. La energía generada por la hidrólisis del ATP puede impulsar procesos metabólicos, dirigir el transporte, generar fuerza y el movimiento, así como la transducción de señales y la regulación. Las cinasas transfieren el fosfato terminal del ATP, con la generación de ADP como producto, y fosforilan una amplia gama de sustratos, desde intermedios metabólicos a proteínas, con lo que controlan su actividad. Por consiguiente, los ensayos para monitorizar la concentración de ADP tienen aplicaciones amplias en la investigación bioquímica y biomédica, que oscila desde el conocimiento detallado del acoplamiento mecanoquímico en las proteínas motoras al escrutinio de inhibidores de ATPasas y de cinasas.

15 A pesar de la importancia de la detección del ADP en los sistemas biológicos, hasta la fecha se dispone sólo de unos pocos procedimientos para monitorizar la concentración de ADP. El que se aplica con más frecuencia es un ensayo enzimático acoplado que utiliza la piruvato cinasa y la lactato deshidrogenasa, que acopla la generación de ADP a la oxidación de NADH y una disminución concomitante de la fluorescencia o de la absorbancia. Aunque se utiliza con frecuencia para estudiar la cinética en equilibrio estacionario de las ATPasas y de las cinasas, esta estrategia generalmente no es la idónea para los estudios mecanísticos basados en cinéticas transitorias porque no proporciona una respuesta rápida ni es muy sensible, que son los inconvenientes de este sistema. También resulta problemático el hecho de que en el ensayo tengan que estar presentes varios componentes, pues le añade complejidad y lo encarece, en especial en las aplicaciones de alto rendimiento. Algunos compuestos pueden interferir con uno de los componentes del ensayo y/o con la detección UV. Al contar con un gran número de componentes, los riesgos de tales problemas de interferencia son, en consecuencia, grandes.

20 Recientemente se ha modificado el ensayo para generar fluorescencia al acoplar la reacción de la piruvato cinasa con la piruvato oxidasa y la peroxidasa de rábano picante (1). El rojo de Amplex[®] se convierte en resorrufina gracias a la peroxidasa, lo que hace incrementar la fluorescencia a 590 nm. La detección de la fluorescencia a una longitud de onda larga proporciona mejoras, tanto por realzar la sensibilidad como por distinguir entre la señal óptica y la absorbancia de muchos compuestos. Sin embargo, este ensayo no soslaya el problema de la interferencia con alguno de los muchos componentes del ensayo. Además, el ensayo es todavía un ensayo enzimático acoplado que impone requisitos al sistema para que puedan tener lugar las diferentes actividades enzimáticas requeridas, e implica la presencia numerosos compuestos interdependientes en el ensayo, que siguen siendo fuente de problemas incluso con esta versión mejorada.

25 Con el fin de desarrollar ensayos de alto rendimiento para cinasas, se han descrito dos detectores específicos de ADP, que se basan en el reconocimiento del ADP mediante moléculas de ARN (2). El primero se basa en un aptámero de ARN que se fija selectivamente al ADP y se puede utilizar para monitorizar la generación de ADP en un ensayo de proximidad de centelleo (radiométrico). Aunque este procedimiento puede utilizarse para mediciones en tiempo real, se trata de nuevo de un sistema con varios componentes y complejo, e implica el centelleo radiométrico, que es peligroso y caro. El segundo detector crea una lectura de fluorescencia basada en la autoescisión, dependiente de ADP, de una ribozima marcada con fluorescencia. Este procedimiento no puede utilizarse para mediciones en tiempo real, lo cual es un obstáculo.

30 Un procedimiento alternativo es aprovecharse de la interacción muy específica de una proteína fijadora con la molécula diana. Al conectar un fluoróforo a una posición adecuada en la proteína, el reconocimiento del ligando se puede acoplar a una señal óptica. Se ha descrito que una serie de biomoléculas, tales como azúcares, aminoácidos, iones metálicos y fosfato, pueden formar parte de tales biosensores fluorescentes proteicos (3-7). Una ventaja de este tipo de detector es que el cambio de señal puede ser muy rápido y verse sólo limitado por la velocidad de la fijación del ligando o del cambio conformacional asociado. Además, para la detección sólo se necesita un único componente, la proteína marcada, por lo que también se clasifican como biosensores sin reactivos. Tal biosensor para ADP ya había sido desarrollado con anterioridad, basándose en una nucleósido difosfato cinasa marcada con el colorante de cumarina IDCC (8). El biosensor responde a la proporción de concentración de ADP/ATP y, por lo tanto, puede detectar un intervalo amplio de concentraciones de ADP, desde submicromolares a milimolares. Sin embargo, la fluorescencia disminuye con el ADP y esto es desfavorable. Además, la disminución de la fluorescencia al fijarse el ADP hace que la sensibilidad sea baja, en particular cuando se miden velocidades iniciales, lo cual es un problema. Además, la intensidad de la fluorescencia no es linealmente dependiente de la concentración de ADP, lo cual es un inconveniente de este sistema.

La presente invención busca solventar el(los) problema(s) asociado(s) con la técnica anterior.

Compendio de la invención

En la técnica se conocen proteínas que detectan fosfatos. Típicamente, la técnica anterior se ha centrado en la fijación del fosfato inorgánico (Pi). Para este fin, las proteínas detectoras de la técnica anterior se han basado en

5

Los presentes inventores han tomado una estrategia muy diferente. Han tomado sorprendentemente una proteína del campo del reparto de plásmidos bacterianos y la han modificado genéticamente para utilizarla como detector de ADP. Esto ha requerido una gran dedicación técnica, ya que la proteína en la cual se basan las proteínas detectoras de ADP de la invención (ParM) tiene actividad ATPasa intrínseca, y se sabe que se le fijan nucleótidos de guanina así como ADP. A pesar de la aparente falta de idoneidad de esta proteína para el uso como una molécula detectora de ADP, los inventores han creado con éxito un detector robusto, sin reactivos, para el ADP.

10

La invención da a conocer numerosos beneficios técnicos. Estos incluyen evitar los detectores basados en ácidos nucleicos, tales como las ribozimas. Aún más, al centrarse en el ADP en vez de en el fosfato inorgánico (Pi), se ensaya una molécula de mayor relevancia biológica. Además, al monitorizar el ADP en vez de la Pi, las moléculas de la invención encuentran aplicación en un abanico de ensayos que de hecho no generan Pi. Un ejemplo importante es, por supuesto, la aplicación a la monitorización de ensayos de cinasas, en los que el fosfato se incorpora en el sustrato diana en vez de ser liberado como Pi. Éstas y otras ventajas de la invención se discuten con más detalle más adelante.

15

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP que comprende un polipéptido, y dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a al menos los aminoácidos 11 a 310 de la SEQ ID n.º 1, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución respecto a la SEQ ID n.º 1 en el aminoácido C287, y en donde dicho polipéptido comprende otro resto de cisteína para la conexión de al menos un resto indicador, y en donde dicho polipéptido tiene al menos una identidad de secuencia del 68% con la SEQ ID n.º 1 en los restos aminoácidos presentes en dicho polipéptido que corresponden a los mostrados en la columna III de la tabla A. Convenientemente, dicho polipéptido puede comprender una o más sustituciones respecto a la SEQ ID n.º 1 en uno o más restos de aminoácidos seleccionados entre D6, G8, S9, T10, K13, N69, T101, E148, D170, G172, G173, T174, T175, D177, D223, I227, E284 o Q308.

20

25

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP como la descrita más arriba, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones seleccionadas entre:

30

- (i) I27C; o
- (ii) D63C y K216C; o
- (iii) D63C y D224C.

En otro aspecto, la invención da a conocer una molécula fijadora de ADP que comprende un polipéptido, y dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a al menos los aminoácidos 11 a 310 de la SEQ ID n.º 1, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución respecto a la SEQ ID n.º 1 en el aminoácido C287, y en donde dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones más seleccionadas entre:

35

- (i) I27C; o
- (ii) D63C y K216C; o
- (iii) D63C y D224C.

40

Por lo tanto, la invención da a conocer una molécula detectora que tiene la ventaja de poseer sitios de conexión para uno o más fluoróforos en una posición que posibilita el incremento positivo de la fluorescencia tras la fijación del ADP. Esto contrasta con la conexión de los fluoróforos en el resto C287 de tipo silvestre, que da lugar a una disminución de la fluorescencia al fijarse el ADP.

45

Una ventaja más es que mediante la conexión del fluoróforo a uno o más de los sitios sustituidos mencionados (I27C, D63C, K216C o D224C), se consigue un funcionamiento eficaz del fluoróforo, que incluye la posibilidad de apilar rodamina cuando se utiliza más de un fluoróforo de tipo rodamina.

En otro aspecto, la invención se refiere a la molécula fijadora de ADP como la descrita más arriba, en la que dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones adicionales seleccionadas entre:

50

- (iv) T175N; o
- (v) T174A y T175A; o

(vi) T174A y T175N; o

(vii) T175L.

Estas sustituciones proporcionan la ventaja de incrementar la selectividad por el ADP.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP como la descrita más arriba, en la que dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones adicionales seleccionadas entre:

(iv) T175N; o

(v) T174A y T175A; o

(vi) T174A y T175N.

10 Además de la ventaja de incrementar la selectividad por el ADP, estas sustituciones específicas proporcionan la ventaja adicional de incrementar la K_d para el ADP.

Convenientemente, dicha molécula además comprende al menos un fluoróforo conectado a ésta.

15 Así pues, en otro aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP como la descrita más arriba que además comprende al menos un fluoróforo conectado a ésta, en donde dicho fluoróforo está conectado a una posición en el polipéptido de tal forma que el cambio conformacional del polipéptido tras la unión del ADP ocasiona un cambio correspondiente de la fluorescencia de dicho fluoróforo. Convenientemente, el fluoróforo, o cada uno de ellos, está conectado al polipéptido mediante un resto de aminoácido que corresponde a uno o más de I27C, D63C, K216C o D224C.

Convenientemente, el fluoróforo, o cada uno de ellos, se conecta a dicho polipéptido en un resto de aminoácido seleccionado entre:

20 (i) I27C; o

(ii) D63C y K216C; o

(iii) D63C y D224C.

Convenientemente, dicha molécula comprende al menos un resto de *N*-[2-(1-maleimidil)etil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida (MDCC) conectado a ella.

25 Convenientemente, dicha molécula comprende al menos dos restos de 6-yodoacetamidotetrametilrodamina (6-IATR) conectados a ella.

Convenientemente, dicha molécula comprende al menos dos restos de 5-yodoacetamidotetrametilrodamina (5-IATR) conectados a ella.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP como la descrita más arriba, en donde dicha molécula comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 2 o la SEQ ID n.º 5 (a veces denominada MDCC-ParM).

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP como la descrita más arriba, en donde dicha molécula comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3 o SEQ ID n.º 4 o SEQ ID n.º 6 o SEQ ID n.º 7 (a veces denominada 5-ATR-ParM o 6-ATR-ParM).

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que codifica la porción polipeptídica de una molécula fijadora de ADP como la descrita más arriba.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para monitorizar los cambios de la concentración de ADP en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con una molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y determinar los cambios de la conformación de dicha molécula fijadora de ADP, en donde los cambios de conformación de dicha molécula fijadora de ADP indican cambios de la concentración de ADP en dicha muestra.

Los procedimientos de la invención se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*. Convenientemente, los ensayos son ensayos *in vitro*.

45 La muestra puede ser de cualquier origen, incluidos suero, orina, saliva, sudor, cultivo de tejidos, extractos celulares, líneas celulares, comida, bebidas, sustancias farmacéuticas y sustancias medio ambientales (p. ej., agua). Convenientemente, la muestra comprende ensayo(s) *in vitro* para las ATPasas o cinasas candidatas, o ensayo(s) para el efecto de los compuestos candidato sobre las ATPasas o cinasas conocidas.

Convenientemente, la conformación de dicha molécula fijadora de ADP se monitoriza midiendo los cambios de fluorescencia de un fluoróforo comprendido en dicha molécula fijadora de ADP.

5 Convenientemente, la muestra comprende una ATPasa. Esto permite que la actividad ATPasa se mida directamente mediante la molécula fijadora de ADP. Convenientemente, esto se lleva a cabo en tiempo real, lo que permite monitorizar dinámicamente el estado de la reacción.

Convenientemente, la muestra comprende una helicasa o una cinasa, más convenientemente una cinasa. En particular, resulta ventajoso monitorizar las reacciones de las cinasas de acuerdo con la presente invención dado que las cinasas son dianas farmacológicas importantes, y la oportunidad para monitorizar su actividad en tiempo real y con independencia de la identidad de la cinasa y/o del sustrato es una característica beneficiosa de la invención.

10 Descripción detallada de la invención

Los inventores describen el desarrollo de un detector específico de ADP mediante el uso del homólogo procariota de la actina, ParM, como proteína fijadora. La ParM está codificada en el plásmido R1 de *Escherichia coli* y se necesita para la segregación de este plásmido de bajo número de copias (9). El locus de reparto de R1 contiene tres elementos, los genes que codifican ParM y ParR, y la región de ADN parecida a un centrómero ParC, que juntos constituyen la maquinaria necesaria para el reparto del plásmido (10-12). La proteína de unión al ADN ParR reconoce específicamente la región ParC de R1 y la formación del complejo ParR/ParC interviene en el emparejamiento del plásmido (13). La segregación del plásmido está guiada por los filamentos de tipo actina que forma la ATPasa ParM (14, 15), que se estabilizan al interactuar con ParR/ParC (16-18). El mecanismo exacto por el que la polimerización de ParM guía el transporte de los plásmidos está siendo objeto de muchos estudios (18-23).

20 La selección de ParM para el uso en la molécula fijadora de ADP de la invención proporciona una serie de ventajas. Primero, debido a su origen procariótico y a su tamaño relativamente pequeño, se puede sobreexpresar fuertemente en *E. coli* y, por consiguiente, es sencillo fabricarla en gran cantidad. Segundo, se dispone de estructuras cristalizadas, lo que demuestra que ParM sufre un gran cambio de conformación al unírsele el ADP (15). Basándose en estas estructuras, los inventores fueron capaces de diseñar racionalmente posiciones de marcación, en las que los fluoróforos probablemente respondan a la fijación del ADP y, entonces, a través de más conocimientos obtenidos por experimentación, seleccionan las que proporcionan la función deseada. Tercero, ParM tiene una gran afinidad por el ADP; se ha descrito que la constante de disociación es de 2,4 μM para el análogo fluorescente etenoADP (19). La afinidad elevada es ventajosa para la detección del ADP con una gran sensibilidad.

30 La invención da a conocer un biosensor sin reactivos para el ADP basado en la variante marcada con fluorescencia del homólogo bacteriano de la actina, ParM. Una realización preferente del detector, MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A), contiene un único marcador de cumarina conectado a la Cys27. La proteína marcada fija el ADP con fuerza ($K_d = 0,6 \mu\text{M}$) y con rapidez ($k_{on} = 0,6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), y le asocia un incremento de cuatro veces en la intensidad de la fluorescencia. El biosensor muestra una fuerte discriminación frente al ATP: la interacción con el ATP es más de 300 veces más débil que la interacción con el ADP. Tal y como hemos demostrado en los ensayos en equilibrio estacionario con una helicasa de ADN o con una proteína cinasa, los detectores son adecuados para la monitorización en tiempo real de la generación de ADP en las reacciones de las ATPasas y de las cinasas.

40 Tal y como está descrito, en esta realización, la MDCC está colocada en la hoja β de un subdominio y se acerca a un segundo subdominio tras el cierre de la hendidura desencadenado por el ADP (15). El gran cambio de fluorescencia probablemente se origine por la interacción del fluoróforo con el segundo dominio, informando así del cambio conformacional. Sin embargo, dado que el marcador se encuentra cerca de la base nucleotídica fijada (la distancia más corta es de unos 10 Å), una interacción directa de la MDCC con el ADP podría posiblemente también contribuir al cambio de señal observado. Tal mecanismo de ajuste inducido es habitual en muchas proteínas fijadoras de ligandos y a menudo pueden detectarse mediante la medición de la cinética de asociación del ligando. 45 La velocidad del cambio conformacional tiene implicaciones importantes en el funcionamiento del detector MDCC-ParM, ya que define la rapidez a la que el detector puede responder y así su idoneidad para los experimentos de cinética transitoria. La cinética de asociación del ADP a MDCC-ParM muestra una dependencia lineal de la constante de velocidad observada a concentraciones de ADP de hasta 200 μM . A concentraciones de ADP por encima de las descritas existe cierta sospecha de que los valores de k_{obs} se acercan a un límite. Esto puede deberse a que un cambio conformacional acabe limitando la velocidad y, con mucha probabilidad, esto representaría el cierre de la hendidura. Sin embargo, a 20 °C las velocidades fueron demasiado rápidas para caracterizar completamente el mecanismo de fijación en dos etapas.

55 Tal y como se describió más arriba, un desafío importante para el desarrollo de un detector de ADP es que consiga discriminar el ATP. A la ParM de tipo silvestre se le fija el análogo de trifosfato etenoATP con una fuerza 60 veces mayor que el difosfato etenoADP, y las constantes de disociación son de 0,04 y 24 μM , respectivamente (19). La ParM marcada con MDCC (I27C/C287A) tuvo una preferencia de fijación por el ADP 60 veces mayor que por el ATP. Esto es debido en parte a un incremento en la afinidad por el ADP ($K_d = 0,31 \mu\text{M}$), pero principalmente se debe a una fijación del ATP muy debilitada (470 veces; $K_d = 18,7 \mu\text{M}$). La gran diferencia podría deberse a las dos mutaciones puntuales o a la MDCC unida en la Cys27. Los dos restos mutados no entran en contacto con el

nucleótido unido, y la MDCC, aunque cerca de la base, está lejos de los fosfatos, por lo que parece poco probable que tenga un efecto directo sobre las interacciones nucleotídicas. En cambio, las modificaciones pueden cambiar la conformación de ParM y, por consiguiente, alterar indirectamente la afinidad por los nucleótidos. Tal y como se mencionó más arriba, la MDCC puede interaccionar con el subdominio opuesto, cuando el ADP está fijado, lo que podría estabilizar la conformación cerrada (fijada a ADP). Orlova et al. (14) sugirieron que ParM tenía una conformación más abierta en los filamentos que llevan fijados ATP, según dedujeron de las reconstrucciones 3D de las imágenes de crio-ME de los filamentos de ParM que llevan fijados AMPPNP. Así pues, la estabilización de una conformación cerrada de ParM gracias a MDCC podría reducir la afinidad por el ATP. Alternativamente, la diferencia de afinidad de los nucleótidos se puede deber directamente a los análogos de eteno utilizados por Garner et al. (19). Las estructuras del complejo de ParM con nucleótido muestran una interacción del Glu284 con el N1 de la base purínica, que está modificada en los análogos de eteno y, por lo tanto, podría influir en la afinidad. Sin embargo, sin desear atarse a esta teoría, la modificación está lejos de los fosfatos y, por consiguiente, es difícil explicar un efecto diferencial sobre la fijación del difosfato y del trifosfato.

Un detector preferente MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) contiene dos mutaciones más en el centro activo, T174A y T175N, que además reducen la afinidad de fijación por el ATP. La molécula resultante se fija al ATP con una fuerza 300 veces menor que al ADP, con una constante de disociación de aproximadamente 200 μM. El cambio de fluorescencia tras la fijación del ATP es parecido al de la fijación del ADP.

Hay otros dos posibles problemas, formación de filamentos e hidrólisis de ATP, asociados a la fijación del ATP. La ParM es capaz de formar un filamento de tipo actina, que es necesario para su función en la segregación de los plásmidos (14-16, 18). La formación de filamentos puede influir en la señal de fluorescencia y/o en la afinidad por los nucleótidos. La concentración crítica en presencia de ADP es alta, aproximadamente 100 μM (19) y no se alcanzará en las condiciones de ensayo normales. En cambio, los filamentos de ParM se forman con facilidad en presencia de ATP, con una concentración crítica de 2,3 μM (19). En nuestros experimentos no hemos observado ningún efecto de formación de filamentos, p. ej., las titulaciones se describen bien mediante los modelos de unión simples (no cooperativos) y las curvas de calibración muestran una dependencia lineal respecto a la concentración de ADP también en presencia de ATP. Por consiguiente, este posible problema teórico no afecta adversamente al funcionamiento de la invención.

Sin embargo, para algunas aplicaciones puede resultar ventajoso eliminar la formación de filamentos, por ejemplo, a altas concentraciones del detector, a altas concentraciones de ATP o en otras condiciones que podrían si no favorecer la formación de filamentos. Por esta razón, los inventores utilizaron una mutación optativa K33A para suprimir la formación de filamentos. En particular, se analizó la capacidad de formación de filamentos de MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) y, de hecho, se demostró que era capaz de polimerizarse, aunque lentamente y a altas concentraciones de ATP. La mutación optativa adicional que se introdujo para tratar esto es, convenientemente, una sustitución K33; lo más convenientemente K33A. La sustitución K33A abolió completamente la formación de filamentos (véase el apartado de los ejemplos).

Se analizó la capacidad de formar filamentos que tenían 5-ATR- y 6-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A). Se demostró que ambas eran capaces de formar filamentos. Sin embargo, dado que los detectores rodamina-ParM se utilizan a menudo más convenientemente por debajo de la concentración crítica para la formación de filamentos, de nuevo no es esencial introducir ninguna(s) mutación(ones) para mejorar esto. No obstante, puede resultar ventajosa la introducción de una mutación adicional que lo solvante; dicha mutación es, convenientemente, una sustitución de K33; lo más convenientemente K33A. La sustitución K33A abolió completamente la formación de filamentos (véase el apartado de los ejemplos).

Así pues, convenientemente, el polipéptido detector de la invención comprende una sustitución de K33, lo más convenientemente una sustitución K33A, que tiene la ventaja de reducir o eliminar la formación de filamentos.

Un posible segundo problema es la hidrólisis de ATP catalizada por ParM. La actividad ATPasa intrínseca de ParM es baja, pero se acelera enormemente mediante la polimerización a aproximadamente 3 min⁻¹ a 37 °C (16). No hemos medido directamente la actividad hidrolítica de MDCC-ParM en esta etapa, pero se puede estimar un límite superior a partir de los experimentos de control de los ensayos para la helicasa y para la cinasa, en los que sólo estaban presentes MDCC-ParM y ATP. La velocidad de hidrólisis es baja, de 0,004 min⁻¹ con ATP a 5 μM, 20 °C. Por consiguiente, en la práctica, la polimerización de MDCC-ParM y la hidrólisis de ATP no parecen ocasionar ningún problema grave en el funcionamiento de la invención.

A diferencia de la actina eucariota, que se fija específicamente a los nucleótidos de adenina, sus homólogos procariontes y de arqueas, MreB, FtsA y Ta00583, muestran una especificidad más bien baja por la base (37-41). A la ParM se le fijan los nucleótidos de guanina además de los nucleótidos de adenina, y dado que el GTP induce la formación de filamentos con más rapidez que el ATP, se ha propuesto que sea el sustrato fisiológico de ParM (21). Sin embargo, no se ha determinado la afinidad por el GDP ni por el GTP. La fluorescencia de MDCC-ParM disminuye ligeramente (aproximadamente un 30%) tras la adición de GDP (1 mM), en oposición a un incremento de la fluorescencia de cuatro veces cuando se fija el ADP. Este resultado fue sorprendente, dado que las conformaciones de ParM observadas en las estructuras que han fijado GDP y ADP son virtualmente idénticas y, por

consiguiente, no pueden explicar la diferencia observada en la respuesta de la fluorescencia. También es posible que el GDP no se fije a la variante MDCC-ParM en las condiciones experimentales utilizadas. Esto se tendrá que examinar adicionalmente en los experimentos de competición con ADP, para determinar si los nucleótidos de guanina podrían inhibir la respuesta del biosensor con ADP.

5 La MDCC-ParM tiene una serie de ventajas para su uso en los ensayos de ADP en función del tiempo. La MDCC-ParM se utiliza en cantidades estequiométricas y es capaz de detectar cada molécula de ADP generada y, por consiguiente, es probable que sea útil para la detección de ADP en el margen de submicromolar a aproximadamente 10 μM . El margen de concentraciones de ATP a utilizar en los ensayos es $<200 \mu\text{M}$, principalmente debido a la pérdida de sensibilidad: con ATP a 200 μM , la mitad de las moléculas de MDCC-ParM llevan fijadas el nucleótido y, por consiguiente, la cantidad de fluorescencia es casi la mitad del cambio máximo alcanzable. Sin embargo, para este tipo de ensayo sensible, la contaminación de ADP puede llegar a ser significativa, sea cual sea el procedimiento de ensayo. El ATP comercial contiene ADP al 0,1-1%, por lo que el ATP a 100 μM puede ya contener ADP a 1 μM . La purificación cuidadosa puede hacerla disminuir a $<0,1\%$ para el uso no convencional. La velocidad máxima medible es un compromiso entre la sensibilidad y el uso de la proteína. A una concentración muy alta del biosensor, el ADP se une a $>100 \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, para el uso convencional, el ensayo es más adecuado para constantes de velocidad de $<10 \text{ s}^{-1}$.

El detector MDCC-ParM ofrece varias ventajas en comparación con los ensayos actuales para el ADP descritos en la introducción. Como detector sin reactivos, es un sistema de componentes en el que para el ensayo solo se requiere (además de Mg^{2+} de cofactor) la proteína marcada. Normalmente, el Mg^{2+} sería necesario para la reacción a estudiar. La sensibilidad es submicromolar y el incremento de la fluorescencia significa que puede medir con facilidad la velocidad inicial de la reacción. Convenientemente, los ensayos de la invención comprenden Mg^{2+} .

Además del detector ParM descrito marcado con cumarina, otras realizaciones incluyen dos mutantes de ParM que están doblemente marcados con las sondas de rodamina 5- y 6-IATR, y explotan la interacción de apilamiento de la rodamina como base para cualquier cambio de fluorescencia. El cambio de señal más grande se obtuvo con la 6-ATR-ParM (D63C/D224C), que responde a la fijación del ADP con un incremento de la fluorescencia de 10 veces. Sin embargo, la afinidad por el ADP está muy reducida ($K_d = 140 \mu\text{M}$).

Esta reducción de la afinidad se podría deber a que las rodaminas son más voluminosas, junto con las mutaciones de dos cisteínas que afectan a la fijación. Alternativamente, la fijación del ADP requiere el cierre de la hendidura y, por consiguiente, la desaparición de la interacción de apilamiento de la rodamina. Un segundo mutante doble marcado con rodamina (D63C/K216C) tiene una reducción de la afinidad por el ADP de tan solo dos veces, lo que sugiere que la fijación más débil del ADP se debe, al menos en parte, a la mutación D224C. De igual forma, en un uso previo del apilamiento de rodaminas para detectar un cambio de conformación de la proteína con la proteína fijadora de fosfato, la rodamina tuvo poco efecto sobre la afinidad por el fosfato inorgánico (30). La baja afinidad hace que la versión con rodamina sea menos sensible que el detector con MDCC, pero más adecuada para las concentraciones altas de ATP.

El biosensor marcado con rodamina puede utilizarse ventajosamente de una manera diferente a como se usa la MDCC-ParM, que se encuentra a una concentración más baja que el ADP a detectar. Debido a que la fijación es débil, el grado de saturación, y por lo tanto la fluorescencia, variará con el ADP en el margen de la constante de disociación. Aunque esto da lugar a la pérdida de sensibilidad, puede extender su posible uso a concentraciones de ATP más altas y significa que la contaminación de ADP en el ATP es menos problemática que con la MDCC-ParM. Además, la rodamina es generalmente más fotoestable que la cumarina. Estas propiedades probablemente hagan que la 6-ATR-ParM sea más adecuada para las aplicaciones como los ensayos de alto rendimiento.

ParM

La estructura de ParM se ha resuelto en cuatro estados diferentes, la forma libre de nucleótidos así como los complejos con ADP, GDP y GMPPNP (15, 21). La ParM consiste en dos dominios (I y II), que se dividen a su vez en los subdominios A y B. El sitio de fijación del nucleótido está localizado en una hendidura entre los dominios, y a la interacción contribuyen restos de ambos dominios. En ausencia de nucleótido, la ParM se encuentra en una conformación abierta. La estructura del complejo con ADP muestra un movimiento corporal rígido grande (25°) de los dos dominios, uno respecto al otro, lo que conduce al cierre de la hendidura (15). La conformación de ParM en los complejos con GDP y con GMPPNP es virtualmente idéntica a la estructura con ADP, sin ninguna diferencia notable entre la orientación de los dominios de ParM fijada al análogo de trifosfato o a los difosfatos (21).

Aunque la elección de ParM para uso como un biosensor sin reactivos proporciona varias propiedades ventajosas que se han descrito más arriba, la elección también presentaba varios problemas que son desventajosos o perjudiciales en potencia. Un problema en el desarrollo de un sistema de ensayo específico del ADP es que los ensayos probablemente se realizan en presencia de ATP como sustrato, que puede fijarse, o al menos inhibir, a algunos componentes del ensayo. En el caso de un biosensor basado en la fijación, debe haber una discriminación del ATP. La ParM se fija al análogo de trifosfato etenoATP con una fuerza unas 60 veces mayor ($K_d = 40 \text{ nM}$) que al etenoADP (19). La ParM tiene la capacidad de formar filamentos, que pueden afectar a la señal de fluorescencia y/o a la fijación de los nucleótidos. Finalmente, la ParM tiene actividad ATPasa. Dado que el biosensor probablemente

esté presente en la solución del ensayo a una concentración relativamente alta, esta actividad ATPasa podría interferir. Los inventores describen cómo tratar estos problemas mediante la manipulación de la proteína, en particular mediante mutación (tal como sustitución) de determinados aminoácidos.

Polipéptidos de ParM

- 5 Los componentes polipeptídicos de las moléculas de la invención proceden de ParM. En particular, las direcciones de los aminoácidos dadas en la solicitud corresponden a la numeración de la secuencia de referencia de ParM de SEQ ID n.º 1. Cuando se utilizan formas truncadas o extendidas de ParM como polipéptidos en las moléculas de la invención (p. ej., cuando se añade una etiqueta de 6 His o cuando se elimina una sección del polipéptido), entonces la numeración de los aminoácidos se debe tratar como correspondiente a la sección equivalente de la secuencia completa de referencia de ParM, y no como una dirección numérica rígidamente inflexible o «absoluta». A modo de explicación, si la descripción menciona una sustitución de la C287, esto significa el aminoácido 287 de la secuencia de referencia de ParM de SEQ ID n.º 1. Si el polipéptido utilizado está truncado por eliminación de los primeros 10 aminoácidos, la dirección dada será todavía C287 (en vez de, p. ej., C277) —esto lo comprenderá fácilmente el experto en la técnica— para referirse al aminoácido del contexto correspondiente con referencia a la secuencia completa de ParM de SEQ ID n.º 1, que es lo convenido en la técnica.

10 Claramente, hay elementos de la secuencia de tipo silvestre de ParM que enseñamos cuya mutación, tal como mediante la sustitución, es importante para conseguir ciertas ventajas. Sin embargo, hay también numerosos restos que pueden o no mutarse dependiendo de la elección del operador. Claramente, hay muchos restos que no deben mutarse en caso de que tal mutación interfiera con el funcionamiento del polipéptido. Típicamente se esperaría que si el experto en la técnica encuentra un problema sobre si se podría mutar o no un determinado resto, podrían hacer la mutación y luego comprobar el polipéptido resultante para asegurarse de que la propiedad deseada se conserva en la versión mutada. Sin embargo, para guiar adicionalmente sobre este punto, se realizan los comentarios siguientes:

20 El polipéptido de ParM se ha estudiado en detalle y cada resto se ha clasificado como se presenta en la tabla A que viene a continuación. La clasificación es la siguiente:

Oculto: restos de ParM en el núcleo de la estructura, donde las mutaciones es probable que afecten al funcionamiento del detector.

Expuesto: restos de ParM en la superficie de la proteína. Las mutaciones de estos restos probablemente conserven la función del detector.

- 30 Intermedio: es posible que ocurran cambios en el funcionamiento del detector cuando se mutan estos restos, pero puede ser difícil predecirlo, p. ej., el análisis convencional de las mutaciones resultantes es particularmente preferente cuando se mutan estos restos. La mayoría de ellos están parcialmente ocultos.

35 Los restos marcados con un asterisco (*) señalan restos del centro activo que se mutan específicamente para mejorar o alterar el funcionamiento del detector (tal como realzar la selectividad por el ADP, empeorar la hidrólisis del ATP). Éstas se discuten en más detalle en el texto. Estos aminoácidos del centro activo se muestran en la tabla como cambiables-intermedios. En particular, las realizaciones de la invención en las que interviene la rodamina como resto indicador del detector pueden comprender otra(s) mutación(ones) en uno o más de estos restos.

Sorprende observar el elevado número de aminoácidos en la superficie (por supuesto, se tendrá en cuenta que el grado de accesibilidad variará).

Tabla A: restos de ParM

Oculto (I)	Expuesto (II)	Intermedio (III)	Oculto (I)	Expuesto (II)	Intermedio (III)
Val 3	Met 1	Asp 6*	Thr 137	Asn 111	Glu 284*
Phe 4	Leu 2	Gly 8*	Phe 138	Gln 113	Cys 287
Ile 5	Gln 17	Ser 9*	Ile 140	Pro 114	Thr 294
Asp 7	Glu 18	Thr 10*	Val 143	Thr 116	Ile 296
Asn 11	Ser 19	Lys 13*	Val 145	Glu 117	Phe 302
Ile 12	Asp 20	His 26	Met 146	Glu 120	Thr 304
Leu 14	Gly 21	Val 45	Pro 147	Arg 121	Gln 308*
Gln 15	Thr 22	Asn 47	Ser 149	Ala 124	Asp 310
Trp 16	Ile 23	Phe 57	Ile 150	Arg 127	
Ser 28	Lys 24	Ile 60	Pro 151	Lys 129	
Pro 29	Gln 25	Pro 62	Ala 152	Thr 131	
Asn 30	Ile 27	Asn 69*	Gly 153	Asn 133	
Ser 31	Lys 33	Ser 75	Val 156	Gly 134	
Phe 32	Arg 34	Asp 76	Leu 157	Gly 135	
Phe 46	Glu 35	Val 77	Leu 160	Asp 136	
Tyr 48	Trp 36	Leu 87	Ser 165	Thr 139	
Leu 50	Ala 37	Thr 88	Leu 166	Lys 141	
Tyr 55	Val 38	Thr 101*	Leu 167	Asp 142	
Ser 56	Ser 39	Glu 106	Ile 168	Lys 144	
Trp 72	Phe 40	Asp 109	Ile 169	Glu 155	
Gln 73	Gly 41	Asn 112	Leu 171	Gln 158	
Tyr 74	Asp 42	Asn 115	Leu 176	Glu 159	
Asn 78	Lys 43	Asn 118	Ile 178	Asp 161	
Val 79	Lys 44	Lys 123	Ser 179	Glu 162	
Val 80	Thr 49	Lys 128	Gln 180	Leu 163	
Ala 81	Asn 51	Glu 148*	Val 181	Asp 164	
Val 82	Gly 52	Tyr 154	Gly 183	Lys 184	
His 83	Glu 53	Asp 170*	Leu 197	Leu 185	
His 84	Gln 54	Gly 172*	Gly 198	Ser 186	
Ala 85	Asp 58	Gly 173*	Val 199	Gly 187	
Leu 86	Pro 59	Thr 174*	Val 202	Ser 189	
Ser 89	Ser 61	Thr 175*	Thr 203	Lys 190	
Leu 91	Asp 63	Asp 177*	Val 206	Tyr 192	
Val 96	Ala 64	Met 182	Lys 207	Gly 193	
Ile 98	Val 65	Ile 188	Leu 210	Ser 195	
Val 99	Val 66	Ile 191	Ser 219	Ser 196	
Cys 100	Thr 67	Asp 194	Ala 222	Ser 204	
Leu 102	Thr 68	Ser 200	Ile 225	Asp 208	
Pro 103	Ile 70	Leu 201	Ile 226	Ser 211	
Leu 104	Ala 71	Ala 205	Arg 229	Leu 212	
Tyr 107	Gly 90	Ala 209	Leu 235	Ala 213	
Tyr 108	Pro 92	Ser 218	Ile 239	Arg 214	
Ile 119	Val 93	Leu 221	Ile 245	Thr 215	
Lys 122	Ser 94	Asp 223*	Val 248	Lys 216	
Asn 125	Glu 95	Ile 227*	Met 252	Gly 217	
Phe 126	Asp 97	Ala 251	Ala 255	Tyr 220	
Ile 130	Thr 105	Tyr 273	Leu 256	Asp 224	
Leu 132	Arg 110	Thr 274	Leu 259	His 228	

Val 263	Lys 230	Asn 265
Thr 266	Asp 231	Asn 268
Leu 267	Asn 232	Glu 269
Phe 270	Asn 233	Ser 271
His 275	Tyr 234	Gly 272
Val 276	Lys 236	Asp 288
Met 277	Gln 237	Lys 291
Val 278	Arg 238	Lys 292
Ile 279	Asn 240	His 293
Gly 280	Asp 241	Gln 295
Gly 281	Glu 242	Arg 297
Gly 282	Asn 243	Asp 298
Ala 283	Lys 244	Glu 299
Leu 285	Ser 246	Arg 300
Ile 286	Ile 247	Lys 303
Ala 289	Thr 249	Asn 305
Val 290	Glu 250	Asn 306
Phe 301	Asn 253	Asn 313
Ser 307	Glu 254	Leu 317
Tyr 309	Arg 257	Ile 318
Leu 311	Lys 258	Gly 319
Val 312	Glu 260	Asn 320
Gly 314	Gln 261	
Met 315	Arg 262	
Tyr 316	Leu 264	

Restos ocultos

5 Convenientemente, no se mutan los restos mostrados como «ocultos» en la tabla A. Así pues, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención que corresponde a los restos de ParM mostrados como «ocultos» en la tabla A no se mutan respecto a ParM (SEQ ID n.º 1). En otras palabras, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención mostrados como «ocultos» en la tabla A comprenden el mismo resto que en la correspondiente posición en ParM (SEQ ID n.º 1).

10 De acuerdo con la invención, el componente polipeptídico de la molécula fijadora de ADP de la invención comprende convenientemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con los restos mostrados como «ocultos» en la tabla A.

Restos intermedios

15 Convenientemente, se pueden mutar los restos mostrados como «intermedios» en la tabla A. Por consiguiente, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención que corresponden a los restos de ParM mostrados como «intermedios» en la tabla A se pueden mutar respecto a ParM (SEQ ID n.º 1). En otras palabras, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención mostrados como «intermedios» en la tabla A pueden comprender un resto diferente (o ningún resto) de la correspondiente posición en ParM (SEQ ID n.º 1).

20 En algunas realizaciones, el componente polipeptídico de la molécula fijadora de ADP de la invención comprende convenientemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 68% con los restos mostrados como «intermedios» en la tabla A. Esto es porque, de los 56 restos descritos como «intermedios», convenientemente al menos aproximadamente 18 restos se considera que son útiles para mutar con vistas a mejorar la función, como se explica en la presente memoria. No todas las mutaciones enseñadas en la presente memoria pueden necesitarse en cada contexto, dependiendo del uso final de la molécula fijadora de ADP, como se explica en la presente memoria. Por consiguiente, en algunas realizaciones, podrían mutarse menos de 18 de los restos mostrados como «intermedios» en la tabla A. Así pues, en algunas realizaciones, el componente polipeptídico de la molécula fijadora de ADP de la invención comprende convenientemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con los restos mostrados como «intermedios» en la tabla A, convenientemente una identidad de secuencia de al menos el 74%, convenientemente una identidad de secuencia de al menos el 78%, convenientemente una identidad de secuencia de al menos el 82%, convenientemente una identidad de secuencia de al menos el 86%, convenientemente una identidad de secuencia de al menos el 90%, convenientemente una identidad de secuencia de al menos el 94%, convenientemente una identidad de secuencia de al menos el 98%, con los restos mostrados como «intermedios» en la tabla A.

No obstante, se debe observar que estos restos «intermedios» están, de hecho, parcialmente ocultos. Por lo tanto, convenientemente, estos restos «intermedios» sólo se mutan mediante sustitución por un resto conservativo respecto a ParM. En otras palabras, convenientemente, los restos no idénticos señalados más arriba comprenden sólo sustituciones conservativas respecto al correspondiente resto en ParM.

- 5 Se pueden realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la tabla que viene a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir unos por otros:

ALIFÁTICO	No polar	GAP
		ILV
	Polar sin carga	CSTM
		NQ
	Polar con carga	DE
		KR
AROMÁTICO		HFVY

- 10 Más convenientemente, no están mutados los restos mostrados como «intermedios» en la tabla A. Por consiguiente, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención que corresponde a los restos de ParM mostrados como «intermedios» en la tabla A no están mutados respecto a ParM (SEQ ID n.º 1). En otras palabras, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención mostrados como «intermedios» en la tabla A comprenden el mismo resto que en la posición correspondiente en ParM (SEQ ID n.º 1).

15 *Restos expuestos*

- Convenientemente, se pueden mutar los restos mostrados como «expuestos» en la tabla A. Por lo tanto, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención que corresponde a los restos de ParM mostrados como «expuestos» en la tabla A pueden estar mutados respecto a ParM (SEQ ID n.º 1). En otras palabras, convenientemente, los restos en la parte polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de la invención mostrados como «expuestos» en la tabla A pueden comprender un resto diferente (o ningún resto) de la posición correspondiente en ParM (SEQ ID n.º 1).

El componente polipeptídico de la molécula fijadora de ADP de la invención comprende convenientemente la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 100% con los restos mostrados como «expuestos» en la tabla A.

25 **Moléculas fijadoras de ADP**

- Para construir moléculas fijadoras de ADP que comprenden variantes fluorescentes de ParM, que responden a la fijación del ADP, se emplearon dos estrategias diferentes. La primera se basaba en la conexión de un único fluoróforo sensible a los cambios del entorno. Colocado en el borde de la hendidura a la que se fija el nucleótido, el entorno local de un fluoróforo se altera tras el cierre de la hendidura inducido por el ADP y, por lo tanto, la fluorescencia puede informar de la unión del ADP. La segunda estrategia se aprovecha de la gran diferencia de fluorescencia de la rodamina dependiendo de si el fluoróforo está en estado monomérico o dimérico. El fundamento de este cambio de fluorescencia se ha descrito previamente (24-26). Esta estrategia se ha utilizado para monitorizar la escisión de pequeños péptidos mediante proteinasas, p. ej., elastasa y la proteasa de la malaria PfSUB-1 (27-29). Cuando las rodaminas están conectadas a ambos extremos de un péptido, forman una interacción de apilamiento que extingue la mayor parte de su fluorescencia. Esta interacción se pierde tras la escisión del péptido, lo que produce un incremento de la intensidad de la fluorescencia de hasta 30 veces (29). Esta estrategia también se puede utilizar para monitorizar los cambios conformacionales en las proteínas cuando se altera la distancia o la orientación relativa de dos rodaminas conectadas a ella. Se desarrolló una proteína fijadora de fosfato marcada con dos rodaminas que consiguió un incremento de la fluorescencia de 20 veces tras la fijación del ligando (30).

- 40 Aquí describimos el desarrollo de variantes de ParM que responden a la fijación del ADP con un gran incremento de la fluorescencia, mediante la doble marcación con rodamina y/o la marcación simple con cumarina. Se describen moléculas fijadoras de ADP que discriminan el ATP y que tienen una actividad ATPasa muy baja. Una variante preferente de la molécula fijadora de ADP con un fluoróforo de cumarina tiene una afinidad elevada por el ADP, de tal forma que es probable que se le fije cada molécula de ADP producida durante un ensayo para cinasa o para ATPasa. Un ejemplo de esto se describe en la presente memoria como MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A).

Otra variante con marcación de rodamina tiene una fijación más débil, por lo que la ParM marcada puede estar presente a una concentración baja, pero la fracción fijada al ADP depende de la concentración de ADP en el medio. Un ejemplo de esto se describe en la presente memoria como 6-ATR-ParM (D63C/D224C).

5 Así pues, en la presente invención se dan a conocer las moléculas fijadoras de ADP con diferentes características que se pueden seleccionar, o que se pueden diseñar, para diferentes sistemas experimentales.

10 En un amplio aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de ParM para uso como una molécula que detecta ADP o una molécula fijadora de ADP. Tal polipéptido de ParM puede estar completo (a saber, que comprende los 320 restos de aminoácidos que corresponden a la SEQ ID n.º 1 [tanto si se hacen o no sustituciones respecto a la SEQ ID n.º 1 en los aminoácidos particulares presentes]) o truncado. Convenientemente, las formas truncadas del polipéptido de ParM son las que carecen de un número pequeño de restos de aminoácidos desde el extremo amino o desde el carboxilo del polipéptido respecto a la ParM de tipo silvestre. Convenientemente, un número pequeño es 10 o menor. Convenientemente, tal molécula de ParM posee uno o más de los rasgos presentados más abajo para la molécula fijadora de ADP de la invención.

15 Convenientemente, la molécula fijadora de ADP tiene menos actividad ATPasa que la ParM de tipo silvestre. Convenientemente, dicha reducción de la actividad ATPasa se debe a la mutación del centro activo ATPasa de ParM.

20 Convenientemente, la molécula fijadora de ADP tiene menos capacidad de fijación de ATP que la ParM de tipo silvestre. Convenientemente, dicha reducción de la fijación de ATP está mediada por la mutación del sitio activo ATPasa de ParM. Convenientemente, dicha mutación es mediante sustitución del resto de aminoácido T174 y/o T175 de la ParM de tipo silvestre. Ventajosamente, la parte polipeptídica de la molécula de la invención comprende sustituciones respecto a la secuencia de ParM mostrada como SEQ ID n.º 1 para mejorar la selectividad por el ADP. Tales sustituciones se pueden elegir mediante cualquier estrategia adecuada. Una primera estrategia es diseñar mutaciones que pueden debilitar la fijación del ATP. Segundo, se podría bloquear estéricamente el sitio de fijación del fosfato y mediante la elección de sustituciones alternativas apropiadas. Las sustituciones diseñadas mediante una cualquiera de estas dos estrategias o mediante cualquier otra estrategia se pueden combinar ventajosamente para un efecto aditivo o sinérgico. A través de este tipo de sustitución, se prefiere no seleccionar sustituciones que podrían disminuir la afinidad por el ADP o al menos seleccionar sustituciones que sólo afectarán mínimamente de forma adversa a la afinidad por el ADP. En este sentido, convenientemente, las mutaciones tales como sustituciones se realizan en uno o más de los aminoácidos que corresponden a D6, S9, E148, D170, T174, T175, más convenientemente las sustituciones se realizan en uno o más de los aminoácidos que corresponden a T175, T174, E148 o S9. Estas sustituciones encuentran una aplicación particular en la mejora de la selectividad por el ADP que tienen las variantes de ParM marcadas con rodamina. Más convenientemente, las sustituciones se realizan en aminoácidos que corresponden a T174 y/o T175. Las sustituciones particularmente ventajosas incluyen T175L, T175N, T175A y T174A. Las sustituciones T175N, T174N y T175L son particularmente ventajosas, dado que estas sustituciones realmente incrementan la afinidad por el ADP que tiene el polipéptido, y también reducen la afinidad por el ATP y, por consiguiente, incrementan la selectividad mediante ambos mecanismos. También se pueden realizar combinaciones de estas sustituciones. Especialmente preferentes son las moléculas que comprenden una sustitución T175N, las moléculas que comprenden una sustitución T175L y las moléculas que comprenden una sustitución doble T174A y T175N.

40 Más preferentemente las moléculas de la invención comprenden una o más sustituciones que mejoran la selectividad por el ADP en combinación con una o más sustituciones para la conexión de un resto indicador tal como un fluoróforo. En particular, las sustituciones más adecuadas para mejorar la selectividad por el ADP se combinan con una sustitución I27C.

45 Así pues, en otro aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP que comprende un polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a al menos los aminoácidos 11 a 310 de la SEQ ID n.º 1, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones respecto a SEQ ID n.º 1 seleccionadas entre:

- (iv) T175N; o
- (v) T174A y T175A; o
- (vi) T174A y T175N; o
- 50 (vii) T174A y T175L; u
- (viii) T175L.

55 Así pues, en otro aspecto, la invención se refiere a una molécula fijadora de ADP que comprende un polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a al menos los aminoácidos 11 a 310 de la SEQ ID n.º 1, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones respecto a SEQ ID n.º 1 seleccionadas entre:

- (iv) T175N; o
- (v) T174A y T175A; o
- (vi) T174A y T175N; o
- (vii) T175L.

- 5 Convenientemente, la molécula fijadora de ADP forma menos filamentos que la ParM de tipo silvestre. Convenientemente, dicha reducción de la formación de filamentos está mediada por la mutación del centro de fijación del ATP en ParM. Convenientemente, dicha mutación es por sustitución de uno o más restos de aminoácidos que corresponden a D58, K33, R34, W36 o F40 de la ParM de tipo silvestre. La mutación (tal como sustitución) de uno o más de estos restos tiene la ventaja de ser lo más adecuado para inhibir la formación de filamentos.
- 10 Convenientemente, la molécula fijadora de ADP de la invención es, y puede utilizarse como, un biosensor sin reactivos.
- Puede añadirse una etiqueta de hexahistidina (6his) a la parte polipeptídica de la molécula fijadora de ADP de la invención para simplificar la purificación; más convenientemente se utiliza una etiqueta de hexahistidina en el extremo carboxilo.
- 15 Además, dado que las moléculas fijadoras de ADP de la invención dependen solo de la fijación del ADP y no de ninguna actividad enzimática concreta ni de componentes químicos periféricos, son detectores robustos para el uso en un amplio abanico de tampones o condiciones experimentales.

Restos indicadores/sitios de conexión

- 20 La molécula fijadora de ADP de la invención comprende convenientemente uno o más restos indicadores. El resto indicador puede ser cualquier grupo químico o estructura adecuado capaz de leer cambio(s) en la conformación de dicha molécula fijadora de ADP. Más convenientemente, el resto indicador comprende uno o más fluoróforo(s) tal como cumarina o rodamina.

- 25 Los restos indicadores utilizados en la invención pueden proporcionar diferentes señales, pero los marcadores preferentes son marcadores luminiscentes. Los marcadores luminiscentes incluyen tanto marcadores fluorescentes como marcadores fosforescentes. Sin embargo, se contempla el uso de otros marcadores. Por ejemplo, se podrían utilizar marcadores electroquímicos en donde la alteración del entorno de los marcadores dará lugar a un cambio en el estado de oxidorreducción. Tal cambio se puede detectar con un electrodo. Más convenientemente se utilizan marcadores fluorescentes que se pueden excitar para que emitan fluorescencia tras la exposición a determinadas longitudes de onda de luz. El marcador fluorescente se puede seleccionar entre el grupo que consiste en rodaminas, cianinas, pirenos y derivados de los mismos. Los fluoróforos fluorescentes preferentes se basan en un núcleo del xanteno, que puede apilarse con facilidad para formar dímeros. Especialmente adecuados son los fluoróforos de rodamina.

- 30 Convenientemente el resto indicador comprende cualquier marcador fluorescente utilizable. Los marcadores fluorescentes con fluorescencia medioambientalmente sensible es probable que sean los mejores. Cuando el sitio de conexión es una cisteína, entonces el resto necesita que reaccione el tiol para la conexión. En otras realizaciones se puede emplear una marcación sensible a amina sobre la proteína sin Cys.

En algunas realizaciones, los restos indicadores pueden ser los que pueden mostrar apilamiento molecular, lo que, por lo tanto, incluirá anillos aromáticos. Éstos incluyen los marcadores de rodamina. En otras realizaciones, pueden utilizarse marcadores que no se apilan, tal como marcadores de cumarina.

- 40 El apilamiento del colorante es una interacción no covalente entre dos cromóforos que tienen anillos aromáticos planos y se produce cuando los anillos están separados por una distancia que es lo suficientemente corta para permitirles interactuar, p. ej., para formar dímeros o trímeros. La señal detectable de las moléculas apiladas es diferente de la de las moléculas sin apilar (p. ej., el apilamiento puede ocasionar la extinción de las señales y, por lo tanto, los cromóforos apilados típicamente mostrarán menos intensidad de señal fluorescente que los cromóforos sin apilar por separado) y esta diferencia puede utilizarse para detectar la presencia o ausencia del apilamiento. Los cromóforos apilados pueden tener un espectro de absorción con (i) una disminución característica del pico de absorción principal a medida que se incrementa la concentración del cromóforo y (ii) un pico de hombro característico («división de bandas»).

- 50 Por ejemplo, los cromóforos de rodamina pueden formar dímeros a concentraciones elevadas en solución. El dímero tiene un espectro de absorbancia diferente al del monómero, y tiene poca o ninguna fluorescencia en comparación con el monómero. Dos cromóforos de rodamina unidos a posiciones adecuadas en la proteína pueden formar dímeros, cuya interacción se altera cuando el ligando se fija a la proteína. La invención puede detectar mediante espectroscopia la diferencia entre las conformaciones sin ADP y con ADP fijado que presentará la molécula fijadora de ADP. El apilamiento molecular tiene lugar a través de la interacción física de estados fundamentales de los dos

restos. Los marcadores que pueden sufrir el apilamiento molecular se conocen bien en la técnica. El apilamiento puede producirse entre cromóforos idénticos y puede también producirse entre cromóforos diferentes.

Convenientemente, los fluoróforos pueden incluir un o más de

MDCC, *N*-[2-(1-maleimidil)etil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida;

5 IDCC, *N*-[2-(yodoacetamido)etil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida);

MIANS, ácido 2-(4'-maleimidil)naftalen-6-sulfónico;

5-IATR, 5-yodoacetamidotetrametilrodamina;

Alexa 488, AlexaFluor-488-maleimida;

MPrCC, *N*-[3-(1-maleimidil)-1-propil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida;

10 CPM, 7-dietilamino-3-[4'-(1-maleimidil)fenil]-4-metilcumarina;

acrilodán: 6-acriloil-2-dimetilaminonaftaleno.

Los fluoróforos especialmente adecuados se mencionan en el apartado de ejemplos, en particular en la tabla 1.

15 En algunas realizaciones, la molécula fijadora de ADP comprende la conexión de uno o más fluoróforos a través de un aminoácido que corresponde a la C287 de ParM. En estas realizaciones, convenientemente, una disminución de la fluorescencia indica un incremento de la fijación de ADP.

20 En otras realizaciones, el polipéptido comprende una sustitución de la C287, tal como C287A. En estas realizaciones se utiliza un sitio de conexión alternativo. La C287 es un resto de cisteína expuesto al disolvente. Los inventores enseñan que puede ser problemático utilizarlo como un sitio de conexión del fluoróforo debido a su proximidad a otros elementos funcionales en el polipéptido derivado de ParM. Así pues, una ventaja de la sustitución de este resto es una molécula con una mayor funcionalidad. Otra ventaja de la sustitución de la C287 es que se mejora la conexión selectiva del fluoróforo (o de otro resto indicador) dado que la sustitución impide la conexión en el aminoácido 287. Así pues, cuando se sustituye la C287, se utiliza cualquier resto de aminoácido inadecuado para (o resistente a) la conexión de un fluoróforo u otro resto indicador; lo más convenientemente, se realiza una sustitución C287A. A menos que se mencione de otra manera, los componentes del polipéptido de la molécula fijadora de ADP 25 de la invención comprenden una sustitución de la C287, en particular C287A.

30 Se pueden utilizar uno o más sitios de conexión alternativos. Convenientemente, un resto de aminoácido adecuado para el uso en la conexión, tal como un resto de cisteína, se introduce en cualquier posición del polipéptido (a saber, en una o más posiciones diferentes de las cisteínas que contiene de forma natural) para el uso como sitio de conexión. Por consiguiente, el polipéptido puede comprender una o más sustituciones seleccionadas entre los aminoácidos que corresponden a I27, D58, D63, S204, T215, K216 o D224 de ParM.

35 Convenientemente, el polipéptido puede comprender combinaciones de dos o más de tales sustituciones. Las combinaciones de sustituciones particularmente adecuadas incluyen D63 y K216; D63 y D224. Convenientemente, cada sustitución cuyo objetivo es la conexión es una sustitución por cisteína, p. ej., I27C. Cada una de estas sustituciones se combina convenientemente con una sustitución de la C287, tal como C287A. Estas muchas realizaciones de sitios de conexión de la invención tienen la ventaja de permitir la unión de varios fluoróforos al mismo polipéptido. Esto permite la amplificación de la señal y, más convenientemente, permite el uso del apilamiento de fluoróforos para reforzar la señal y proporcionar una lectura más robusta en comparación con otras técnicas. Por lo tanto, se prefieren varios sitios de conexión tal como dos o más sitios de conexión cuando se utiliza el apilamiento de fluoróforos en la lectura.

40 Una sustitución más preferente es I27C. Esto es particularmente preferente en combinación con C287A. Esto es particularmente adecuado para las realizaciones de fluoróforos únicos.

Por consiguiente, determinadas sustituciones pueden ser especialmente adecuadas para diferentes restos indicadores. Los ejemplos de tales combinaciones se presentan en la tabla 1. Esto se explica con más detalle más adelante.

45 **Química de la conjugación**

Los restos indicadores o marcadores tales como los fluoróforos se pueden conectar a la molécula fijadora de ADP de la invención mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Convenientemente, los fluoróforos se conectan mediante técnicas de conjugación convencionales, tales como la conexión covalente a través de un resto de cisteína en el componente polipeptídico de la molécula fijadora de ADP.

Se conoce bien cómo conectar covalentemente a las proteínas los restos indicadores extrínsecos. Los diferentes restos de cisteína muestran diferente reactividad a los reactivos marcadores, lo que se puede valorar con DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)).

5 Los restos indicadores se pueden unir a través de aminas o restos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos, pero es más adecuado utilizar el enlace covalente a través del grupo tiol en un resto de cisteína. Cuando se adhiere más de un marcador a una proteína, éstas se conectan convenientemente a restos aminoacídicos independientes.

10 Cuando tiene que introducirse un resto de cisteína, bien mediante inserción o bien mediante sustitución, hay que tener en cuenta una serie de factores. Éstos se explican con más detalle en la presente memoria. Sitios de ejemplo para la introducción de restos de Cys, y por lo tanto para la conexión de marcadores, incluyen uno o más de I27C, D63C, K216C o D224C.

15 Si los cromóforos conectados tienen que interactuar, se deben seleccionar los restos de tal forma que estén próximos entre sí, y que el cambio conformacional que se produce cuando se fija el ADP que afecta a uno o ambos de los restos cause un cambio en la posición u orientación o entorno electrónico de un marcador unido a éstos. Las parejas de ejemplo de sitios de conexión incluyen D63C y K216C; o D63C y D224C.

Las técnicas de conexión de ejemplo se presentan en el apartado de los ejemplos.

Lecturas

20 Un concepto clave de la invención es que las moléculas fijadoras de ADP (proteínas detectoras) se configuran de tal forma que sufran un cambio conformacional tras la fijación del ADP. Es la detección de este cambio conformacional lo que permite determinar el estado de fijación del ADP en las moléculas de la invención. Claramente, cuando la tecnología lo permite, se pueden determinar los cambios conformacionales de una única molécula. Sin embargo, para la mayoría de las realizaciones de la invención, la determinación del estado conformacional de la molécula fijadora de ADP se evalúa convenientemente como un efecto de la población. Es decir, la evaluación del cambio conformacional de una molécula fijadora de ADP de la invención se puede llevar a cabo determinando el cambio conformacional de una población de moléculas fijadoras de ADP de la invención. Considerando las realizaciones en las que el cambio conformacional se lee o detecta con la monitorización de los cambios de comportamiento de un resto indicador acoplado a la molécula fijadora de ADP de la invención, esta idea se puede explicar como viene a continuación. Con el propósito de ilustrarlo mejor, el resto indicador se considerará que es un fluoróforo. El fluoróforo está conectado a la molécula fijadora de ADP de la invención. La fijación de ADP conduce a un cambio conformacional de la molécula fijadora de ADP. Este cambio conformacional puede conducir a un cambio de la fluorescencia. Este cambio de la fluorescencia puede ser un incremento o una disminución tras la fijación de ADP, según la estrategia de marcación particular utilizada. Para cualquier aplicación dada que tenga una cantidad fija de la proteína detectora, el cambio de la fluorescencia se asociará coherentemente con el correspondiente cambio en la fijación de ADP. La fijación del ADP es proporcional a la concentración de ADP presente en la muestra a estudiar.

30 Por consiguiente, los cambios por la fijación del ADP proporcionan información sobre los cambios de la concentración del ADP en la muestra que se está estudiando. Así pues, los cambios de fluorescencia que están catalizados por cambios conformacionales en la molécula fijadora de ADP de la invención ocasionados por la fijación del ADP proporcionan información directa sobre la concentración de ADP de la muestra a estudiar. Para la inmensa mayoría de aplicaciones o realizaciones de la invención, se detectarán cambios conformacionales para una población de moléculas fijadoras de ADP de acuerdo con la invención. En términos prácticos, esto significa que a la muestra a estudiar se le añadirá un determinada cantidad de la molécula fijadora de ADP de la invención. Entonces se monitorizará la fluorescencia de esta población de moléculas fijadoras de ADP de la invención. Así pues, los cambios de la fluorescencia de estas moléculas representan una indicación del estado de fijación del ADP de una proporción o de una población de estas moléculas presentes en la muestra.

45 Por lo tanto, se entenderá claramente que el nivel de fluorescencia varía directamente con la cantidad de fijación de ADP a las moléculas fijadoras de ADP de la invención. Por consiguiente, esto dará el efecto de una concentración variable casi continua de fluorescencia según el nivel de fijación de ADP (y, por consiguiente, de la concentración de ADP) dentro de la muestra. En un extremo, no habrá ninguna fijación de ADP a ninguna de las moléculas fijadoras de ADP de la invención. En el otro extremo, todas las moléculas fijadoras de ADP de la invención presentes en la muestra se fijarán al ADP de tal forma que haya saturación y una fijación completa (o casi completa) y, por lo tanto, una señal del 100%. Así pues, entre estos dos extremos, el nivel de fluorescencia concreto se correlaciona directamente con una concentración particular de ADP en la muestra. Así pues, en algunas realizaciones de la invención se puede construir una curva estándar midiendo la fluorescencia de una cantidad constante de la molécula fijadora de ADP de la invención en presencia de concentraciones de ADP diferentes y conocidas. A continuación, esta curva estándar puede utilizarse para extraer o convertir los valores de fluorescencia medidos en concentraciones absolutas de ADP presentes en una muestra.

55

En otra realización, la lectura de la invención se puede calibrar ventajosamente mediante la inclusión de muestras que tienen concentraciones de ADP conocidas en el análisis que se está llevando a cabo. En estas realizaciones, las muestras que contienen concentraciones conocidas de ADP se pueden considerar como «controles internos». Esto

permite la estimación exacta de las concentraciones de ADP en contextos experimentales donde la referencia a una curva estándar es menos apropiada, por ejemplo, en mezclas de reacción complejas en las que otros componentes podrían perturbar las lecturas, o podrían no estar presentes durante la construcción de una curva estándar, lo que hace que tales comparaciones sean potencialmente inapropiadas.

5 Definiciones

La terminología «comprende» (comprender, que comprende) se debe entender que tiene su significado normal en la técnica, a saber, que el rasgo o grupo de rasgos mencionado está incluido, pero que la terminología no excluye que también estén presentes algún otro rasgo o grupo de rasgos mencionado.

10 MDCC-PBP se utiliza para referirse al mutante A197C de la proteína fijadora de fosfato de *E. coli* marcada con MDCC.

6-ATR-ParM se utiliza para referirse a un aducto de ParM con dos moléculas de 6-IATR.

Una molécula fijadora de ADP es una molécula capaz de fijarse al ADP. El uso de la terminología molécula fijadora de ADP no implica ni requiere que el ADP esté presente. Molécula fijadora de ADP significa que la molécula es capaz de fijarse al ADP.

15 Otras aplicaciones

Será evidente para el lector experto que el objetivo principal de la invención se encuentra en la monitorización o medición de la concentración de ADP. Esto se puede aplicar ventajosamente en el contexto de determinar la concentración de ADP en muestras estables o estáticas. Alternativamente, debido al modo de medición fluorescente de respuesta rápida en las realizaciones preferentes de la invención, las moléculas detectoras pueden utilizarse para seguir los cambios de la concentración de ADP de forma dinámica en tiempo real. Así pues, otras aplicaciones de la invención pueden basarse en este modo de medición. Por ejemplo, es posible aplicar la invención a la monitorización del agotamiento del ADP. Con más frecuencia, y más convenientemente, la invención se aplica para monitorizar incrementos de la concentración de ADP.

Es una ventaja particular de la invención que se pueda utilizar para interrogar o monitorizar directamente los procesos químicos o biológicos que afectan a la concentración del ADP. Por ejemplo, muchas enzimas biológicas utilizan ATP y producen ADP como un producto secundario a medida que la reacción progresa. Un ejemplo de tal sistema es el estudio de la acción de las helicasas. Muchas helicasas consumen ATP a medida que avanzan por el ácido nucleico sobre el cual están actuando. Este consumo de ATP conduce a una liberación de ADP y, por consiguiente, el progreso de la reacción de las helicasas se puede monitorizar mediante el estudio de la concentración del ADP liberado. Lo mismo valdría para muchas otras enzimas de este tipo general, entre ellas, las topoisomerasas y similares.

Una aplicación clave de la invención se encuentra en la monitorización de determinados procesos biológicos o químicos que consumen ATP, pero que no liberan fosfato inorgánico (Pi). La mayoría de los sistemas de la técnica anterior para monitorizar el progreso de tales procesos utilizan la liberación de fosfato inorgánico como el parámetro a valorar. Sin embargo, tal estrategia tiene limitaciones importantes. Muchas reacciones que consumen ATP no conducen a la liberación de fosfato inorgánico. Por consiguiente, la presente invención encuentra aplicación en un abanico de procesos biológicos o químicos que no se pueden estudiar mediante las técnicas convencionales existentes de monitorización del fosfato. Un ejemplo importante de tal clase de reacción es una reacción de las cinasas. Las cinasas consumen ATP en el transcurso de su acción catalítica. Sin embargo, una enzima cinasa no libera fosfato inorgánico durante la reacción, sino que más bien incorpora el fosfato en su diana o sustrato. Sin embargo, las reacciones de las cinasas producen típicamente ADP como subproducto de la catálisis del ATP. Por lo tanto, la invención encuentra una aplicación particular en la monitorización de las reacciones de las cinasas.

La invención encuentra aplicación en la monitorización de la concentración de ADP en los escrutinios de alto rendimiento.

45 La invención también se refiere al uso de ParM, o de un polipéptido basado en, o derivado de, ParM, como molécula fijadora de ADP. En particular, la invención se refiere al uso de ParM en la fabricación de una molécula fijadora de ADP, tal como una molécula detectora de ADP. La invención también se refiere al uso de ParM en la determinación de la concentración de ADP.

50 En otro aspecto, la invención se refiere al desarrollo de la actina bacteriana, ParM, como un biosensor sin reactivos para la determinación fluorescente del ADP con una elevada resolución temporal.

En otros aspectos, la invención encuentra aplicación en la monitorización de ensayos tales como las helicasas del ADN, las ATPasas tal como las que intervienen en el ensamblaje de agrupamientos Fe-S, las proteína cinasas, las hexocinasas o cualquier otro ensayo en el cual la concentración de ADP puede cambiar y, por consiguiente, puede ser útil leerlo con un detector de acuerdo con la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Espectros de fluorescencia de los mutantes de ParM marcados con MDCC.

Los espectros de emisión y excitación de MDCC-ParM (I27C/C287A) a 1 μM (líneas continuas) y de MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) a 1 μM (líneas discontinuas) se anotaron en ausencia de ADP (intensidad más baja) y en presencia de ADP a 100 μM (intensidad alta). Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 431 nm y 474 nm, respectivamente, con una ranura de 5 nm de ancho. Los espectros se midieron en tampón de Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM y MgCl₂ a 3 mM, a 20 °C.

Figura 2: Espectros de fluorescencia y de absorbancia de ParM marcada doblemente con rodamina.

(a) Espectros de emisión y de excitación de la fluorescencia de la 6-ATR-ParM (D63C/D224C/C287A) sola y en presencia de ADP a 5 mM. Se anotaron los espectros a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 553 nm y 578 nm, respectivamente, con una ranura de 5 nm de ancho. (b) Espectro de absorbancia de la 6-ATR-ParM (D63C/D224C/C287A) sola (línea continua) y en presencia de ADP a 0,4 mM (línea punteada) y a 5 mM (línea discontinua). Todos los espectros se midieron en tampón Tris a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM y MgCl₂ a 3 mM, a 20 °C. Los espectros muestran un punto isosbético a 536 nm.

Figura 3: Afinidad por el ADP que tienen los diferentes mutantes de ParM marcados con MDCC e IATR.

La MDCC-ParM (I27C/C287A) a 0,1 μM (cuadrados rellenos), las 5- y 6-ATR-ParM (D63C/CDD4C/C287A) (círculos rellenos y huecos, respectivamente) y la 5-ATR-ParM (D63C/K216C/C287A) (cuadrados huecos) se titularon con ADP y se anotó la intensidad de fluorescencia. La fluorescencia de la MDCC se excitó a 431 nm y se detectó a 474 nm, para las proteínas marcadas con rodamina se utilizaron las longitudes de onda de excitación y de emisión de 553 nm y 578 nm. Las curvas de fijación cuadráticas (véanse los Métodos experimentales) se ajustaron a los datos experimentales y produjeron las constantes de disociación de 0,31 μM , 80 μM , 140 μM y 4,2 μM para MDCC-ParM (I27C/C287A), 5- y 6-ATR-ParM (D63C/D224C/C287A) y 5-ATR-ParM (D63C/K216C/C287A), respectivamente. La fracción de ParM a la que se fijó el ADP se calculó a partir de las intensidades de fluorescencia. Todas las titulaciones se realizaron en tampón de Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl₂ a 3 mM y SAB a 5 μM , a 20 °C.

Figura 4: Afinidad de fijación del ADP y del ATP a los mutantes de ParM marcados con MDCC.

La MDCC-ParM (I27C/C287A) (símbolos huecos) y la MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) (símbolos rellenos), ambas a una concentración de 0,1 μM , se titularon con ADP (cuadrados) y ATP (círculos). Los datos de titulación de la MDCC-ParM (I27C/C287A) son los mismos que en la figura 3. La fluorescencia de la MDCC se excitó a 431 nm y se anotó la emisión a 474 nm. Las constantes de disociación en equilibrio se determinaron ajustando una curva de fijación cuadrática a los datos. Los valores de K_d obtenidos de los ajustes se recogen en la tabla 2. Para el gráfico, las intensidades de fluorescencia experimentales se convirtieron en la fracción de ParM fijada al nucleótido. Las titulaciones se realizaron en tampón Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl₂ a 3 mM y SAB a 5 μM , a 20 °C [excepto la MDCC-ParM (I27C/C287A), que se tituló con ADP, en la que se utilizó Tris a 30 mM].

Figura 5: Cinética de la fijación del ADP a los mutantes de MDCC-ParM.

Se midió la cinética de asociación en condiciones de pseudo-primer orden mediante la mezcla de MDCC-ParM a 0,5 μM con concentraciones crecientes de ADP en un aparato de flujo detenido (*stopped-flow* en inglés). La fluorescencia se excitó a 436 nm y la emisión se detectó a través de un filtro de corte de 455 nm. (a) Cinética temporal del cambio de fluorescencia tras la fijación del ADP a MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) a diferentes concentraciones de ADP (10, 20, 30, 40, 50 y 60 μM). Los datos se describen bien mediante curvas exponenciales simples (no se muestran), que generan las constantes de velocidad observadas, k_{obs} . (b) Gráfico secundario de la k_{obs} frente a la concentración de ADP para la MDCC-ParM (His₆/I27C/T175L/C287A) (círculos huecos), (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) (círculos rellenos) y (His₆/I27C/T174A/T175A/C287A) (triángulos). Las constantes de las velocidades de asociación obtenidas de la pendiente del análisis de regresión lineal se muestran en la tabla 3. (c) Cinética de disociación del ADP desde la MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A). El complejo formado anteriormente de MDCC-ParM y ADP (0,5 y 2 μM) se mezcló en el flujo detenido con 100 μM (trazado superior) o 200 μM (trazado inferior) del mutante ParM sin marcar. La fluorescencia se anotó como en el panel a. Las constantes de velocidad determinadas a partir de los ajustes exponenciales simples a los dos trazados son 0,20 s^{-1} y 0,19 s^{-1} . El valor obtenido del experimento con el desplazador a 200 μM se recoge como la constante de la velocidad de disociación en la tabla 3. Todas las mediciones de flujo detenido se realizaron en tampón de Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM y MgCl₂ a 3 mM, a 20 °C.

Figura 6: Respuesta fluorescente del biosensor final de cumarina en ausencia y presencia de ATP.

(a) Titulación del centro activo de MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) con ADP. Se tituló la MDCC-ParM a 20 μM con ADP y la fluorescencia se anotó como en la figura 1. Los datos se normalizaron por la intensidad de fluorescencia observada en ausencia de ADP. Se ajustó a los datos una curva de fijación cuadrática, donde la

constante de disociación se puso en el valor determinado antes y la concentración de ParM se dejó que variara. La concentración resultante de centros activos es de 19,3 μM conforme a la concentración de ParM determinada a partir de los espectros de absorbancia. (b) Comparación de la respuesta fluorescente en ausencia y presencia de ATP. Los círculos huecos muestran una parte de la curva de titulación del panel a hasta 10 μM , en el que la señal es linealmente dependiente de la concentración de ADP con una pendiente de 16,3 μM^{-1} . En un segundo experimento (círculos rellenos), la intensidad de fluorescencia de la MDCC-ParM a 20 μM se midió a diferentes proporciones de ATP/ADP, pero a una concentración de nucleótidos constante ($[\text{ATP}] + [\text{ADP}] = 10 \mu\text{M}$). Al igual que con el ADP solo, la fluorescencia muestra una dependencia lineal de la concentración de ADP, pero la pendiente de la regresión lineal, 15,1 μM^{-1} , es ligeramente más baja.

10 Figura 7: Ensayos cinéticos con MDCC-PBP

(a) Hidrólisis de ATP de la helicasa PcrA durante su movimiento a lo largo de ADN monocatenario (ADNmc). El ADP que genera PcrA cuando se desplaza a lo largo de ADNmc se monitorizó con MDCC-ParM, el detector de ADP. Se preincubaron MDCC-ParM a 10 μM , dT_{16} a 3,8 μM y PcrA a 1 nM, 2 nM o nada en la cubeta y se comenzó la reacción con la adición de ATP a 5 μM . Se excitó la fluorescencia de la MDCC a 431 nm y se detectó la emisión a 474 nm. El ensayo se calibró midiendo la intensidad de la fluorescencia de MDCC-ParM a una concentración constante de nucleótidos (ATP + ADP) de 5 μM y un contenido de ADP creciente, como se muestra en la figura 6b. La velocidad inicial se determinó mediante la regresión lineal por los puntos de datos por debajo del 10% de gasto del ATP, lo que dio lugar a velocidades de 10,4 y 19,9 nM s^{-1} para la PcrA a 1 nM y 2 nM, respectivamente. En ausencia de PcrA se obtiene una velocidad de 0,633 nM s^{-1} . El experimento se llevó a cabo en tampón de Tris a 50 mM, pH 7,4, NaCl a 150 mM y MgCl_2 a 3 mM, a 20 °C. (b) Fosforilación de Rv1827 por la proteína cinasa PknB. La cinética temporal de la generación de ADP durante la fosforilación de Rv1827 por PknB. Las cinéticas se midieron con PknB a 0,2 μM , ATP a 40 μM , MDCC-ParM a 10 μM y diferentes concentraciones del sustrato Rv1827 en tampón de Tris a 30 mM, pH 7,5, NaCl a 150 mM, MgCl_2 a 3 mM y DTT a 2 mM, a 20 °C. La fluorescencia de MDCC se monitorizó como antes. La calibración se realizó de manera análoga a la figura 6 con una concentración total de nucleótidos de 40 μM y una concentración de ADP creciente hasta 5 μM . Las líneas continuas muestran los ajustes lineales para determinar la velocidad inicial. Se realizó una medición de control sin el sustrato Rv1827 y las velocidades iniciales se corrigieron por esta actividad de fondo. (c) Dependencia de la velocidad inicial respecto a la concentración de Rv1827. Los datos se analizaron según la ecuación de Michaelis-Menten, que produce $K_m = 22 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 1,2 \mu\text{M min}^{-1}$.

30 Figura 8: Desarrollo del detector de ADP basado en la MDCC-ParM.

A: Espectros de excitación y de emisión de fluorescencia de MDCC-ParM (I27C/C287A) a 1 μM (líneas discontinuas) y MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A) a 1 μM (líneas continuas) en ausencia de ADP (intensidad más baja) y en presencia de ADP a 200 μM (intensidad alta). Se anotaron los espectros a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 436 nm y 474 nm, respectivamente, con una ranura a 5 nm de ancho. B: Titulación de la MDCC-ParM (I27C/C287A) (símbolos rellenos) y de la MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A) (símbolos huecos), ambas una concentración de 0,1 μM , con ADP (círculos) y ATP (triángulos). Los datos se analizaron con una curva de fijación cuadrática (ecuación 1 en Procedimientos experimentales). Las constantes de disociación obtenidas de estos ajustes se muestran en la tabla Z. C: Titulaciones de centros activos de MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A) a 5 μM (cuadrados), 10 μM (círculos) y 20 μM (triángulos) con ADP. El ajuste de la curva se realizó como en B, pero la K_d estaba fija en el valor obtenido en B y solo se dejó que variara la concentración de ParM. Los resultados de las concentraciones de centros activos fueron de 4,5 μM , 9,7 μM y 19,8 μM . D: Comparación de la respuesta fluorescente en ausencia y presencia de ATP. Se tituló con ADP la MDCC-ParM a 10 μM sola (triángulos) y la MDCC-ParM más ATP a 20 μM (cuadrados) o ATP a 40 μM (círculos). En los dos últimos experimentos, la concentración total de nucleótidos $[\text{ADP}] + [\text{ATP}]$ se mantuvo constante a 20 μM o 40 μM , y solo se cambió la proporción de ADP. La respuesta fluorescente es lineal, y la pendiente fue de 0,305, 0,283 y 0,252 μM^{-1} a 0, 20 y 40 μM de ATP, respectivamente.

Figura 9: Cinética de asociación y de disociación del ADP con MDCC-ParM

A: Se midió la cinética de asociación en condiciones de pseudo-primer orden con la mezcla de MDCC-ParM con el ADP en un aparato de flujo detenido. Las cinéticas temporales del cambio de la fluorescencia tras la fijación del ADP a la MDCC-ParM a 0,25 μM se muestran a diferentes concentraciones de ADP (20, 30, 40, 50, 60 y 80 μM). Las cinéticas temporales mostradas son el promedio de tres trazados de flujo detenido independientes. Los datos se describen bien mediante curvas exponenciales simples que producen las constantes de velocidad observada, k_{obs} . Inserto: gráfico secundario de las constantes de la velocidad observada frente a la concentración de ADP. La constante de la velocidad de asociación, $0,65 \pm 0,01 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, se obtuvo de la pendiente de un análisis de regresión lineal. B, Cinética de disociación del ADP desde MDCC-ParM. El complejo de MDCC-ParM y ADP (0,5 y 2 μM) formado previamente se mezcló en el flujo detenido con 100 μM (trazado superior) o 200 μM (trazado inferior) del mutante ParM sin marcar. Se promediaron tres trazados independientes para obtener las cinéticas temporales mostradas. Las constantes de velocidad determinadas de los ajustes exponenciales simples a los datos experimentales con desplazador a 100 μM y 200 μM son $0,20 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ y $0,18 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

Figura 10: Hidrólisis del ATP por la helicasa PcrA durante su movimiento a lo largo de ADN monocatenario.

El ADP que genera la PcrA cuando se mueve por el ADNmc se monitorizó con el detector de ADP MDCC-ParM. En la cubeta se incubaron previamente MDCC-ParM a 5 μM , dT₂₀ a 0,5 μM y diferentes concentraciones de ATP. y se comenzó la reacción mediante la adición de PcrA a 2 nM. Las concentraciones de ADP se calcularon a partir de la señal de fluorescencia mediante el procedimiento de calibración descrito en el texto. Las cinéticas temporales de la generación de ADP a diferentes concentraciones de ATP (desde abajo arriba 0, 0,3, 0,45, 0,6, 1, 1,5, 2, 3, 4,5, 8 y 15 μM) se encuentran en el inserto. Las velocidades iniciales se determinaron mediante regresión lineal de puntos de datos por debajo del 10% de gasto del ATP y se representaron gráficamente frente a la concentración de ATP. Los parámetros K_m de 1,6 μM y k_{cat} de 13,7 s^{-1} , se obtuvieron de un ajuste de curva de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten.

Figura 11: Fosforilación de Rv1827 por la proteína cinasa PknB.

La fosforilación de Rv1827 por la proteína cinasa PknB se midió con el biosensor MDCC-ParM para monitorizar la cinética de la generación de ADP. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe para el ensayo para la helicasa con PknB a 50 nM, MDCC-ParM a 10 μM y ATP a 40 μM o Rv1827 a 300 μM constantes, variando la concentración del segundo sustrato Rv1827 o ATP. A: Gráfico de las velocidades iniciales frente a la concentración de Rv1827. Los datos se analizaron de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten, lo que produjo una K_m para el Rv1827 de 20 μM y una k_{cat} de 4,7 min^{-1} . Inserto: cinéticas temporales de la generación de ADP durante la fosforilación de Rv1827 mediante PknB medida a diferentes concentraciones de Rv1827, el sustrato proteico (de abajo arriba 0, 2, 4, 6, 8, 13, 20, 30, 50, 75, 180 y 300 μM). B: Gráfico de velocidades iniciales frente a la concentración de ATP. El ajuste de la curva da lugar a los parámetros de Michaelis-Menten de K_m para el ATP de 7,5 μM y la k_{cat} de 4,9 min^{-1} . Inserto: cinéticas temporales de la generación de ADP medida a diferentes concentraciones de ATP (de abajo arriba 0, 0,3, 0,6, 1,2, 1,8, 2,5, 3,5, 5, 7,5, 15, 30 y 40 μM).

Figura 12: Liberación de fosfato y de ADP durante un solo recambio de hidrólisis de ATP mediante SufBC.

La liberación de fosfato (círculos) y la liberación de ADP (triángulos) se midieron con los biosensores MDCC-PBP y MDCC-ParM, respectivamente. En un aparato de flujo detenido se mezclaron SufBC a 13 μM y bien MDCC-PBP a 20 μM o bien MDCC-ParM a 80 μM con ATP a 4 μM , y se anotó la fluorescencia. Los datos representan los promedios de tres trazados de flujo detenido independientes. La curva exponencial simple que se ajusta a los datos de liberación de fosfato (línea continua) da una constante de velocidad de $0,066 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$. Los datos de liberación de ADP se analizaron con una función exponencial doble (línea continua), suponiendo una secuencia de reacción en dos etapas irreversibles, en donde el ADP se libera en la segunda etapa. Esto da lugar a las constantes de velocidad de primer orden de las dos etapas, $0,058 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ y $0,050 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$.

Figura 13: Formación de filamentos de los mutantes de ParM marcados con MDCC.

La polimerización de ParM se monitorizó mediante la dispersión de luz en ángulo recto a 340 nm en un espectrofluorímetro. A: Cambio de la dispersión de luz observado en las soluciones de MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) a 10, 20, 30 y 40 μM después de añadir ATP a 4 mM (líneas continuas) o ADP a 4 mM (línea discontinua). A partir de la intensidad de dispersión máxima a diferentes concentraciones de ParM se determinó que la concentración crítica en presencia de ATP era de 2,5 μM . B: Comparación del comportamiento de polimerización de MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) a 40 μM (línea continua) con MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A) a 40 μM (línea punteada) o 120 μM (línea discontinua) después de añadir ATP a 4 mM. La mutación K33A adicional bloquea con eficacia la formación de filamentos. Los ensayos de dispersión de luz se llevaron a cabo en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM y MgCl₂ a 3 mM, a 20 °C.

Figura 14: Espectros de absorbancia y de fluorescencia de los mutantes de ParM marcados con rodamina.

(A, B) Espectros de absorbancia de ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) marcada con 6-IATR (A) y 5-IATR (B) sola (línea continua) y en presencia de ADP (línea punteada) a 40 μM (A) o a 30 μM (B), y ADP a 4 mM (línea discontinua). Los espectros muestran puntos isosbéticos a 536 nm (A) y 532 nm (B). Los espectros del mutante original de ParM (D63C/D224C/C287A) marcado con IATR son virtualmente idénticos a los mostrados. (C) Espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia de ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) marcado con 5-IATR (líneas continuas) y de ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) a 1 μM (líneas discontinuas) en ausencia de ADP (intensidad más baja) y en presencia de ADP a 4 mM (intensidad más alta). Los espectros se anotaron a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 553 nm y 578 nm. Los espectros se normalizaron dividiendo las intensidades medidas por la fluorescencia máxima en ausencia de ADP. Los espectros de fluorescencia de los mutantes de ParM marcados con 6-IATR tienen esencialmente la misma forma que los espectros de ParM marcados con 5-IATR que se muestran. Los espectros de absorbancia y de fluorescencia se midieron en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM y MgCl₂ a 3 mM, a 20 °C.

Figura 15: Afinidad de fijación por el ADP y por el ATP.

La ParM (D63C/D224C/C287A) marcada con 6-IATR (símbolos huecos) y la ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) (símbolos rellenos), ambas a una concentración de 0,1 μM , se titularon con ADP (círculos) y ATP (cuadrados). La fluorescencia de la rodamina se excitó a 553 nm y la emisión se anotó a 578 nm. Las constantes de disociación en equilibrio se determinaron con el ajuste de una curva de fijación cuadrática a los datos y se recogen en la tabla Y. Para el gráfico, las intensidades de fluorescencia experimentales se normalizaron por el cambio máximo de fluorescencia obtenido en saturación con ADP. Las titulaciones se realizaron en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl₂ a 3 mM y SAB a 5 μM , a 20 °C.

Figura 16: Cinética de fijación del ADP a los mutantes de ParM marcados con rodamina.

(A) Las cinéticas temporales del cambio de fluorescencia después de mezclar 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) con un exceso de ADP en el flujo detenido. La concentración final de 5-ATR-ParM fue de 0,1 μM y las concentraciones de ADP en micromolar se indican en el gráfico. Los datos mostrados son promedios de tres trazados de flujo detenido independientes. Los trazados de fluorescencia se describen bien mediante curvas exponenciales simples, lo que produce las constantes de velocidad observada k_{obs} . (B) Gráfico de las constantes de velocidad observada frente a la concentración de ADP para la 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) sin la mutación K33A (círculos rellenos) y con ella (círculos huecos). Las constantes de la velocidad de asociación y de disociación obtenidas de la pendiente y el corte del análisis de regresión lineal se resumen en la tabla Y. Todos los experimentos se llevaron a cabo con Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl 25 mM, MgCl₂ a 3 mM y SAB a 5 μM , a 20 °C.

Figura 17: Formación de filamentos de mutantes de ParM con rodamina.

La formación de filamentos de ParM se midió en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, y MgCl₂ a 3 mM, a 20 °C, mediante la dispersión de luz en ángulo recto a 340 nm. (A) Cambio de la dispersión de luz de una solución a 20 μM de 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) después de la adición de ATP a 4 mM, ADP a 4 mM o tampón sólo como se indica en la figura. Los datos también se muestran para la 5-ATR-ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) a 20 μM después de la adición de ATP a 4 mM, lo que indica que la mutación K33A bloquea con eficacia la formación de filamentos. (B) Gráfico de la intensidad de dispersión máxima observada en presencia de ATP a 4 mM frente a la concentración de 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) (círculos huecos), 6-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) (cuadrados huecos) y la ParM de tipo silvestre (círculos rellenos). La extrapolación lineal corta el eje x y produce las concentraciones críticas 0,8 μM , 14 μM y 2,5 μM , respectivamente.

Figura 18: Ensayo en equilibrio estacionario de la actividad hexocinasa mediante un biosensor de ADP, la ParM con rodamina.

La fosforilación de la D(+)-glucosa mediante la hexocinasa se midió monitorizando la generación de ADP con el biosensor fluorescente 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A). Las mediciones se llevaron a cabo con hexocinasa a 0,02 unidades/ml y 5-ATR-ParM a 0,5 μM en Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl₂ a 10 mM y SAB a 5 μM , a 20 °C. (A) Calibración de la señal de fluorescencia. Se tituló la 5-ATR-ParM a 0,5 μM con ADP en ausencia (círculos huecos) y en presencia de ATP a 1 mM. En el margen de concentraciones de ADP que llega a 30 μM , la señal de fluorescencia es casi lineal en función de la concentración de ADP. Las pendientes del análisis de regresión lineal de los datos con ATP a 0 y 1 mM son 2,9 μM^{-1} y 2,6 μM^{-1} , respectivamente. La pendiente en presencia de ATP se utilizó para la calibración del ensayo. El inserto muestra las curvas de titulación completas a una escala logarítmica, y las constantes de disociación en estas condiciones fueron 86 μM y 95 μM . (B) Cinéticas temporales de la generación del ADP tras la fosforilación de la D-glucosa a 2 mM por la hexocinasa a concentraciones de ATP de 0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,07, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 mM (desde abajo arriba). Las líneas continuas muestran los ajustes lineales que producen las velocidades iniciales. (C) Gráfico de las velocidades iniciales frente a la concentración de ATP. El ajuste de la curva de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten da lugar a los parámetros K_m de 80 μM y V_{max} de 20 $\mu\text{M min}^{-1}$. (D) Gráfico de las velocidades iniciales frente a la concentración de D-glucosa. Los datos se midieron con ATP a 1 mM constante. Los parámetros de Michaelis-Menten para la curva ajustada son K_m de 170 μM y V_{max} de 23 $\mu\text{M min}^{-1}$.

Secuencias (véase la lista de secuencias WIPO ST.25 acompañante)

SEQ ID n.º 1: Secuencia de referencia de ParM

Tipo silvestre de ParM:

Número de acceso P11904

La secuencia completa comprende los restos 1 a 320

1 mlvfiddgst niklqwqesd gtikqhispn sfkrewavsf gdkkvfnytl ngeqysfdpi
 61 spdavvttni awqysdvnv avhhalltsg lpvsevdivc tlpkteyydr nngpntenie
 121 rkkanfrkki tlnggdfti kdvkmpesi payevlqel deldslliid lggttldisq
 181 vmgklsgisk iygdsslgs lvtstavkdal slartkgssy laddiihrk dnylkqrin
 241 denkisivte amnealrkle qrvlntlnef sgythvmvig ggaeliadav kkhtqirder
 301 ffktnnsqyd lvngmylign

SEQ ID n.º 2

MDCC-ParM

ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) (variante para la marcación con MDCC)

1 mlvfiddgst niklqwqesd gtikqhcsn sfkrewavsf gdkkvfnytl ngeqysfdpi
 61 spdavvttni awqysdvnv avhhalltsg lpvsevdivc tlpkteyydr nngpntenie
 121 rkkanfrkki tlnggdfti kdvkmpesi payevlqel deldslliid lgganldisq
 181 vmgklsgisk iygdsslgs lvtstavkdal slartkgssy laddiihrk dnylkqrin
 241 denkisivte amnealrkle qrvlntlnef sgythvmvig ggaeliadav kkhtqirder
 301 ffktnnsqyd lvngmylign qsgshhhhhh

5

SEQ ID n.º 3

6-ATR-ParM

ParM (D63C/D224C/C287A) (variante 1 para la doble marcación con rodamina)

1 mlvfiddgst niklqwqesd gtikqhispn sfkrewavsf gdkkvfnytl ngeqysfdpi
 61 spcavvttni awqysdvnv avhhalltsg lpvsevdivc tlpkteyydr nngpntenie
 121 rkkanfrkki tlnggdfti kdvkmpesi payevlqel deldslliid lggttldisq
 181 vmgklsgisk iygdsslgs lvtstavkdal slartkgssy laddiihrk dnylkqrin
 241 denkisivte amnealrkle qrvlntlnef sgythvmvig ggaeliadav kkhtqirder
 301 ffktnnsqyd lvngmylign

10 SEQ ID n.º 4

ParM (D63C/K216C/C287A) (variante 2 para la doble marcación con rodamina)

1 mlvfiddgst niklqwqesd gtikqhispn sfkrewavsf gdkkvfnytl ngeqysfdpi
 61 spcavvttni awqysdvnv avhhalltsg lpvsevdivc tlpkteyydr nngpntenie
 121 rkkanfrkki tlnggdfti kdvkmpesi payevlqel deldslliid lgganldisq
 181 vmgklsgisk iygdsslgs lvtstavkdal slartcgssy laddiihrk dnylkqrin
 241 denkisivte amnealrkle qrvlntlnef sgythvmvig ggaeliadav kkhtqirder
 301 ffktnnsqyd lvngmylign

SEQ ID n.º 5: variante de ParM preferente para la marcación con MDCC (con K33A)

ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A)

1 mlvfiddgst niklqwqesd gtikqhcsn sfkrewavsf gdkkvfnytl ngeqysfdpi
 61 spdavvttni awqysdvnv avhhalltsg lpvsevdivc tlpkteyydr nngpntenie
 121 rkkanfrkki tlnggdfti kdvkmpesi payevlqel deldslliid lgganldisq
 181 vmgklsgisk iygdsslgs lvtstavkdal slartkgssy laddiihrk dnylkqrin
 241 denkisivte amnealrkle qrvlntlnef sgythvmvig ggaeliadav kkhtqirder
 301 ffktnnsqyd lvngmylign qsgshhhhhh

15

SEQ ID n.º 6: variante de ParM preferente para la doble marcación con rodamina (K33 silvestre)

ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A)

1 mlvfiddgst niklqwqesd gtikqhispn sfkrewavsf gdkkvfnytl ngeqysfdpi
 61 spcavvttni awqysdvnv avhhalltsg lpvsevdivc tlpkteyydr nngpntenie
 121 rkkanfrkki tlnggdfti kdvkmpesi payevlqel deldslliid lgganldisq
 181 vmgklsgisk iygdsslgs lvtstavkdal slartkgssy laddiihrk dnylkqrin
 241 denkisivte amnealrkle qrvlntlnef sgythvmvig ggaeliadav kkhtqirder
 301 ffktnnsqyd lvngmylign qsgshhhhhh

20 SEQ ID n.º 7: variante de ParM preferente para la doble marcación con rodamina con K33A.

ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A)

```

1  mlvfiddgst nklqwqesd gtikqhispn sfarewavsf gdkkvfnytl ngeqysfdpi
61  spcavvttni awqysdvnvv avhhalltsg lpvsevdivc tlpkteyydr nngpntenie
121 rkkkanfrkki tlnggdfti kdvkvmpesi payeyvlqel deldslliid lgganldisq
181 vmgklsqisk iygdsslqvs lvtstavkdal slartkgssy ladciihrk dnyylkqrin
241 denkisivte amnealrkle qrvlntlnef sgythvmvig ggaeliadav kkhtqirder
301 ffktnnsqyd lvngmylign qsgshhhhhh

```

A continuación, la invención se describe mediante ejemplos. Estos ejemplos pretenden ser ilustrativos, y no se pretende que limiten las reivindicaciones anexas.

Ejemplos

5 Métodos generales:

Plásmidos

El plásmido pJSC1 para la síntesis recombinante de ParM de tipo silvestre lo proporcionó J. Löwe (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K.) (Salje, *Embo*, 2008). Se introdujeron mutaciones puntuales en ParM mediante mutagénesis específica de sitio con QuickChange (Stratagene) y con pJSC1 de plantilla. Las variantes de ParM con una etiqueta His₆ en el extremo carboxilo se construyeron mediante la mutagénesis específica de sitio con los oligonucleótidos 5'-GTATCTCATAGGTAATCAATCAGGATCCCATCATCATCA⁺TCATG-3' y 5'-GATGATGGGATCCTGATTGATTACCTATGAGATACATACCG-3'. La PCR mutagénica cambia los dos codones de parada después del gen de ParM en el pJSC1 por los codones Gln y Gly, seguido de una delección de una base, por lo que se expresa la etiqueta His₆ codificada por el vector. La construcción del polipéptido ParM (His₆) que es la molécula fijadora de ADP preferente contiene la extensión de 10 aminoácidos QSGSHHHHHH en el extremo carboxilo.

Expresión y purificación de la proteína

Variantes de ParM se sintetizaron en células de *E. coli* BL21-AI (Invitrogen). Se hicieron crecer cultivos de expresión de ParM a partir de células BL21-AI recién transformadas en medio TY a 2X que contiene ampicilina a 100 µg/ml. Se inocularon 3 ml de medio con células de la placa agar y se incubó a 37 °C durante 3 horas. Los cultivos se diluyeron a 25 ml con medio nuevo y las células se hicieron crecer a 37 °C otras 2-3 horas (DO⁶⁰⁰ = 1,2 a 1,4). Para el cultivo principal, se inocularon 500 ml de medio a 1 o 2X con 10 ml del cultivo inicial. Las células se hicieron crecer a 30 °C hasta que la DO⁶⁰⁰ había alcanzado entre 0,4 y 0,6, y entonces se indujo la sobreexpresión mediante la adición de arabinosa al 0,002%. Las células se recogieron 16 horas después de la inducción, se resuspendieron en el tampón de lisis (Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl₂ a 1 mM, y Triton X-100 al 0,1%) y se conservaron a -80 °C. Para las variantes de ParM sin la etiqueta His₆ se incluyó DTT a 1 mM en el tampón de lisis.

Las variantes de ParM sin la etiqueta His₆ se purificaron como está descrito (van den Ent et al., 2002) con la modificación siguiente: la cromatografía final de exclusión por tamaños se realizó en una columna HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM y EDTA a 1 mM. Este procedimiento retira completamente el DTT y el nucleótido presente en la etapa de polimerización anterior. Las proteínas se concentraron en un concentrador por centrifugación Vivaspin 20 con membrana PES (Vivascience) hasta 30-100 mg/ml. La concentración de ParM se determinó mediante la absorbancia a 280 nm con el coeficiente de extinción 34 380 M⁻¹ cm⁻¹ calculado a partir de la secuencia primaria (Pace et al, 1995). Las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

Los mutantes de ParM (His₆) se purificaron mediante cromatografía de Ni-quelato: los extractos de células transparentes se complementaron con NaCl a 500 mM y se filtraron a través de un filtro con jeringa de 0,45 µm (Satorius). El lisado se cargó en una columna HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada con el tampón A (Tris-HCl a 30 mM, pH 8,0, NaCl a 500 mM). Se lavó la columna con el tampón A hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzó el nivel basal, y después se pasaron 10 volúmenes de columna de tampón B (Tris-HCl a 30 mM, pH 8,0, y KCl a 25 mM). La ParM se eluyó con un gradiente lineal de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón B sobre 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían la ParM se agruparon y se les añadió DTT a 10 mM. Las soluciones de proteínas se concentraron con un concentrador por centrifugación Vivaspin 20 (Vivascience) antes de cargarlas en una columna de filtración en gel. Se realizó la cromatografía de exclusión por tamaños como se describe más arriba.

45 Marcación de los mutantes de ParM

Para escrutar un cambio de fluorescencia tras la fijación del ADP, se realizó la marcación en una escala de 2-3 mg de ParM. Los mutantes de ParM (100-150 µM) y un exceso de fluoróforo por cisteínas de 2 veces (maleimidias) o 4 veces (yodacetamidias) se incubaron en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM y EDTA a 1 mM, y se mezclaron en un tambor vertical a 22 °C. Después de 45 min (maleimidias) o 90 minutos (yodacetamidias), se añadió MESNA a 2 mM y las soluciones se incubaron otros 15 minutos. Las mezclas de reacción se centrifugaron (15 000 g, 10 min, 4 °C) y entonces se filtró el sobrenadante a través de un filtro Acrodisc de 0,2 µm (Pall Corporation). Se retiró el

fluoróforo libre mediante dos columnas PD10 sucesivas (GE Healthcare) con el mismo tampón que para la marcación.

5 La ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) se marcó con MDCC a una escala superior (120 mg de ParM). Las reacciones de marcación contenían ParM a 150 μM y MDCC a 250 μM en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5. La mezcla de
 10 reacción se incubó durante 35 min, y se mezclaron en un tambor vertical a 22 °C. Se añadió MESNA y se continuó incubando durante 15 min. Se filtró la solución a través de un filtro Acrodisc de 0,2 μm (Pall Corporation) y se cargó en una columna HiTrap Q de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada con Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5. La columna se lavó con el mismo tampón hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzó el nivel basal. Se aplicó un gradiente lineal de KCl de 0 a 400 mM sobre 40 volúmenes de columna. El pico principal de ParM marcada, que eluía en KCl a aproximadamente 130 mM, se agrupó y la MDCC-ParM se concentró como se describe más arriba. La concentración de la ParM marcada se determinó con los coeficientes de extinción para MDCC unido a ditiotreitol, $\epsilon_{430} = 46\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280} = 7470\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Brune et al., 1994) y el coeficiente de extinción de ParM dado más arriba.

Nucleótidos

15 El ADP y el ATP se compraron a Sigma con la pureza más alta disponible. La pureza de los nucleótidos se analizó mediante HPLC con una columna Partisphere SAX, 125 x 4,5 mm (Whatman). Se realizó la separación isocrática de los nucleótidos con tampón de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a 0,3 M, pH 4,0, MeOH al 25%, y se monitorizó la absorbancia a 260 nm. El ATP comprado, que se utilizó para los ensayos de la cinasa y de la helicasa, contenía ADP entre el 0,6 y el 0,8%.
 20 Para la determinación de la afinidad del ATP por los mutantes de ParM marcados, el ATP se purificó adicionalmente en una columna de DEAE-celulosa con un gradiente lineal de tampón de bicarbonato de trietilamonio de 10 mM a 600 mM, pH 7,4 sobre 20 volúmenes de columna. Este procedimiento produjo ATP que contenía ADP entre el 0,02 y el 0,03%.

Mediciones de la fluorescencia

25 Los espectros de la fluorescencia, las titulaciones y la actividad en equilibrio estacionario de PcrA y PknB se midieron con un espectrofotómetro de fluorescencia Carry Eclipse (Varian). Las condiciones del ensayo se ofrecen en las correspondientes leyendas de las figuras. Los datos de titulación se analizaron con una curva de fijación cuadrática,

$$F = F_{\min} - (F_{\max} - F_{\min}) \frac{K_d + [P] + [L] - \sqrt{(K_d + [P] + [L])^2 - 4[P][L]}}{2[P]}$$

30 donde [P] y [L] son las concentraciones totales de la proteína y del ligando, respectivamente, K_d es la constante de disociación y F_{\min} y F_{\max} son las intensidades de fluorescencia de la proteína libre y la fijada al ligando.

La dinámica de la fijación del ADP a los mutantes de ParM marcados con MDCC se midió con un instrumento de flujo detenido HiTech SF61 DX2 equipado con una lámpara de Xe/Hg (Tgk Scientific, GB). La cinética de asociación se midió en condiciones de pseudo-primer orden con un exceso de al menos 10 veces de ADP sobre ParM. En los experimentos de desplazamiento para determinar las constantes de la velocidad de disociación, el complejo de MDCC-ParM y ADP formado con anterioridad se mezcló con un exceso de 50 a 200 veces de ParM sin marcar.

Todas las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 20 °C.

Ejemplo 1: Escrutinio de las combinaciones de mutante/fluoróforo en función de la respuesta fluorescente al ADP

40 La ParM de tipo silvestre contiene dos restos de cisteína: la C100 está oculta en un núcleo hidrófobo y probablemente inaccesible para la marcación, mientras que la C287 está expuesta al solvente y, por consiguiente, probablemente está accesible para la marcación. Como la C287 está localizada cerca del sitio de fijación del nucleótido, las sondas fluorescentes que se conecten a esta posición podrían describir la fijación del ADP. Por lo tanto, la proteína de tipo silvestre se marcó con una serie de fluoróforos diferentes y se midió el cambio de la fluorescencia durante la fijación del ADP (tabla 1).

45 Tabla 1: Cambios de la fluorescencia para una serie de mutantes de ParM marcados con diferentes fluoróforos.

El cambio de la fluorescencia se expresa como la proporción de la intensidad en presencia de ADP a 1 mM por la intensidad en ausencia de ADP.

	WT	I27C	D58C	D63C	S204C	T215C	K216C	D224C	D63C/ K216C	D63C/ D224C
MDCC	0,27	3,0	0,82	0,48	0,68	0,74	0,67	0,69		
MPrCC		1,1				0,78		0,75		
IDCC	0,34	1,5	0,93	0,53	0,80	0,74	0,76	0,67		
CPM		0,62			0,62	0,76		0,71		
5-IATR	0,74	1,3	0,83	0,80			0,80		3,2	4,4
6-IATR	0,70								1,4	9,7
Alexa 488		0,78								
Cy3		1,2								
Cy3b		0,83								
MIANS	0,50	0,72			0,91					
Acrilodan	0,59									

Los marcadores fluorescentes eran: acrilodán: 6-acriloil-2-dimetilaminonaftaleno; Alexa 488: AlexaFluor-488-maleimida; CPM: 7-dietilamino-3-[4'-(1-maleimidil)fenil]-4-metilcumarina; Cy3: Cy3-maleimida; Cy3B: Cy3B-maleimida; 5-IATR y 6-IATR: 5- y 6-yodoacetamidotetrametilrodamina; IDCC: *N*-[2-(yodoacetamido)etil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida; MDCC: *N*-[2-(1-maleimidil)etil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida; MIANS: ácido 2-(4'-maleimidil)anilino)naftaleno-6-sulfónico; MPrCC: *N*-[3-(1-maleimidil)-1-propil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida.

Para tres de las proteínas modificadas, la marcación única se confirmó mediante espectrometría de masas, que indicaba que sólo se había modificado una cisteína. Todas las proteínas mostraban una disminución de la intensidad de fluorescencia al añadir el ADP.

Para crear nuevos sitios para la marcación específica, primero se mutó a alanina la cisteína expuesta y, luego, se introdujeron nuevos restos de cisteína mediante mutagénesis específica de sitio. En el trabajo que viene a continuación, todas las proteínas ParM incluyen esta mutación C287A. Se muestran dos estrategias diferentes para generar una variante de ParM con un incremento de la fluorescencia tras la fijación del ADP.

La primera estrategia se basa en mutantes de una única cisteína para la conexión de un único fluoróforo, que experimenta un cambio en el entorno cuando se fija la molécula diana. Después del examen de la estructura de ParM y el cambio de conformación inducido por el nucleótido, se prepararon seis proteínas ParM mutantes diferentes, las cuales tenían un único resto de cisteína reactivo. Éstas estaban colocadas en la superficie de los subdominios IA, IB y IIB, donde los dos lóbulos se acercan tras el cierre de la hendidura desencadenado por el ADP. Los mutantes se marcaron con sondas diferentes y los espectros de fluorescencia se anotaron en ausencia y en presencia de ADP. Sólo la ParM (I27C) respondió al ADP con un incremento de la intensidad de fluorescencia, mientras que todos los demás mutantes mostraron una disminución de la señal (tabla 1). La respuesta más grande se obtuvo con el derivado de la cumarina, la MDCC, que dio un incremento de fluorescencia de tres veces (figura 1). Este aducto MDCC-ParM (I27C/C287A) se eligió para estudios y desarrollos posteriores.

La segunda estrategia de marcación se aprovechó de que la gran diferencia de fluorescencia de la rodamina dependía de si el fluoróforo está en estado monomérico o dimérico, como se explicó en la introducción. Para aplicar esta estrategia con ParM se generaron dos mutantes de cisteína dobles, D63C/D224C y D63C/K216C. D224 y K216 están localizados en la hélice 8 del subdominio IIB. D63 está situado en un lazo del subdominio opuesto, que se aleja de la hélice 8 tras la fijación del ADP. La consideración de las distancias entre los sitios de marcación se basó en la estructura del apilamiento de las rodaminas y en el trabajo previo de la marcación con rodamina sobre la proteína fijadora de fosfatos (30). En la conformación sin nucleótido, una pareja de rodaminas conectada en estas posiciones debe en principio ser capaz de apilarse, y esta interacción se desharía cuando la fijación del ADP induce el movimiento del dominio. La marcación de prueba de los dos mutantes dobles se realizó con dos isómeros de rodamina diferentes, 5-IATR y 6-IATR, y se investigó la respuesta de la fluorescencia a la fijación del ADP (tabla 1). La estequiometría de la marcación es 2:1, como se confirmó mediante espectrometría de masas. Las cuatro combinaciones mostraron un incremento de la fluorescencia como era esperado para la desaparición de los dímeros de rodamina. Tres combinaciones revelaron un cambio relativo >3 veces. El mayor cambio de señal (10 veces) se observó con 6-IATR y con las mutaciones D63C/D224C (figura 2). La figura 2b muestra los espectros de absorbancia de esta variante de ParM marcada en ausencia y en presencia de ADP. El espectro de la 6-IATR-ParM es indicativo de dímeros de rodamina con una absorbancia máxima a 519 nm y un hombro de alrededor de 550 nm.

La fijación del ADP ocasiona una disminución de la absorbancia a 519 nm y un incremento concomitante de la absorbancia a 553 nm.

Ejemplo 2: Afinidad de fijación del ADP

5 La sensibilidad de la detección del ADP depende en parte de la magnitud del cambio de la fluorescencia, pero con más importancia, de la afinidad por el ADP. Para determinar las constantes de disociación del ADP, se titularon con ADP las cuatro variantes de ParM con un cambio de señal de 3 veces o más (figura 3). La MDCC-ParM (I27C) presentó la afinidad más alta ($K_d = 0,31 \mu\text{M}$), lo que permite la detección de concentraciones submicromolares de ADP. En cambio, las constantes de disociación de las variantes marcadas con rodamina 5-ATR-ParM (D63C/K216C), 5-ATR- y 6-ATR-ParM (D63C/D224C) son mucho más elevadas (4,2 μM , 80 μM y 141 μM , respectivamente) y, por consiguiente, la sensibilidad (en términos de afinidad por el ADP) se reduce por la presencia de las dos rodaminas. Por supuesto, tales realizaciones con rodamina son todavía útiles dado que la conexión de dos fluoróforos podría ser deseable en algunas aplicaciones, y la presencia de los dos fluoróforos puede contribuir a una señal más fuerte a pesar de la menor afinidad por el ADP que se observó más arriba.

15 Basándose en la ventajosamente más baja afinidad por el ADP, el desarrollo posterior se centró en la MDCC-ParM (I27C) para conseguir una variante de fijación fuerte.

Ejemplo 3: mutaciones del centro activo para mejorar la selectividad por el ADP

20 Un desafío en el desarrollo de cualquier biosensor específico de ADP que esté basado en la fijación es conseguir una buena discriminación del ATP. La titulación de la MDCC-ParM (I27C) con ATP produjo una constante de disociación de 18,7 μM , 60 veces mayor que la constante de disociación del complejo con ADP. La magnitud del cambio de la fluorescencia fue similar a la obtenida con el ADP. Este resultado de fijación más débil fue sorprendente, porque la ParM de tipo silvestre se fija al análogo fluorescente etenoATP con una afinidad 60 veces más alta que al etenoADP. Sin embargo, la afinidad por el ATP de la MDCC-ParM sigue siendo demasiado alta para algunas aplicaciones: con ATP a 18 μM de sustrato, la fluorescencia sería ya la mitad de la máxima obtenible.

25 Mediante el examen de la estructura del centro activo se diseñó una estrategia de mutación que podría debilitar la fijación del ATP sin cambiar la afinidad por el ADP. Primero, el plásmido de expresión con ParM se modificó para que se expresara con una etiqueta de hexahistidina en el extremo carboxilo para simplificar la purificación. En el contexto de ParM (His₆/I27C) se generaron diez mutantes diferentes del centro activo (tabla 2).

Tabla 2: Cambio de la fluorescencia y afinidades por el ADP y por el ATP que presentan los distintos mutantes de MDCC-ParM.

30 Los datos se obtuvieron de titulaciones de fluorescencia a 20 °C que se describen en la figura 3. Las titulaciones del ATP se realizaron con ATP muy purificado que contenía sólo ADP al 0,03%. I27C sólo se refiere a MDCC-ParM (I27C/C287A). Todos los demás mutantes se basan en la MDCC-ParM (His₆/I27C/C287A) con las mutaciones adicionales mostradas en la tabla.

Mutación de ParM además de I27C	ADP		ATP		Proporción de K_d ATP/ADP
	F_{+ADP}/F_{-ADP}	K_d (μM)	F_{+ADP}/F_{-ADP}	K_d (μM)	
E148R	<1,1	n.d.	<1,1	n.d.	
T175H	3,2	0,40	3,9	0,16	0,4
T175F	2,5	4,7	2,5	137	29
S9A	3,1	2,5	2,9	98	39
S9Q	3,2	1,66	2,8	66	40
(I27C sólo)	3,0	0,31	3,1	18,7	60
T174A	2,9	0,39	3,1	64	164
T175A	3,3	0,37	3,3	62	168
T175N	3,4	0,60	3,2	184	307
T174A T175A	3,3	0,33	3,2	107	324
T175L	1,9	1,57	2,3	507	324
T174A T175N	3,4	0,57	3,1	208	365

En primer lugar, las cadenas laterales de S9, T174 y T175 forman puentes de hidrógeno con el fosfato y en la estructura de ParM-GMPPNP (21), pero ninguno de ellos se encuentra dentro de la distancia de formación del puente de hidrógeno con el difosfato (15). La retirada de sus grupos hidroxilo mediante la mutación en alanina puede, por consiguiente, debilitar selectivamente la fijación del trifosfato.

- 5 En segundo lugar, se investigó el bloqueo estérico del sitio de la fijación del fosfato y mediante la introducción de aminoácidos más voluminosos en las posiciones 9, 148 y 175.

Los mutantes de ParM se marcaron con MDCC y se les analizó su afinidad de fijación por el ADP y por el ATP (tabla 2 y figura 4). Los cuatro mejores mutantes en términos de selectividad del ADP son T175N, T175L, T174A/T175A y T174A/T175N, pues fijan el ATP unas >300 veces más débilmente que el ADP. La proporción de las constantes de disociación para el ATP y el ADP es similar para estas proteínas, pero difieren en la afinidad absoluta. Mientras que T174A/T175A conserva la afinidad por el ADP del mutante ParM I27C original, los valores de K_d se incrementan a causa de las otras tres mutaciones T175N, T174A/T175N y T175L.

Ejemplo 4: Cinética de la fijación del ADP

15 Para evaluar la idoneidad de MDCC-ParM para las mediciones en tiempo real se investigó la dinámica de la fijación del ADP a la MDCC-ParM (I27C) y cuatro mutantes de centro activo que proporcionaban la mayor discriminación del ATP (véase el ejemplo 3: sustituciones que mejoran la selectividad). Para este ejemplo, estas sustituciones mejoradoras de la selectividad se utilizan en combinación con la sustitución I27C para conectar el fluoróforo, es decir, el polipéptido de este ejemplo comprende la I27C así como las sustituciones concretas que mejoran la selectividad que se han explicado.

20 Las cinéticas de asociación se midieron en condiciones de pseudo-primer orden con un exceso de ADP. Se observó un incremento exponencial único de la fluorescencia después de mezclar la ParM y el ADP en el aparato de flujo detenido (figura 5). Las constantes de velocidad observadas muestran una dependencia lineal de la concentración de ADP hasta, al menos, ADP a 60 μM , de las cuales se extrajeron las constantes de la velocidad de asociación (figura 5b). Dado que las constantes de la velocidad de disociación son pequeñas y los valores no se pueden determinar de modo exacto a partir del corte con el eje, se midieron más directamente con los experimentos de desplazamiento (figura 5c). En la tabla 3 se resumen las constantes cinéticas para la fijación del ADP a los diferentes mutantes de ParM, así como las constantes de disociación en equilibrio que se deducen.

30 Tabla 3: Parámetros cinéticos para la asociación del ADP a diferentes mutantes de MDCC-ParM. Las constantes de las velocidades de asociación y de disociación (k_{on} y k_{off}) se midieron en experimentos de flujo detenido como se muestra en la figura 5. La constante de disociación en equilibrio K_d se calculó como $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

Mutación de ParM además de I27C	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (μM)
(I27C sólo)	0,98	0,22	0,22
T174A T175A	0,98	0,22	0,22
T175L	0,34	0,28	0,81
T175N	0,64	0,27	0,42
T174A T175N	0,63	0,19	0,30

35 Los valores de K_d que se determinaron a partir de los experimentos cinéticos son ligeramente más bajos que los de las titulaciones en equilibrio (tabla 2), pero la magnitud de la afinidad de fijación de los diferentes mutantes es la misma. La diferente afinidad por el ADP está ocasionada principalmente por las diferentes constantes de velocidad de asociación, que oscilan de 0,34 a 0,98 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, mientras que las constantes de la velocidad de disociación son más bien parecidas.

40 La MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) puede ser la mejor variante porque muestra una discriminación del ATP ligeramente mayor que los otros mutantes, y tiene un cambio de fluorescencia alto (figura 1). Por consiguiente, esta variante es la molécula fijadora de ADP más preferente de la invención, que de ahora en adelante se denominará MDCC-ParM. Para este mutante, la cinética de la fijación del ADP también se midió a concentraciones de ADP más altas. La linealidad de la constante de velocidad observada con la concentración de ADP se extiende hasta el ADP a aproximadamente 200 μM , donde es de 120 s^{-1} .

Ejemplo 5: Linealidad de la respuesta fluorescente

45 Las titulaciones del centro activo con ADP se realizaron con la MDCC-ParM a 20 μM , 35 veces por encima de la constante de disociación (figura 6a). En saturación, se obtuvo un cambio de fluorescencia de cuatro veces. El límite de sensibilidad de esta titulación da un valor de 19,3 μM para la concentración de los centros activos, lo que está en buena concordancia con la concentración de ParM determinada a partir de los espectros de absorbancia.

En muchas aplicaciones del detector, el ADP se medirá como un producto del ATP de sustrato, bien sea una ATPasa o una cinasa, y, por consiguiente, el ATP estará presente en las soluciones de ensayo. Por lo tanto, la respuesta de la fluorescencia al ADP se investigó en presencia de ATP (figura 6b) para mostrar que la invención era aplicable en este contexto.

5 La intensidad de la fluorescencia de MDCC-ParM se midió a una concentración de nucleótidos constante de 10 μM (ATP + ADP), mientras que el contenido de ADP se incrementaba. Es importante señalar que se observó un incremento lineal de la fluorescencia, igual que cuando no había ATP. La pendiente es un 7% más baja debido a que la fluorescencia inicial era más alta, lo que es esperable cuando hay algo de fijación del ATP al detector. No obstante, la solución de ATP utilizada contenía ADP al 0,6%, lo que también contribuye a que el nivel inicial sea más alto.

Así pues, se demuestra que la invención proporciona una molécula detectora de ADP robusta que funciona tanto en presencia como en ausencia de ATP.

Ejemplo 6: Ensayo de hidrólisis de ATP

15 La invención encuentra aplicación como indicador para ensayos que tienen por sustrato o producto el ADP. Si se mide la concentración del ADP de acuerdo con la presente invención, el o los ensayos pueden monitorizarse ventajosamente. En este ejemplo, el ensayo comprende la hidrólisis de ATP en equilibrio estacionario mediante la helicasa PcrA.

20 La PcrA es una helicasa de ADN de *Bacillus stearothermophilus* que interviene en la replicación de los plásmidos. Desenrolla el ADN bicatenario a medida que se desplaza por una hebra en la dirección de 3' a 5'. La PcrA también se mueve rápidamente a lo largo de oligonucleótidos monocatenarios cortos hidrolizando una molécula de ATP por par de bases desenrollada (31). En un ensayo en equilibrio estacionario se midió la velocidad de la hidrólisis proporcionada por PcrA en presencia de un oligonucleótido monocatenario corto, dT₁₆, mediante MDCC-ParM. Las cinéticas de la generación del ADP se monitorizan a dos concentraciones de PcrA diferentes (1 y 2 nM) y en ausencia de PcrA como control (figura 7). En este ensayo, la respuesta sólo es lineal al comienzo debido al agotamiento del ATP cerca de su valor de K_m . Las concentraciones de ADP se calcularon a partir de la señal de fluorescencia calibrada con la concentración de nucleótidos constante ([ATP] + [ADP]) e incrementando el contenido de ADP como se muestra en la figura 6. Las velocidades iniciales se determinaron por regresión lineal de los puntos de datos en los que se había gastado menos del 10% del ATP. En ausencia de PcrA se observó un incremento de fluorescencia muy lento, 16 veces más lento que en presencia de PcrA a 1 nM, lo que podría deberse a la lenta hidrólisis de ATP catalizada por ParM. Por consiguiente, se corrigieron las velocidades iniciales con la sustracción de la velocidad residual. La actividad hidrolítica de la PcrA en equilibrio estacionario obtenida en estas mediciones es de 6,8 s^{-1} . Para poderlo comparar, el mismo experimento se llevó a cabo con el biosensor de fosfato MDCC-PBP, que está bien caracterizado. La actividad hidrolítica de 7,2 s^{-1} confirma el resultado obtenido con el detector de ADP de la invención.

35 Ejemplo 7: Ensayo para las cinasas

Las cinasas son dianas clave en el descubrimiento de fármacos. La acción de las cinasas implica la generación de ADP a medida que se utiliza el ATP durante la fosforilación del sustrato. Por consiguiente, el ADP es un indicador de la actividad cinasa en este tipo de ensayo.

40 Se muestra que la invención se puede aplicar para la lectura de los ensayos para cinasas. En este ejemplo, la actividad en equilibrio estacionario de la proteína cinasa PknB se utiliza para ilustrar este tipo de aplicación de la invención.

45 *Mycobacterium tuberculosis* contiene once Ser/Thr cinasas diferentes (32). Tres de ellas, entre las que está PknB, son esenciales para el crecimiento de la micobacteria y, por consiguiente, han sido estudiadas como posibles dianas de fármacos (33-35). La regulación del crecimiento celular y de la división mediante estas cinasas no se conoce bien. Hace poco que se han identificado los sustratos fisiológicos de PknB, que incluyen el dominio FHA (asociado a Forkhead) encontrado en la proteína Rv1827, también llamada GarA (36). La cinética de la fosforilación de Rv1827 por el dominio cinasa de PknB se ha medido previamente con ATP radiomarcado, lo que demostró que la fosforilación se produce a una velocidad de 9,6 min^{-1} a 30 °C (36). Sin embargo, no se ha determinado el valor de K_m de este sustrato. Hemos investigado esta reacción de fosforilación con la MDCC-ParM, lo que proporciona un forma considerablemente más rápida de ensayar la actividad cinasa. La cinética en equilibrio estacionario de la liberación del ADP durante la fosforilación se midió con el ATP constante mientras se incrementaba la concentración del sustrato Rv1827 (figura 7). La calibración se realizó de forma análoga al ensayo de PcrA descrito más arriba. La dependencia de la velocidad inicial en función de la concentración de Rv1827 se analizó mediante la ecuación de Michaelis-Menten, lo que produjo un valor de K_m de 22 μM y una velocidad máxima de 1,2 $\mu\text{M min}^{-1}$. Esta velocidad máxima puede estar infravalorada porque no hemos determinado el valor de K_m para el ATP y, por lo tanto, la concentración del ATP puede no ser saturante. No obstante, la actividad específica del dominio cinasa de PknB se calculó que era de 5,9 s^{-1} en ATP a 40 μM , muy similar al resultado publicado.

Estos datos validan la aplicación de las moléculas fijadoras de ADP de acuerdo con la presente invención como proteínas detectoras que se pueden usar como indicadores en los ensayos para las cinasas. Así pues, la invención proporciona sistemas de ensayo fluorimétricos simples para monitorizar los ensayos para las cinasas en tiempo real, mientras que ventajosamente se evita la radiomarcación y otras técnicas caras, peligrosas o lentas.

5 Ejemplo 8: Caracterización y aplicación del biosensor con cumarina

En este ejemplo se utilizó la versión con cumarina, la MDCC-ParM. Las figuras citadas en este ejemplo muestran datos con la mutación K33A, a saber, se refieren a la caracterización de un detector de ADP preferente unido a cumarina, MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A).

En particular, mostramos la afinidad nucleotídica, cinética, ensayo de formación de filamentos y actividad ATPasa.

10 Además, mostramos que la invención se puede aplicar en ensayos en tiempo real mediante el detector anterior, que incluyen la helicasa de ADN PcrA; la proteína cinasa PknB; y SufBC, una ATPasa implicada en el ensamblaje del agrupamiento Fe-S.

El detector MDCC-ParM de este ejemplo es MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A), la secuencia de ejemplo se ofrece como SEQ ID n.º 5. El mismo procedimiento de purificación y marcación descrito para la variante de MDCC-ParM en los ejemplos anteriores se aplica también a esta variante detectora con K33A, a menos que se mencione otra cosa más adelante.

Formación de filamentos

Se analizó la capacidad de formación de filamentos de MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) y, de hecho, se demostró que se polimeriza, aunque lentamente y a concentraciones de ATP elevadas. Por consiguiente, se introdujo una mutación adicional, K33A, que abolió completamente la formación de filamentos en todas las condiciones probadas (máx., ParM a 120 µM, ATP a 4 mM, 4 horas). Por consiguiente, el detector preferente es la MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A).

La caracterización del detector con cumarina y K33A, la MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A), mostró una afinidad parecida por el ADP ($K_d = 0,46 \mu\text{M}$), una discriminación parecida del ATP ($K_d = 212 \mu\text{M}$) y una cinética de fijación del ADP parecida ($k_{on} = 0,65 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 0,19 \text{s}^{-1}$) en comparación con la versión de los ejemplos anteriores (sin la mutación K33A).

También demostramos las siguientes aplicaciones del biosensor de la invención, utilizando la variante K33A de la MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A) en este ejemplo, en mediciones en tiempo real de la generación de ADP por las ATPasas o las cinasas: primero, ensayo en equilibrio estacionario de la helicasa de ADN PcrA, con determinación del valor de K_m para el ATP. Segundo, ensayo en equilibrio estacionario de la proteína cinasa PknB, con determinación de los valores de K_m para el ATP y el sustrato proteico Rv1827. Tercero, cinética transitoria de la liberación del ADP en el ciclo ATPasa de SufBC, una ATPasa que interviene en el ensamblaje del agrupamiento Fe-S.

Visión general

35 Casi todo el proceso celular requiere la presencia de ATP. Esto se refleja en el inmenso número de enzimas de tipo cinasa o hidrolasa de ATP, que escinden el fosfato terminal del ATP, por lo que liberan ADP. A pesar del hecho de que la hidrólisis del ATP es una de las reacciones más fundamentales de los sistemas biológicos, sólo se dispone de unos pocos procedimientos para medir directamente la conversión enzimática del ATP. Aquí describimos el desarrollo de un biosensor sin reactivos para ADP, que es el producto común de todas las ATPasas y cinasas, que permite la detección en tiempo real del ADP producido enzimáticamente. El biosensor procede de un armazón proteico basado en un homólogo de la actina bacteriana, ParM. Un único fluoróforo (una dietilaminocumarina), unida a ParM en el extremo del sitio de fijación del nucleótido, acopla la fijación del ADP a un incremento de >3,5 veces de la intensidad de la fluorescencia. La variante marcada de ParM tiene mucha afinidad por el ADP (0,46 µM) y una respuesta señalizadora rápida, controlada por la velocidad de la fijación del ADP al detector (0,65 µM⁻¹s⁻¹). Los aminoácidos del centro activo se mutaron para reducir la afinidad por el ATP y conseguir una discriminación de >400 veces de la fijación del trifosfato. Otra mutación (en K33) garantiza que el detector no formará filamentos y, como consecuencia, que tendrá una actividad ATPasa muy baja. La amplia aplicabilidad de MDCC-ParM como sonda perceptora del ADP se demuestra en los ensayos cinéticos en tiempo real con dos ATPasas diferentes y una proteína cinasa.

50 Marcación de ParM con la MDCC

La marcación de la variante detectora de ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A) se llevó a cabo típicamente a una escala de aproximadamente 100 mg de proteína. Las reacciones de marcación contenían ParM a 150 µM y MDCC a 250 µM en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, y KCl a 25 mM. La mezcla de reacción se incubó durante 35 min y se mezcló en tambor vertical a 22 °C. Se añadió 2-mercaptoetanosulfonato de sodio a 2 mM y se continuó incubando durante 15 min. La solución se pasó a través de un filtro Acrodisc de 0,2 µm (Pall Corporation) y se cargó en una

columna HiTrap Q de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada con Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, y KCl a 25 mM. Se lavó la columna con el mismo tampón hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzó el nivel basal. Se aplicó un gradiente lineal de KCl de 25 a 400 mM en 200 ml. Se agrupó el pico principal de la ParM marcada, que eluía con KCl a aproximadamente 130 mM, y se concentró la MDCC-ParM como se describe más arriba. Se determinó la concentración de la ParM marcada mediante los coeficientes de extinción para la MDCC unida al ditiotreitolo (7), $\epsilon_{430} = 46\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280} = 7470\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, y el coeficiente de extinción de ParM, dado más arriba. La identidad de la variante de ParM marcada se confirmó mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización. La masa molecular medida fue de 37 214,8 Da, lo que concuerda con la masa teórica de la construcción de ParM marcada con una única MDCC, 37 214,5 Da (la única diferencia con los ejemplos anteriores es que para la marcación y la columna Q se utiliza Tris a 30 mM + KCl a 25 mM en vez de sólo Tris).

Ensayos y aplicaciones

Las mediciones de la actividad en equilibrio estacionario de la helicasa PcrA y la cinasa PknB se realizaron con el biosensor de ADP MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A). El ensayo para la helicasa se llevó a cabo en Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, NaCl a 150 mM, y MgCl₂ a 3 mM; en el ensayo para la cinasa se utilizó Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, NaCl a 150 mM, MgCl₂ a 3 mM y DTT a 2 mM. La fluorescencia de la MDCC se midió en las longitudes de onda de excitación y emisión de 431 nm y 474 nm, respectivamente. Las concentraciones utilizadas en los experimentos se dan en las correspondientes leyendas de las figuras. Para la calibración de la respuesta del detector, la MDCC-ParM, a la concentración utilizada en el ensayo, se tituló con ADP y se anotó la fluorescencia. Para dar explicación a las diferentes respuestas de fluorescencia cuando está presente el ATP, estas titulaciones se llevaron a cabo en una serie de diferentes concentraciones de ATP iniciales (véase la figura 8D). Gracias a esto, la concentración total de nucleótidos, ATP + ADP, se mantuvo constante durante las titulaciones y sólo se cambió el contenido de ADP. Esto se consiguió con la incubación de MDCC-ParM más una concentración de ATP particular en la cubeta, y luego se titula con una solución de ADP a la misma concentración que el ATP en la cubeta y que también contiene MDCC-ParM a la concentración de la cubeta. Mediante regresión lineal se obtuvo un gradiente para cada concentración inicial de ATP, que corresponde al cambio de la intensidad de la fluorescencia por ADP micromolar. En vez de realizar tal calibración para cada concentración inicial de ATP utilizada en el ensayo para la helicasa o para la cinasa, las titulaciones se realizaron sólo a cuatro concentraciones nucleotídicas totales diferentes. Las calibraciones para las otras concentraciones se obtuvieron luego mediante interpolación. Las titulaciones se midieron con el ATP inicial a 3, 6, 10 y 15 μM para el ensayo de PcrA, y 10, 20, 30 y 40 μM para el ensayo de PknB, así como en ausencia de ATP. Los gradientes obtenidos en estas titulaciones se representaron gráficamente frente a la concentración inicial de ATP. Para cada concentración inicial de ATP se calculó luego un gradiente para la calibración mediante interpolación lineal y éstos se utilizaron para calcular las concentraciones de ADP a partir de la señal de fluorescencia.

Las cinéticas de liberación del ADP y del fosfato durante un solo recambio de hidrólisis de ATP por SufBC de *Thermotoga maritima* se midieron con el biosensor de fosfato MDCC-PBP (19) y el detector de ADP MDCC-ParM, respectivamente. Las mediciones se llevaron a cabo en Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, KCl a 100 mM, MgCl₂ a 5 mM y DTT a 2 mM. Una solución de SufBC a 13 μM que contenía el biosensor correspondiente (MDCC-PBP a 20 μM o MDCC-ParM a 80 μM) se mezcló rápidamente con una solución de ATP a 4 μM . Se analizaron los datos de liberación de Pi mediante el ajuste a una curva exponencial simple con el programa informático Grafit. Se pudo describir la cinética de liberación del ADP al suponer dos etapas irreversibles sucesivas, en las que el ADP se libera en la segunda etapa. Los ajustes de la curva se llevaron a cabo con Grafit, mediante la ecuación siguiente:

$$F = A (1 + (k_2/(k_1 - k_2)) \exp(-k_1 t) + (k_1/(k_2 - k_1)) \exp(-k_2 t)) + F_0$$

Ec. 2

donde F_0 es la fluorescencia a tiempo cero, A es el cambio de fluorescencia total y k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de dos reacciones de primer orden.

Para medir la cinética de disociación del ADP desde el complejo de SufBC, se incubaron previamente SufBC a 13 μM y ADP a 4 μM en una jeringa antes de mezclarlos rápidamente con MDCC-ParM a 80 μM o a 160 μM . Los datos se analizaron mediante el ajuste de una curva exponencial simple con el programa informático HiTech. La constante de velocidad tan sólo varió el 10% entre las mediciones con MDCC-ParM a 80 y a 160 μM .

Mutaciones para inhibir la formación de filamentos

La ParM de tipo silvestre forma filamentos de tipo actina que son esenciales para su funcionamiento en la segregación de los plásmidos (21), pero que podrían alterar la función detectora de ParM. La formación de filamentos puede interferir con la señal de fluorescencia, y la actividad ATPasa de ParM está muy reforzada en el filamento (20, 21). Se investigó la polimerización de MDCC-ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) mediante dispersión de luz. De 10 a 40 μM , esta variante formó filamentos cuando se añadió ATP, pero no con ADP o en ausencia de nucleótido (figura 13A). Las cinéticas de nucleación y de polimerización fueron mucho más lentas que para la ParM de tipo silvestre, pero la concentración crítica, 2,5 μM , fue muy similar a la de la ParM de tipo silvestre (20). Por consiguiente, se introdujeron más mutaciones para bloquear la formación de filamentos. Entre otras, se había demostrado que las dos mutaciones puntuales K33A y R34A inhibían la formación de filamentos (16) y estos

restos participan en las interacciones entre protómeros en un modelo de filamento de ParM (15). Introdujimos cada mutación en la ParM (His₆/I27C/T174A/T175N/C287A) y analizamos la capacidad de polimerización de las proteínas marcadas. Los ensayos de dispersión de luz mostraron que la mutación K33A bloqueaba con más eficacia la formación de filamentos: no se detectó ningún incremento de la dispersión de luz durante un periodo de cuatro horas, incluso a una concentración muy alta (120 μM) del detector (figura 13B). Así pues, la variante de ParM que contenía la mutación K33A, MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A), se eligió como el biosensor de ADP preferente, y de ahora en adelante se denominará MDCC-ParM.

Tal y como se mencionó más arriba, la formación de filamentos está relacionada con una aceleración de la hidrólisis de ATP y, por consiguiente, se espera que la mutación K33A haga disminuir la actividad ATPasa. La velocidad de la ATPasa de MDCC-ParM se midió con el uso de un biosensor de fosfato, la rodamina-PBP (22). La hidrólisis de ATP fue muy lenta, con una constante de velocidad $<0,001 \text{ min}^{-1}$ que es >10 veces más baja que la de MDCC-ParM sin la mutación K33A. Por consiguiente, la mutación K33A no sólo bloquea la formación de filamentos, sino que también inhibe la actividad ATPasa.

Caracterización del detector de ADP preferente, MDCC-ParM

Las titulaciones de MDCC-ParM con ADP y ATP mostraron que la mutación K33A no alteraba la afinidad por el ADP ni la discriminación del ATP (figura 8B y tabla Z).

TABLA Z: Constantes de disociación y cambios de la fluorescencia para la fijación de ADP y de ATP a los mutantes de MDCC-ParM en diferentes etapas del desarrollo del detector.

El cambio de la fluorescencia tras la fijación del ADP y del ATP (F_{+}/F_{-}) y las constantes de disociación (K_d) se obtuvieron de las titulaciones de la fluorescencia a 20 °C en tampón de Tris a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl₂ a 3 mM y SAB a 5 μM. Las titulaciones de ATP se realizaron con un ATP muy purificado que contenía ADP a $<0,1\%$. Todas las variantes de ParM, excepto el doble mutante inicial I27C C287A, contenían también una etiqueta His₆ en el extremo carboxilo. En cuatro lotes diferentes de ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A) marcada, la afinidad por el ADP varió entre 0,38 y 0,52 μM, y el cambio de señal estuvo entre 3,3 y 4,1 veces.

Mutante de ParM	ADP		ATP		Proporción de K_d ATP/ADP
	F_{+ADP}/F_{-ADP}	K_d (μM)	F_{+ATP}/F_{-ATP}	K_d (μM)	
I27C C287A	3,0	0,31	3,1	18,7	60
I27C T174A T175N C287A	3,5	0,51	3,3	203	398
I27C K33A T174A T175N C287A	3,5	0,46	3,2	212	460

Por lo tanto, el detector preferente conserva la sensibilidad al ADP submicromolar y la elevada selectividad por el difosfato. Aunque todos los datos descritos hasta ahora se obtuvieron en el tampón con una concentración baja de sales (KCl a 25 mM), se analizó la influencia de la fuerza iónica fisiológica con KCl o NaCl a 150 mM (tabla S3).

Tabla S3: Fijación del ADP y del ATP al biosensor MDCC-ParM en condiciones salinas diferentes.

Las constantes de disociación (K_d) y los cambios de fluorescencia tras la fijación del nucleótido (F_{+}/F_{-}) al biosensor preferente, MDCC-ParM (His₆/I27C/K33A/T174A/T175N/C287A), se determinaron mediante titulaciones de la fluorescencia tal y como está descrito. Las titulaciones se llevaron a cabo a 20 °C en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, MgCl₂ a 3 mM, y SAB a 5 μM más la sal indicada.

Condición salina	ADP		ATP		Proporción de K_d ATP/ADP
	F_{+ADP}/F_{-ADP}	K_d (μM)	F_{+ATP}/F_{-ATP}	K_d (μM)	
Sin otra sal	3,4	4,11	3,5	378	94
KCl a 25 mM	3,5	0,46	3,2	212	460
KCl a 150 mM	3,4	0,20	3,5	73	370
NaCl a 25 mM	3,5	1,36	3,5	214	160
NaCl a 150 mM	3,4	1,34	3,2	244	180

La respuesta de la fluorescencia al ADP no varió significativamente, pero se produjeron pequeños cambios (de tres veces como máximo) en la afinidad del nucleótido. Sin embargo, la afinidad por el ADP fue significativamente menor (4,1 μM) en ausencia de KCl o de NaCl (tabla S3).

La medición exacta de la concentración de ADP con MDCC-ParM requiere la calibración de la señal de fluorescencia en las mismas condiciones. Las titulaciones del centro activo de MDCC-ParM mostraron un incremento lineal de la fluorescencia de hasta al menos la mitad de la saturación del detector (figura 8C). En MDCC-ParM a 20 μM , el cambio de la fluorescencia es de 3,8 veces y la concentración de centros activos es de 19,8 μM , en buena concordancia con la concentración determinada a partir de su espectro de absorbancia. En la mayoría de las aplicaciones del detector, el ADP se mide probablemente como un producto del ATP de sustrato y, por lo tanto, el ATP estará presente en las soluciones del ensayo. Por consiguiente, las curvas de calibración se determinaron en presencia de diferentes concentraciones de ATP, pero a una concentración de nucleótidos total constante, ATP + ADP (figura 8D). Se observó una relación lineal entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración del ADP, pero la pendiente disminuyó al incrementar la concentración de ATP.

Para evaluar la idoneidad de la MDCC-ParM para las mediciones en tiempo real, se investigó la cinética de fijación y de disociación del ADP en experimentos de flujo detenido. Se observó un incremento exponencial simple de la fluorescencia después de mezclar la MDCC-ParM y el ADP (figura 9A). Las constantes de velocidad observadas mostraron una dependencia lineal en función de la concentración del ADP, y la pendiente dio la constante de velocidad de asociación de $0,65 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta dependencia lineal indica que la velocidad de respuesta de la señal está controlada por la fijación del ADP y no por un cambio conformacional. La constante de la velocidad de disociación se midió mediante experimentos de desplazamiento que comienzan a partir de un complejo de MDCC-ParM-ADP y atrapando el ADP disociado con un gran exceso de ParM sin marcar (figura 9B). Se obtuvo un valor de $0,19 \text{ s}^{-1}$, lo que produjo la constante de disociación de $0,30 \mu\text{M}$, en buena concordancia con los datos de las titulaciones en equilibrio (tabla Z).

Los homólogos de la actina en los procariotas y en las arqueas, entre ellos ParM, MreB, FtsA y Ta0583, muestran una especificidad más bien baja por la base (23-25). Además de los nucleótidos de adenina, se ha descrito que a ParM se le fijan los nucleótidos de guanina GDP y GTP (15), pero no se determinó la afinidad de la fijación. La adición de GDP a MDCC-ParM sólo dio lugar a un incremento pequeño, 1,2 veces, de la fluorescencia. Sin embargo, las titulaciones competitivas mostraron que el GDP puede desplazar al ADP de la MDCC-ParM, y la constante de disociación para el GDP, $4,4 \mu\text{M}$, fue sólo diez veces más elevada que para el ADP. En conclusión, el GDP se fija al detector, pero no induce un gran cambio en la fluorescencia de la MDCC. El GDP compite con el ADP por el sitio de fijación en la MDCC-ParM y, por consiguiente, su presencia podría interferir con la detección del ADP.

Titulaciones competitivas

La unión del GDP al biosensor MDCC-ParM no da lugar a ningún gran cambio de fluorescencia; por lo tanto, se determinó la afinidad por el GDP mediante titulaciones competitivas. Éstas se midieron a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ con un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). Las titulaciones se llevaron a cabo en Tris-HCl a 30 mM , pH 7,5, KCl a 25 mM , MgCl_2 a 3 mM y SAB a $5 \mu\text{M}$. Una mezcla de ADP a $1 \mu\text{M}$ y MDCC-ParM a $0,1 \mu\text{M}$ se tituló con soluciones de GDP, que contenían la misma concentración de ADP y de MDCC-ParM. El desplazamiento del ADP unido a MDCC-ParM por el GDP se detectó como una disminución de la fluorescencia de MDCC, al excitar a 431 nm y detectar la emisión de fluorescencia a 474 nm . Se analizaron los datos con el programa informático Scientist (Micromath, San Louis, Missouri) como está descrito (Alexandrov, K., Scheidig, A. J. y Goody, R. S. (2001) «Fluorescence methods for monitoring interactions of rab proteins with nucleotides, rab escort protein, and geranylgeranyltransferase». En: Balch, W. E., Der, C. J., y Hall, A. (eds). *Methods Enzymol.*, Academic Press). En el modelo de titulación competitivo, el valor de K_d para el ADP se fijó en el valor determinado mediante la titulación directa. Durante el procedimiento de ajuste se permitió la variación de los valores para la constante de disociación de la fijación del GDP y los coeficientes de fluorescencia de MDCC-ParM sola y formando complejo con ADP.

Hidrólisis del ATP de MDCC-ParM

La velocidad de la hidrólisis del ATP por las variantes de ParM marcadas con MDCC se midió con el biosensor de fosfato rodamina-PBP (Okoh, M. P., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T., y Webb, M. R. (2006) *Biochemistry* 45, 14764-14771). Se incubaron previamente 3 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ antes de añadir ATP a $500 \mu\text{M}$ la rodamina-PBP a $10 \mu\text{M}$ y la MDCC-ParM a $10 \mu\text{M}$ en tampón de Tris a 30 mM , pH 7,5, KCl a 25 mM , y MgCl_2 a 3 mM . La cinética temporal de la reacción se midió anotando el cambio de la fluorescencia de la rodamina-PBP en el espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). Se excitó la fluorescencia a 553 nm y la emisión se detectó a 578 nm . Como control, se repitió el experimento en ausencia de MDCC-ParM. Se calibró la señal de fluorescencia mediante la titulación de la rodamina-PBP con una solución estándar de fosfato. Para determinar la velocidad de hidrólisis del ATP de MDCC-ParM se corrigieron los datos mediante la sustracción del experimento de control en ausencia de ParM.

Mediciones de la dispersión de la luz

Las cinéticas de polimerización de diferentes variantes de ParM se midieron monitorizando la dispersión de la luz en ángulo recto a 340 nm en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). Las soluciones de ParM se centrifugaron en un rotor TLA120.1 (Beckman) a $100\,000 \text{ rpm}$ durante 15 min antes de los experimentos de dispersión. Las soluciones de las variantes de ParM en Tris-HCl a 30 mM , pH 7,5, KCl a 25 mM , y MgCl_2 a 3 mM se incubaron en la cubeta a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min, antes de añadir el ATP, el ADP o sólo el tampón. Las intensidades de la dispersión se corrigieron mediante la sustracción de la intensidad medida antes de añadir el nucleótido. Para determinar la

concentración crítica en presencia de ATP, las intensidades máximas de dispersión se representaron gráficamente frente a la concentración de ParM. Se obtuvieron concentraciones críticas mediante la extrapolación lineal a la intensidad de dispersión cero.

5 (Véase también van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K., y Lowe, J. (2002) *EMBO J.* 21, 6935-6943).

Mediciones en equilibrio estacionario de las actividades ATPasa y cinasa

Una helicasa de ADN, PcrA, se utilizó como sistema de ATPasa para demostrar que la MDCC-ParM se podía utilizar en un ensayo en tiempo real. La PcrA de *Bacillus stearothermophilus* interviene en la replicación de los plásmidos (26) y se mueve rápidamente a lo largo de oligonucleótidos monocatenarios cortos mientras hidroliza un ATP por base avanzada (27, 28). En un ensayo en equilibrio estacionario se midió la velocidad de hidrólisis de PcrA en presencia de un oligonucleótido corto (dT₂₀) con el biosensor MDCC-ParM. La cinética de la generación de ADP se monitorizó a diferentes concentraciones de ATP (figura 10). Para calcular la concentración de ADP a partir de la señal de fluorescencia se utilizó un conjunto de curvas de calibración, cada una para las diferentes respuestas de fluorescencia con diferente concentración de ATP. Un gráfico de las velocidades iniciales frente a la concentración de ATP dio que la K_m era de 1,6 μM y que la k_{cat} era de 13,7 s⁻¹ (figura 10). No obstante, se obtuvieron resultados muy similares cuando se utilizó una única calibración para todas las mediciones a diferentes concentraciones de ATP. En este caso, la constante de Michaelis-Menten se calculó que era 1,4 μM (17% más baja). Con la calibración a la concentración total de nucleótidos de 15 μM (máxima concentración de ATP utilizada), se calculó que la k_{cat} era de 14,0 s⁻¹ (2% más alta). Alternativamente, con la calibración en ausencia de ATP se obtuvo una k_{cat} de 12,2 s⁻¹ (11% más baja). Para poderlo comparar, se repitió el experimento en las mismas condiciones, pero con el biosensor de fosfato bien caracterizado MDCC-PBP (19). Los parámetros obtenidos fueron K_m de 1,7 μM y k_{cat} de 11,5 s⁻¹, lo que apoya los resultados de los experimentos realizados con el biosensor de ADP MDCC-ParM.

La proteína cinasa PknB de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizó como un segundo ejemplo de aplicación del biosensor de ADP. La PknB es una Ser/Thr cinasa, esencial para el crecimiento de la micobacteria (29). Un sustrato recientemente identificado de PknB es el dominio FHA (asociado a Forkhead) de Rv1827 (30), que interviene en la regulación del metabolismo del glutamato (31). La cinética en equilibrio estacionario de la fosforilación de Rv1827 por el dominio cinasa de PknB (PknB¹⁻²⁷³) se monitorizó, gracias al biosensor MDCC-ParM, mediante el seguimiento de la generación de ADP acompañante (figura 11). Se determinaron los parámetros de Michaelis-Menten de ambos sustratos. Para el sustrato proteico Rv1827 se obtuvieron los valores K_m de 20 μM y de k_{cat} de 4,7 min⁻¹ (figura 11A). Los resultados de los datos a diferentes concentraciones de ATP iniciales fueron K_m de 7,5 μM y k_{cat} de 4,9 min⁻¹ (figura 11B).

Liberación de ADP y de P_i durante la hidrólisis de ATP de SufBC

SufC es una ATPasa implicada en el ensamblaje del agrupamiento Fe-S en condiciones de estrés (32, 33). SufC y la proteína asociada SufB se encuentran en las bacterias, entre ellas patógenos de humanos (p. ej., *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis*), en las arqueas y en los orgánulos plastídicos de algas y plantas (32). Se ha estudiado el mecanismo cinético del complejo SufBC mediante análogos de nucleótidos fluorescentes, mantATP y mantADP (34, 35). Aquí, tanto el biosensor de ADP (MDCC-ParM) como un biosensor de P_i [MDCC-PBP (19)] se utilizaron para estudiar la liberación de ADP y de P_i durante un único ciclo de hidrólisis de ATP por SufBC (figura 12). El P_i se libera primero a 0,070 s⁻¹, muy probablemente controlado por la escisión del ATP, ya que la constante de velocidad es muy parecida a la de la escisión de mantATP (34). El trazado de la fluorescencia de MDCC-ParM mostró una notable fase de latencia, caracterizada por una constante de velocidad muy parecida a la de la liberación del P_i, 0,058 s⁻¹, antes de que se produjese la disociación del ADP a 0,050 s⁻¹, comparable a la constante de la velocidad de disociación de mantADP, de 0,038 s⁻¹ (34). También se midió la disociación directa del ADP del complejo SufBC, al mezclar la MDCC-ParM con el complejo SufBC-ADP incubado previamente. Los trazados de la fluorescencia fueron exponenciales simples, con una constante de velocidad de 0,046 s⁻¹, lo que concuerda con la constante de velocidad de la liberación de ADP durante la hidrólisis del ATP. Estas mediciones con ATP y ADP sin marcar confirman los estudios en los que se utilizaron los nucleótidos mant (34), lo que indica que el grupo mant no tiene un gran efecto sobre las interacciones entre SufBC y el nucleótido.

Ejemplo 9: Caracterización y aplicación del biosensor con rodamina

50 Se caracteriza la versión de rodamina preferente del biosensor.

Convenientemente, este biosensor comprende una etiqueta de hexahistidina en el extremo carboxilo para la purificación.

Convenientemente, este biosensor comprende mutaciones para suprimir la fijación del ATP: T174A T175N.

Convenientemente, este biosensor comprende una mutación para inhibir la formación de filamentos: K33A.

Las versiones o variantes particularmente adecuadas incluyen: ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) con y sin la mutación K33A; cada una de estas moléculas se marcó con 5-IATR o 6-IATR (a saber, cuatro variantes). Hemos tomado la variante 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) como el ejemplo preferente y demostramos esto en un ensayo de hexocinasa.

- 5 Se presenta más adelante la caracterización de estas variantes, lo que incluye afinidades, cinética, ensayo de formación de filamentos, ensayos en tiempo real con 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) en el contexto de la hexocinasa.

10 En las dos variantes de ParM preferentes para la marcación con rodamina se introdujo una etiqueta de hexahistidina en el extremo carboxilo para la purificación mediante cromatografía de Ni-quelatos, lo que produjo la ParM (His₆/D63C/D224C/C287A) y la ParM (His₆/D63C/K216C/C287A).

15 Se añadieron diferentes combinaciones de las mutaciones del centro activo a las nuevas construcciones para incrementar la selectividad por el ADP frente al ATP. Éstas fueron (T174A/T175A) o (T174A/T175N) o (T174A/T175L), que se había demostrado que mejoraban la discriminación del ATP en la variante de ParM marcada con MDCC (véase más arriba). La mejor versión en términos de cambio de la señal y de selectividad por el ADP fue la ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) marcada tanto con 5-IATR como con 6-IATR.

20 Se analizó la formación de filamentos en la 5-ATR- y la 6-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A). Se demostró que ambas formaban filamentos, pero dado que los detectores rodamina-ParM es probable que se usen por debajo de la concentración crítica, es poco probable que presenten ningún problema. No obstante, la mutación K33A, que bloquea con eficacia la formación de filamentos en la variante del detector marcada con cumarina, también se introdujo en la construcción para la marcación con rodamina para producir ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A). La mutación abolió completamente la formación de filamentos en las condiciones analizadas.

25 Se presenta la caracterización de las 5-ATR- y 6-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) con y sin la mutación K33A. Se midieron las afinidades por el ADP y por el ATP para las cuatro variantes de ParM (véase la tabla Y que viene a continuación). Las constantes de disociación del ADP se encuentran en el intervalo de 30 a 100 μ M, en donde las mutantes que contienen K33A tienen una afinidad ligeramente más alta. El ATP se fija mucho más débilmente en todos los casos con una constante de disociación >5 mM. Las cuatro variantes también tienen cinéticas de fijación del ADP parecidas (véase la tabla Y). Sin embargo, mientras que el cambio máximo de la señal durante la fijación del ADP se incrementa 20 veces para las variantes del ParM sin la mutación K33A (marcadas con 5- y 6-IATR), el cambio de la fluorescencia fue más bajo (máx. 12 veces) para las variantes que contenían K33A. Por consiguiente, la variante de ParM sin K33A puede ser el biosensor marcado con rodamina preferente, en tanto que se conserva la opción de incluir K33A si se desea, por ejemplo, en el caso de que haya que utilizar concentraciones altas del detector.

35 Como aplicación del biosensor con rodamina, la 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) se ha utilizado para medir la cinética en equilibrio estacionario de la hexocinasa de levadura. Se determinaron los valores de K_m para la D-glucosa y para el ATP.

40 Al aplicar la estrategia con dos rodaminas a ParM, hemos desarrollado una nueva variante del biosensor de ADP con diferentes características con la MDCC-ParM. Las variantes de ParM doblemente marcadas con rodamina se fijan al ADP con una afinidad relativamente baja (constante de disociación de 30 a 100 μ M), pero responde a la fijación del ADP con un cambio de señal muy grande, de hasta 20 veces. Tanto las mutaciones del centro activo como la mutación de polimerización descritas para la MDCC-ParM también funcionaban con la versión marcada con rodamina, y debilitan la afinidad de fijación al ATP a >5 mM, e impiden la formación de filamentos. Estos biosensores de ADP basados en la rodamina extienden el margen de aplicación de los detectores basados en ParM a las mediciones de los valores altos de K_m y podrían ser más idóneos para los ensayos de escrutinio de alto rendimiento.

45 **Marcación de los mutantes de ParM con 5- y 6-IATR**

50 Para la doble marcación con rodamina de los mutantes de ParM, se incubaron a 22 °C ParM a 100 μ M y 5- o 6-ATR a 400 μ M en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, y KCl a 25 mM (desgasificado), agitando en tambor vertical durante 90 min. Se añadió 2-mercaptoetanosulfonato de sodio a 2 mM y se continuó la agitación otros 15 min. Las mezclas de reacción se centrifugaron (14 000 g, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m con jeringa (Acrodisc, Pall Corporation). El exceso de fluoróforo y el 2-mercaptoetanosulfonato de sodio se retiraron en una columna PD10 (GE Healthcare) con el mismo tampón que para la marcación. El eluido se cargó en una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare) equilibrada con tampón de marcación. Se lavó la columna con el mismo tampón y el ParM marcado se eluyó mediante la aplicación de un gradiente lineal de KCl de 25 a 200 mM con 20 volúmenes de columna. A las fracciones se les analizó el cambio de fluorescencia tras la adición de ADP (λ_{ex} = 553 nm, λ_{em} = 578 nm). Se agruparon las fracciones que mostraban el cambio de señal más alto, y la proteína marcada se concentró en un dispositivo de filtración por centrifugación Amicon Ultra (Millipore Corporation, EE.UU.) hasta aproximadamente 10 mg/ml. Las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C. Se confirmó la doble marcación mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización. Las

masas medidas diferían en menos de 0,5 Da de los valores teóricos para las proteínas doblemente marcadas. La concentración de los mutantes de ParM doblemente marcados con rodamina se determinó a partir de los espectros de absorbancia y el coeficiente de extinción de un aducto tiólico de molécula pequeña con el 6-IATR en su punto isobéptico, $\epsilon_{528} = 52\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (18).

5 Mediciones de la fluorescencia

Los espectros y las titulaciones de la fluorescencia se midieron en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). Los espectros de excitación y de emisión se anotaron con una ranura de 5 nm de ancho a las longitudes de onda de emisión y de excitación de 576 nm y 553 nm, respectivamente. En los experimentos de titulación, la fluorescencia de la rodamina se midió a la misma longitud de onda de excitación/emisión. Se analizaron los datos de la titulación con una curva de fijación cuadrática mediante el programa informático Grafit 5.0 (7).

Se realizaron los experimentos de flujo detenido en un instrumento HiTech SF61 DX2 equipado con una lámpara de Xe/Hg (TgK Scientific, GB). La cinética de asociación de ParM marcado con rodamina y ADP se midió en condiciones de pseudo-primer orden mediante la mezcla de ParM marcada a 0,2 μM con concentraciones crecientes de ADP. La fluorescencia de la rodamina se excitó a 553 nm y la emisión de la fluorescencia se detectó después de filtrar la luz dispersada a través de un filtro discriminador a 570 nm. Los datos se analizaron mediante el ajuste de una curva exponencial simple con el programa informático HiTech.

Todas las mediciones de la fluorescencia se llevaron a cabo en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl_2 a 3 mM y SAB a 5 μM , a 20 °C.

Ensayos en equilibrio estacionario de la actividad hexocinasa

La cinética de Michaelis-Menten de la fosforilación de la D(+)-glucosa mediante la hexocinasa de *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich) se monitorizó con el biosensor del ADP 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). Las mediciones se llevaron a cabo en Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl_2 a 10 mM y SAB a 5 μM a 20 °C. Las reacciones se prepararon con 5-ATR-ParM a 0,5 μM , hexocinasa a 0,02 unidades ml^{-1} (monómeros a 1,3 nM), en ATP a 1 mM constante y distintas concentraciones de glucosa (20-2000 μM), o en glucosa a 2 mM constante y concentraciones crecientes de ATP. La reacción se inició al añadir la hexocinasa. La fluorescencia de la rodamina se excitó a 553 nm y la emisión se detectó a 578 nm. Para la calibración de la señal de fluorescencia se tituló la 5-ATR-ParM a 0,5 μM con ADP en presencia de ATP a 1 mM (máxima concentración utilizada). Con ADP en el intervalo de 0 a 30 μM , los datos se pueden aproximar mediante una dependencia lineal (figura 18A) y se utilizó la pendiente de un análisis de regresión lineal de estos datos para calcular la concentración de ADP de cada cinética temporal. No se tuvo en cuenta la ligera variación de la curva de calibración cuando se utilizaban concentraciones más bajas de ATP. A diferencia del ATP, la glucosa a 2 mM no alteró significativamente las curvas de calibración.

La marcación problema de los dos mutantes dobles se realizó con dos isómeros de rodamina diferentes, 5-IATR y 6-IATR, y se investigó la respuesta de la fluorescencia a la fijación del ADP. La estequiometría de la marcación fue de 2:1, como se confirmó mediante la espectrometría de masas. Las cuatro combinaciones mostraron el incremento de la fluorescencia que era esperable por la desaparición de los dímeros de rodamina. El cambio de señal más grande se observó para la ParM (D63C/D224C/C287A), que incrementó la fluorescencia 10 veces cuando se marcó con 6-IATR (tabla Y).

Tabla Y: Afinidad y dinámica de la fijación de nucleótidos, y cambio de la fluorescencia de los mutantes de ParM marcados con rodamina.

Las constantes de disociación en equilibrio (K_d) y el cambio de fluorescencia (F_+/F_-) tras la fijación del ADP y del ATP se determinaron mediante la titulación de la fluorescencia como está descrito para la figura 15. Las constantes de la velocidad de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) para la fijación del ADP se midieron en experimentos de flujo detenido (figura 16) y las constantes de disociación se calcularon a partir de k_{off}/k_{on} para compararlas con los valores de las titulaciones en equilibrio. Mientras que las constantes de disociación eran muy reproducibles entre lotes diferentes de un mutante de ParM marcado (desviación de <20%), el cambio de la fluorescencia varió entre los diferentes lotes de la proteína marcada. Los valores dados en la tabla representan el cambio de fluorescencia máximo observado. Todos los datos se obtuvieron en Tris-HCl a 30 mM, pH 7,5, KCl a 25 mM, MgCl_2 a 3 mM y SAB a 5 μM a 20 °C.

Mutaciones además de D63C D224C C287A	Titulación de la fluorescencia						Flujo detenido		
	ADP		ATP		Proporción de K_d ATP/ADP	ADP			
	F_+/F_-	K_d (μM)	F_+/F_-	K_d (μM)		k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (μM)	
5-IATR									
Ninguna mutación	otra	4,1	76	1,7	1200	16	n.d.	n.d.	n.d.
T174A T175N		19	63	> 6,0	> 5000	> 80	0,066	4,5	68
K33A T174A T175N		12	31	> 5,0	> 5000	> 160	0,105	3,0	29
6-IATR									
Ninguna mutación	otra	10	147	3,7	1100	7,5	n.d.	n.d.	n.d.
T174A T175N		19	103	> 7,0	> 5000	> 50	0,056	6,4	114
K33A T174A T175N		10	39	> 4,0	> 5000	> 130	0,076	3,4	44

En cambio, el cambio de la fluorescencia obtenido con ParM (D63C/K216C/C287A) fue <3 veces con ambos isómeros de rodamina, y esto no se pudo mejorar mediante ninguna otra purificación de las proteínas marcadas. Por consiguiente, se eligió ParM (D63C/D224C/C287A) para los demás estudios.

- 5 El incremento de la fluorescencia tras la fijación del ADP y los espectros de absorbancia de ParM marcada con rodamina indican la formación de dímeros de las rodaminas en ParM sin nucleótidos, lo que se altera mediante la fijación del ADP (figura 14). El espectro de absorbancia de la 6-ATR-ParM en ausencia de ADP es indicativo de dímeros de rodamina con una absorbancia máxima a 519 nm y un hombro a aproximadamente 550 nm (figura 14A). La fijación del ADP ocasiona una disminución de la absorbancia a 519 nm y un incremento concomitante de la absorbancia a 553 nm. Los espectros de la absorbancia muestran un punto isobéptico a 536 nm. Los mutantes de ParM marcados con 5-IATR muestran unos espectros de absorbancia diferentes con una absorbancia más alta a 553 nm y una absorbancia más baja a 519 nm que la ParM marcada con 6-IATR (figura 14B). Tras las adiciones de ADP, se incrementó la absorbancia a 553 nm y se disminuyó a 519 nm. El punto isobéptico cae en 532 nm. La diferencia entre los espectros de absorbancia de ParM, marcados con 5- o con 6-IATR, sugiere que la distribución estructural exacta y la interacción de los dos isómeros de rodamina es ligeramente diferente. A diferencia de los espectros de absorbancia, los espectros de fluorescencia de los dos isómeros en ParM son casi idénticos, y las longitudes de onda de excitación y de emisión máximas eran de 553 nm y 578 nm (figura 14C).

Afinidad por el ADP y por el ATP

- 20 Las titulaciones de la fluorescencia de la 5-ATR- y la 6-ATR-ParM (D63C/C224C/C287A) mostraron que las afinidades por el ADP son 76 μM y 147 μM , respectivamente (figura 15, tabla 1). Estas afinidades están varias órdenes de magnitud por debajo de la de ParM de tipo silvestre [2,4 μM (19)] o la MDCC-ParM [0,46 μM (7)]. Por una parte, esto reduce la sensibilidad de la detección del ADP, pero también permite el uso del detector a concentraciones más bajas para detectar un exceso de ADP y, por lo tanto, para ahorrar material. La fijación del ATP fue más débil que la fijación del ADP en ambos casos, la K_d era de aproximadamente 1 mM y el cambio de la fluorescencia tras la fijación del trifosfato fue más bajo (figura 15, tabla 1).

- 30 Para mejorar más la selectividad por el ADP, se introdujeron dos mutaciones en el centro activo, T174A y T175N, en la variante de ParM para la marcación con rodamina. Las mismas mutaciones han incrementado satisfactoriamente la discriminación del ATP en el biosensor MDCC-ParM (7). El nuevo mutante de ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A), tanto marcado con 5-IATR como con 6-IATR, había incrementado ligeramente la afinidad por el ADP, pero las mutaciones debilitaron la fijación del ATP a >5 mM, lo que mejora la selectividad por el ADP (tabla 1). Después de optimizar las condiciones de marcación y purificación de las proteínas marcadas mediante cromatografía de intercambio de aniones, se consiguió un cambio de señal de aproximadamente 20 veces.

- 35 Se introdujo otra mutación, K33A, en ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A), que abolió la formación de filamentos del biosensor MDCC-ParM (7). Además del efecto sobre la formación de filamentos (véase más abajo), las variantes de ParM resultantes, 5-ATR- y 6-ATR-ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A), mostraron un incremento adicional de la afinidad por el ADP (figura 15, tabla 1). Sin embargo, el cambio de señal máximo de 12 veces no fue tan alto como con la variantes de ParM marcadas con rodamina sin la mutación K33A.

Dinámica de la fijación del ADP

La cinética de la fijación del ADP a diferentes variantes de ParM marcadas doblemente con rodamina se investigaron en experimentos de flujo detenido aprovechándose del cambio de señal de la rodamina. La cinética de asociación se midió en condiciones de pseudo-primer orden con un exceso de ADP. Las curvas de la fluorescencia se ajustaron bien mediante exponenciales simples y las constantes de velocidad resultantes, k_{obs} , dependían linealmente de la concentración de ADP (figura 16), lo que indica que la velocidad del cambio de señal está controlada por la etapa de fijación bimolecular en el intervalo de concentraciones examinado. Se resumen en la tabla 1 las constantes de la velocidad de asociación y de disociación, calculadas a partir de la pendiente y el corte con el eje en la regresión lineal. Las constantes de la velocidad son parecidas para las diferentes variantes de ParM marcadas con rodamina. La constante de disociación obtenida de las constantes de velocidad está en muy buena concordancia con los valores determinados en las titulaciones en equilibrio. La comparación con la cinética de fijación del ADP a MDCC-ParM (7) muestra que la afinidad por el ADP fuertemente reducida en la ParM marcada con rodamina (unos dos órdenes de magnitud) se debe a una combinación de una reducción de un orden de magnitud en la constante de la velocidad de asociación y de un incremento de tamaño similar en la constante de la velocidad de disociación. El tiempo de respuesta máximo de los biosensores de rodamina se define por las constantes de velocidad de disociación, $1/k_{off}$, que es $<0,33$ s para la variante más lenta. Así pues, los biosensores de ParM basados en la rodamina se adaptan bien para las mediciones cinéticas en tiempo real de las actividades ATPasa y cinasa.

Formación de filamentos

Las variantes de ParM con rodamina es muy probable que se usen a concentraciones <1 μM (véase más adelante), lo que está por debajo de la concentración crítica para la formación de filamentos de la ParM de tipo silvestre (19). Por consiguiente, la formación de filamentos podría ser menos problemática aquí que con la variante MDCC-ParM, que probablemente se utilice a una concentración al menos diez veces más alta. Sin embargo, la mutación K33A, que se sabe que inhibe la formación de filamentos (16), se introdujo en la variante de ParM para la marcación con rodamina. La polimerización de las variantes de ParM marcadas con rodamina con y sin la mutación K33A se investigó mediante dispersión de luz en ángulo recto (figura 17). La ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) marcada con 5-IATR formó filamentos en presencia de concentraciones altas de ATP (4 mM), aunque mucho más lentamente que la proteína de tipo silvestre (figura 17A), (19, 20). La concentración crítica para la ParM marcada en presencia de ATP se determinó que era 0,8 μM , incluso más baja que para ParM de tipo silvestre, 2,5 μM , en las mismas condiciones (figura 17B). No obstante, el error en la concentración crítica es relativamente alto. A diferencia de la ParM de tipo silvestre, en la que los filamentos se despolimerizan rápidamente debido a la hidrólisis del ATP, los filamentos de 5-ATR-ParM fueron estables durante un periodo de al menos cuatro horas (figura 17A). Esto podía significar que la hidrólisis de ATP y/o la liberación de P_i es muy lenta o no conduce a la despolimerización. Lo último parece más probable porque la 5-ATR-ParM también se polimeriza en presencia de ADP (figura 17A).

La ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) marcada con 6-IATR mostró una cinética de polimerización parecida a la de la variante marcada con 5-IATR, pero la concentración crítica fue significativamente más alta, 14 μM (figura 17B), y no se observó ninguna formación de filamentos en presencia de ADP. Mientras que la 5-ATR-ParM y la ParM de tipo silvestre mostraban una intensidad de dispersión muy parecidas, la señal de dispersión de luz fue mucho más débil para la ParM marcada con 6-IATR (figura 17B). Esto es posiblemente una indicación de que los filamentos de 6-ATR-ParM tienen una estructura diferente (véase la discusión).

La ParM (His₆/K33A/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) que contiene la mutación K33A no mostró ningún cambio en la dispersión de luz en las condiciones anteriores cuando se marcó con 5- o 6-IATR (figura 17a). Así pues, al igual que en el biosensor descrito anteriormente, la mutación K33A bloquea con eficacia la formación de filamentos.

Ejemplo de aplicación: cinética de la hexocinasa en equilibrio estacionario

Como ejemplo de las mediciones cinéticas mediante los biosensores de ParM con rodamina se examinó la reacción de fosforilación de la D-glucosa catalizada por la hexocinasa de *S. cerevisiae* (figura 18). La cinética en equilibrio estacionario de la reacción de fosforilación se midió monitorizando la generación de ADP con el biosensor de ParM con rodamina 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A). El detector se utilizó a menor concentración que el ADP, por lo que la fracción saturada de ParM con rodamina cambia con la concentración de ADP en un amplio margen alrededor de la constante de disociación. Aunque esto produce una relación no lineal entre la señal de fluorescencia y el ADP, a una concentración de ADP baja (<30 μM), la respuesta del detector es aproximadamente lineal (figura 18A). Mientras que la glucosa a la concentración máxima utilizada en el ensayo (2 mM) no alteró significativamente la respuesta del detector, la presencia de ATP a 1 mM (concentración máxima utilizada) incrementó el ruido de fondo y, por lo tanto, hizo disminuir la pendiente de la curva de calibración, aunque sólo un 12% (figura 18A). La pendiente de la curva de calibración en presencia de ATP a 1 mM se utilizó para calcular las concentraciones de ADP en todos los experimentos. Las cinéticas temporales de la generación de ADP se monitorizaron tanto a una concentración de glucosa constante y de ATP variante (figura 18B) como a ATP constante y una concentración de glucosa creciente. A partir de los gráficos de Michaelis-Menten (figuras 18C y 18D), los parámetros de K_m^{ATP} de 80 μM y V_{max} de 20 $\mu\text{M min}^{-1}$ se obtuvieron mediante la variación del ATP, y la

K_m^{glucosa} de 170 μM y la V_{max} de 23 $\mu\text{M min}^{-1}$ mediante la variación de la concentración de la D-glucosa. Los valores de la V_{max} producen una actividad de 1,08 $\mu\text{mol min}^{-1}$ por unidad de hexocinasa, lo que está muy en concordancia con la definición de unidad del proveedor, 1 $\mu\text{M min}^{-1}$ unidad $^{-1}$, en condiciones experimentales parecidas (pH 7,6, 25 °C).

5 DISCUSIÓN

Las constantes de disociación de la fijación del ADP de todas las variantes marcadas con rodamina se encuentran en el intervalo de 30 a 100 μM , que son mucho más altas que las de la MDCC-ParM (0,5 μM) (7). Esta menor afinidad se podría deber al mayor tamaño de las rodaminas, y que las dos cisteínas mutadas podrían afectar a la fijación. Alternativamente, la fijación del ADP requiere el cierre de la hendidura y, por lo tanto, la desaparición de la interacción de apilamiento de la rodamina. Un segundo mutante doble marcado con rodamina (D63C/K216C) tiene una afinidad por el ADP más de diez veces mayor que los mutantes (D63C/D224C), lo que sugiere que el debilitamiento de la fijación del ADP se debe al menos en parte a la mutación de D224C. En un uso anterior del apilamiento de la rodamina para percibir un cambio de conformación proteica con la proteína fijadora de fosfato, la rodamina tuvo poco efecto sobre la afinidad por el fosfato inorgánico (15), lo que sugiere que el apilamiento de la rodamina por sí solo puede no tener necesariamente un efecto significativo sobre la energética. Sin embargo, en el caso de dos rodaminas conectadas al mismo polipéptido de una proteína plegada, la capacidad de las rodaminas para apilarse y la disposición del apilamiento en sí mismo puede ser mucho más restrictivo que en la situación en la que las rodaminas tienen una relativa libertad para encontrar la configuración óptima, bien libres en solución o bien conectadas a un péptido flexible (14). Así pues, la energética del apilamiento puede variar entre las proteínas. De hecho, los datos espectrales con la proteína fijadora de fosfato (15) sugieren que aparecen tales diferencias. La baja afinidad hace que las versiones de la rodamina sean menos sensibles que el detector con MDCC, pero más adecuadas para concentraciones de ATP altas.

Para marcar la ParM se utilizaron los isómeros puros de rodamina 5-IATR y 6-IATR. Aunque se observó un cambio de fluorescencia muy parecido con cada isómero, la señal de fluorescencia absoluta fue más baja para la 6-IATR y los espectros de absorbancia mostraron diferencias grandes en la proporción de la intensidad de las bandas a 519/550 nm. Esto indica que los dos isómeros de rodamina tienen una disposición estructural diferente cuando se adhieren a las cisteínas en ParM. Las moléculas de 6-ATR parecen formar una interacción de apilamiento más fuerte en ParM, ya que la proporción de absorbancias de 519 nm/550 nm es más alta y la intensidad de la fluorescencia es más baja. Dado que una mezcla de isómeros de 5- y 6-IATR es más fácil de sintetizar, puede ser deseable utilizarla (y simplemente comprobar si también se puede obtener un cambio de señal similar con la mezcla para marcar la ParM antes de desplegar el detector).

Además de las diferencias de fluorescencia y de absorbancia, el comportamiento diferente a la hora de formar filamentos de ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A), marcada o con 5-IATR o con 6-IATR, también sugiere que los isómeros de rodamina adoptan una conformación diferente. A diferencia de la 5-ATR-ParM, la 6-ATR-ParM no forma filamentos con ADP, tiene una concentración crítica más alta en presencia de ATP y la intensidad de dispersión, muy parecida entre la 5-ATR-ParM y el tipo silvestre, está muy reducida. Una explicación para la menor dispersión de luz podría ser una estructura diferente de los filamentos (longitud, grosor, menos formación de haces), que ocasionaría menos dispersión de luz. En este contexto, es interesante que Popp et al (21) encontrasen que la interacción de D63 con R262 es importante para los contactos entre las cadenas del filamento de ParM, y que la ParM que lleva la mutación R262D forma sólo protofilamentos monocatenarios. Las rodaminas de ParM podrían, por lo tanto, interferir con los contactos entre las cadenas e inhibir la formación de filamentos bicatenarios. No obstante, es difícil explicar porqué el isómero 6, y no el isómero 5, bloquearía tal interacción entre las cadenas.

De las cuatro variantes diferentes preferentes de ParM marcadas doblemente con rodamina que hemos caracterizado, consideramos que 5-ATR-ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) es el detector de ADP más adecuado por lo general por los motivos que siguen. Aunque esta variante de ParM todavía forma filamentos a concentraciones más altas, es probable que los ensayos se lleven a cabo a concentraciones bastante por debajo de la concentración crítica y, en la práctica, la polimerización no parece ocasionar problemas, tal y como se muestra en el ensayo de la hexocinasa (figura 18). La mutación K33A bloqueó con eficacia la formación de filamentos, pero también disminuyó el cambio de señal tras la fijación del ADP. Tan sólo se obtuvo un incremento de fluorescencia máximo de 12 veces en comparación con un incremento de 20 veces para las variantes de ParM sin K33A. Sin embargo, el cambio de la señal puede mejorarse mediante optimización. En comparación con la ParM (His₆/D63C/T174A/T175N/D224C/C287A) marcada con 6-IATR, la versión con 5-IATR tiene una mayor afinidad por el ADP (63 μM frente a 103 μM) y, por lo tanto, tiene un límite de detección más bajo.

El biosensor marcado con rodamina puede utilizarse de una manera diferente que MDCC-ParM, que puede ser a una concentración más baja que el ADP a detectar. Debido a la fijación débil, el grado de saturación, y por tanto la fluorescencia, variará con el ADP en un amplio margen en torno a la constante de disociación. Mientras que este procedimiento de medición es inherentemente menos sensible que la captura cuantitativa de ADP por un detector de alta afinidad, tiene la gran ventaja de requerir sólo una concentración baja del detector en la solución de ensayo. Las concentraciones altas de proteína no sólo es más probable que interfieran con el ensayo, por ejemplo, interaccionando con algún componente o introduciendo efectos de filtro internos, sino que también es más caro en

términos de material utilizado. En la práctica, la concentración de la proteína detectora se determinaría principalmente por la sensibilidad del sistema de detección óptica y la exactitud requerida por el usuario experto. Tal y como observamos en el ensayo de la hexocinasa, se pueden utilizar fácilmente concentraciones submicromolares del detector. Además, el detector marcado con rodamina extiende su posible uso a concentraciones de ATP más altas y significa que la contaminación de ADP en el ATP es menos problemática que con MDCC-ParM. Finalmente, la rodamina es por lo general más fotoestable que la cumarina y la fluorescencia se excita y detecta a longitudes de onda más altas. Estas propiedades probablemente hacen que la ParM con rodamina sea más adecuada para las aplicaciones como los ensayos de alto rendimiento.

Bibliografía del ejemplo 9

- 10 1. Itaya, K. y Ui, M. (1966) A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clinica Chimica Acta* 14, 361-366.
2. Charter, N. W., Kauffman, L., Singh, R. y Eglén, R. M. (2006) A generic, homogenous method for measuring kinase and inhibitor activity via adenosine 5'-diphosphate accumulation, *J. Biomol. Screen.* 11, 390-399.
- 15 3. Srinivasan, J., Cload, S. T., Hamaguchi, N., Kurz, J., Keene, S., Kurz, M., Boomer, R. M., Blanchard, J., Epstein, D., Wilson, C. y Diener, J. L. (2004) ADP-specific detectors enable universal assay of protein kinase activity. *Chemistry & Biology* 11, 499-508.
- 20 4. Kleman-Leyer, K. M., Klink, T. A., Kopp, A. L., Westermeyer, T. A., Koeft, M. D., Larson, B. R., Worzella, T. J., Pinchard, C. A., van de Kar, S. A., Zaman, G. J., Hornberg, J. J. y Lowery, R. G. (2009) Characterization and optimization of a red-shifted fluorescence polarization ADP detection assay, *Assay and drug development technologies*.
5. Hang, L., Quinn, C. M. y Jia, Y. (2009) Evaluating the utility of the HTRF® Transcreeper™ ADP assay technology: A comparison with the standard HTRF assay technology. *Anal. Biochem.* 391, 31-38.
6. Lowery, R. G. y Kleman-Leyer, K. (2006) Transcreeper: screening enzymes involved in covalent regulation, *Expert opinion on therapeutic targets* 10, 179-90.
- 25 7. Kunzelmann, S. y Webb, M. R. (2009) A biosensor for fluorescent determination of ADP with high time resolution, *submitted*.
8. van den Ent, F., Maller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K. y Lowe, J. (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* 21, 6935-43.
- 30 9. Kasha, M. (1963) Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates. *Radiat. Res.* 20, 55-70.
10. Kasha, M., Rawls, H. R. y Ashraf El-Bayoumi, M. (1965) The exciton model in molecular spectroscopy, *Pure Appl. Chem.* 11, 371-392.
11. Scholes, G. D. y Ghiggino, K. P. (1994) Electronic interactions and interchromophore electron transfer. *J. Phys. Chem.* 98, 4580-4590.
- 35 12. Packard, B. Z., Topygin, D. D., Komoriya, A. y Brand, L. (1996) Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11640-11645.
13. Packard, B. Z., Topygin, D. D., Komoriya, A. y Brand, L. (1997) Design of profluorescent protease substrates guided by exciton theory. *Methods Enzymol* 278, 15-23.
- 40 14. Blackman, M. J., Corrie, J. E. T., Croney, J. C., Kelly, G., Eccleston, J. F. y Jameson, D. M. (2002) Structural and biochemical characterization of a fluorogenic rhodamine-labeled malarial protease substrate. *Biochemistry* 41, 12244-12252.
15. Okoh, M. P., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T., y Webb, M. R. (2006) A biosensor for inorganic phosphate using a rhodamine-labeled phosphate binding protein. *Biochemistry* 45, 14764 -14771.
- 45 16. Salje, J. y Lowe, J. (2008) Bacterial actin: architecture of the ParMRC plasmid DNA partitioning complex. *EMBO J.* 27, 2230-2238.
17. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. y Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4, 2411-2423.
18. Corrie, J. E. T. y Craik, J. S. (1994) Synthesis and characterisation of pure isomers of iodoacetamidotetramethylrhodamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2967-2974.

19. Garner, E. C., Campbell, C. S. y Mullins, R. D. (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306, 1021-5.

20. Popp, D., Yamamoto, A., Iwasa, M., Narita, A., Maeda, K. y Maeda, Y. (2007) Concerning the dynamic instability of actin homolog ParM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 109-14.

5 21. Popp, D., Iwasa, M., Maeda, K., Narita, A., Oda, T. y Maeda, Y. (2009) Protofilament Formation of ParM Mutants. *J. Mol. Biol.* 388, 209-217.

Bibliografía

1. Charter, N. W., Kauffman, L., Singh, R. y Eglen, R. M. (2006) A Generic, Homogenous Method for Measuring Kinase and Inhibitor Activity via Adenosine 5'-Diphosphate Accumulation. *J. Biomol. Screen.* 11, 390-399.

10 2. Srinivasan, J., Cload, S. T., Hamaguchi, N., Kurz, J., Keene, S., Kurz, M., Boomer, R. M., Blanchard, J., Epstein, D., Wilson, C. y Diener, J. L. (2004) ADP-specific detectors enable universal assay of protein kinase activity. *Chemistry & Biology* 11, 499-508.

3. Gilardi, G., Zhou, L. Q., Hibbert, L. y Cass, A. E. G. (1994) Engineering the maltose binding protein for reagentless fluorescence sensing. *Anal. Chem.* 66, 3840-3847.

15 4. Brune, M., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T. y Webb, M. R. (1994) Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry* 33, 8262-8271.

5. Salins, L. L., Ware, R. A., Ensor, C. M. y Daunert, S. (2001) A novel reagentless sensing system for measuring glucose based on the galactose/glucose-binding protein. *Anal Biochem* 294, 19-26.

20 6. Dattelbaum, J. D. y Lakowicz, J. R. (2001) Optical determination of glutamine using a genetically engineered protein, *Anal. Biochem.* 291, 89-95.

7. De Lorimier, R. M., Smith, J. J., Dwyer, M. A., Looger, L. L., Sali, K. M., Paavola, C. D., Rizk, S. S., Sadigov, S., Conrad, D. W., Loew, L. y Hellinga, H. W. (2002) Construction of a fluorescent biosensor family. *Protein Sci.* 11, 2655-2675.

25 8. Brune, M., Corrie, J. E. T. y Webb, M. R. (2001) A fluorescent sensor of the phosphorylation state of nucleoside diphosphate kinase and its use to monitor nucleoside diphosphate concentrations in real time, *Biochemistry* 40, 5087-5094.

9. Ebersbach, G. y Gerdes, K. (2005) Plasmid segregation mechanisms. *Annual Review of Genetics* 39, 453-79.

30 10. Dam, M. y Gerdes, K. (1994) Partitioning of plasmid R1. Ten direct repeats flanking the parA promoter constitute a centromere-like partition site parC, that expresses incompatibility. *J Mol Biol* 236, 1289-98.

11. Gerdes, K. y Molin, S. (1986) Partitioning of plasmid R1. Structural and functional analysis of the parA locus. *J Mol Biol* 190, 269-79.

12. Jensen, R. B., Dam, M. y Gerdes, K. (1994) Partitioning of plasmid R1. The parA operon is autoregulated by ParR and its transcription is highly stimulated by a downstream activating element, *J Mol Biol* 236, 1299-309.

35 13. Jensen, R. B., Lurz, R. y Gerdes, K. (1998) Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: replicon pairing by parC of plasmid R1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8550-5.

14. Orlova, A., Gomer, E. C., Galkin, V. E., Heuser, J., Mullins, R. D. y Egelman, E. H. (2007) The structure of bacterial ParM filaments. *Nat Struct Mol Biol* 14, 921-6.

40 15. van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K. y Lowe, J. (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* 21, 6935-43.

16. Moller-Jensen, J., Jensen, R. B., Lowe, J. y Gerdes, K. (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament, *The EMBO Journal* 21, 3119-27.

45 17. Moller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R. B., Roepstorff, P. y Gerdes, K. (2003) Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol Cell* 12, 1477-87.

18. Garner, E. C., Campbell, C. S., Weibel, D. B. y Mullins, R. D. (2007) Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science* 315, 1270-4.

19. Garner, E. C., Campbell, C. S. y Mullins, R. D. (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog, *Science* 306, 1021-5.
20. Moller-Jensen, J., Ringgaard, S., Mercogliano, C. P., Gerdes, K. y Lowe, J. (2007) Structural analysis of the ParR/parC plasmid partition complex. *The EMBO Journal* 26, 4413-22.
- 5 21. Popp, D., Akihiro Narita, A., Oda, T., Fujisawa, T., Matsuo, H., Nitana, Y., Iwasa, M., Maeda, K., Onishi, H. y Maeda, Y. (2008) Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *EMBO J.* 27, 570-579.
22. Popp, D., Yamamoto, A., Iwasa, M., Narita, A., Maeda, K. y Maeda, Y. (2007) Concerning the dynamic instability of actin homolog ParM. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 109-14.
- 10 23. Campbell, C. S. y Mullins, R. D. (2007) In vivo visualization of type II plasmid segregation: bacterial actin filaments pushing plasmids. *The Journal of Cell Biology* 179, 1059-66.
24. Kasha, M. (1963) Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates, *Radiat. Res.* 20, 55-70.
- 15 25. Kasha, M., Rawls, H. R. y Ashraf El-Bayoumi, M. (1965) The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* 11, 371-392.
26. Scholes, G. D. y Ghiggino, K. P. (1994) Electronic interactions and interchromophore electron transfer. *J. Phys. Chem.* 98, 4580-4590.
27. Packard, B. Z., Toptygin, D. D., Kornoriya, A. y Brand, L. (1996) Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 11640-11645.
- 20 28. Packard, B. Z., Toptygin, D. D., Komoriya, A. y Brand, L. (1997) Design of profluorescent protease substrates guided by exciton theory. *Methods Enzymol* 278, 15-23.
29. Blackman, M. J., Carrie, J. E. T., Croney, J. C., Kelly, G., Eccleston, J. F. y Jameson, D. M. (2002) Structural and biochemical characterization of a fluorogenic rhodamine-labeled malarial protease substrate. *Biochemistry* 41, 12244-12252.
- 25 30. Okoh, M. P., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T. y Webb, M. R. (2006) A biosensor for inorganic phosphate using a rhodamine-labeled phosphate binding protein. *Biochemistry* 45, 14764 -14771.
31. Dillingham, M. S., Wigley, D. B. y Webb, M. R. (2002) Direct measurement of single stranded DNA translocation by PcrA helicase using the fluorescent base analogue 2-aminopurine. *Biochemistry* 41, 643-651.
- 30 32. Av-Gay, Y. y Everett, M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* 8, 238-44.
33. Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Gicquel, B., Cole, S. T., y Alzari, P. M. (2006) The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J Bacteriol* 188, 7778-84.
34. Wehenkel, A., Fernandez, P., Bellinzoni, M., Catherinot, V., Baritone, N., Labesse, G., Jackson, M. y Alzari, P. M. (2006) The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor, suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria. *FEBS Lett* 580, 3018-22.
- 35 35. Szekely, R., Waczek, F., Szabadkai, I., Nemeth, G., Hegymegi-Barakonyi, B., Eros, D., Szokol, B., Pato, J., Hafenbradl, D., Satchell, J., Saint-Joanis, B., Cole, S. T., Orfi, L., Klebl, B. M. y Keri, G. (2008) A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signaling. *Immunology Letters* 116, 225-31.
36. Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S. T., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Cervenansky, C. y Alzari, P. M. (2005) Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J Mol Biol* 350, 953-63.
- 40 37. Van den Ent, F., Amos, L. A. y Lowe, J. (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413, 39-44.
38. Esue, O., Wirtz, D. y Tseng, Y. (2006) GTPase activity, structure, and mechanical properties of filaments assembled from bacterial cytoskeleton protein MreB. *J Bacteriol* 188, 968-76.
- 45 39. Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J. y Massidda, O. (2005) Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol Microbiol* 55, 699-711.

40. Roeben, A., Kofler, C., Nagy, I., Nickell, S., Hartl, F. U. y Bracher, A. (2006) Crystal structure of an archaeal actin homolog. *J Mol Biol* 358, 145-56.

41. Hara, F., Yamashiro, K., Nemoto, N., Ohta, Y., Yokobori, S., Yasunaga, T., Hisanaga, S. y Yamagishi, A. (2007) An actin homolog of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* that retains the ancient characteristics of eukaryotic actin. *J Bacteriol* 189, 2039-45.

5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Medical Research council Webb, Martin R

5 <120> Sensor

<130> P2754PC01

<160> 7

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 320

15 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Leu Val Phe Ile Asp Asp Gly Ser Thr Asn Ile Lys Leu Gln Trp
 1 5 10 15
 Gln Glu Ser Asp Gly Thr Ile Lys Gln His Ile Ser Pro Asn Ser Phe
 20 25 30
 Lys Arg Glu Trp Ala Val Ser Phe Gly Asp Lys Lys Val Phe Asn Tyr
 35 40 45
 Thr Leu Asn Gly Glu Gln Tyr Ser Phe Asp Pro Ile Ser Pro Asp Ala
 50 55 60
 Val Val Thr Thr Asn Ile Ala Trp Gln Tyr Ser Asp Val Asn Val Val
 65 70 75 80
 Ala Val His His Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Val
 85 90 95
 Asp Ile Val Cys Thr Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn
 100 105 110
 Gln Pro Asn Thr Glu Asn Ile Glu Arg Lys Lys Ala Asn Phe Arg Lys
 115 120 125
 Lys Ile Thr Leu Asn Gly Gly Asp Thr Phe Thr Ile Lys Asp Val Lys
 130 135 140
 Val Met Pro Glu Ser Ile Pro Ala Gly Tyr Glu Val Leu Gln Glu Leu
 145 150 155 160
 Asp Glu Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ile Asp Leu Gly Gly Thr Thr Leu
 165 170 175
 Asp Ile Ser Gln Val Met Gly Lys Leu Ser Gly Ile Ser Lys Ile Tyr
 180 185 190
 Gly Asp Ser Ser Leu Gly Val Ser Leu Val Thr Ser Ala Val Lys Asp
 195 200 205

Ala Leu Ser Leu Ala Arg Thr Lys Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Asp Asp
 210 215 220
 Ile Ile Ile His Arg Lys Asp Asn Asn Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Asn
 225 230 235 240
 Asp Glu Asn Lys Ile Ser Ile Val Thr Glu Ala Met Asn Glu Ala Leu
 245 250 255
 Arg Lys Leu Glu Gln Arg Val Leu Asn Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Thr His Val Met Val Ile Gly Gly Gly Ala Glu Leu Ile Cys Asp
 275 280 285
 Ala Val Lys Lys His Thr Gln Ile Arg Asp Glu Arg Phe Phe Lys Thr
 290 295 300
 Asn Asn Ser Gln Tyr Asp Leu Val Asn Gly Met Tyr Leu Ile Gly Asn
 305 310 315 320

<210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 2

Met Leu Val Phe Ile Asp Asp Gly Ser Thr Asn Ile Lys Leu Gln Trp
 1 5 10 15
 Gln Glu Ser Asp Gly Thr Ile Lys Gln His Cys Ser Pro Asn Ser Phe
 20 25 30
 Lys Arg Glu Trp Ala Val Ser Phe Gly Asp Lys Lys Val Phe Asn Tyr
 35 40 45
 Thr Leu Asn Gly Glu Gln Tyr Ser Phe Asp Pro Ile Ser Pro Asp Ala
 50 55 60
 Val Val Thr Thr Asn Ile Ala Trp Gln Tyr Ser Asp Val Asn Val Val
 65 70 75 80
 Ala Val His His Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Val
 85 90 95
 Asp Ile Val Cys Thr Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn
 100 105 110
 Gln Pro Asn Thr Glu Asn Ile Glu Arg Lys Lys Ala Asn Phe Arg Lys
 115 120 125
 Lys Ile Thr Leu Asn Gly Gly Asp Thr Phe Thr Ile Lys Asp Val Lys
 130 135 140

ES 2 394 156 T3

Val Met Pro Glu Ser Ile Pro Ala Gly Tyr Glu Val Leu Gln Glu Leu
145 150 155 160

Asp Glu Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ile Asp Leu Gly Gly Ala Asn Leu
165 170 175

Asp Ile Ser Gln Val Met Gly Lys Leu Ser Gly Ile Ser Lys Ile Tyr
180 185 190

Gly Asp Ser Ser Leu Gly Val Ser Leu Val Thr Ser Ala Val Lys Asp
195 200 205

Ala Leu Ser Leu Ala Arg Thr Lys Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Asp Asp
210 215 220

Ile Ile Ile His Arg Lys Asp Asn Asn Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Asn
225 230 235 240

Asp Glu Asn Lys Ile Ser Ile Val Thr Glu Ala Met Asn Glu Ala Leu
245 250 255

Arg Lys Leu Glu Gln Arg Val Leu Asn Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
260 265 270

Tyr Thr His Val Met Val Ile Gly Gly Gly Ala Glu Leu Ile Ala Asp
275 280 285

Ala Val Lys Lys His Thr Gln Ile Arg Asp Glu Arg Phe Phe Lys Thr
290 295 300

Asn Asn Ser Gln Tyr Asp Leu Val Asn Gly Met Tyr Leu Ile Gly Asn
305 310 315 320

Gln Ser Gly Ser His His His His His His
325 330

<210> 3

<211> 320

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Leu Val Phe Ile Asp Asp Gly Ser Thr Asn Ile Lys Leu Gln Trp
1 5 10 15

Gln Glu Ser Asp Gly Thr Ile Lys Gln His Ile Ser Pro Asn Ser Phe
20 25 30

Lys Arg Glu Trp Ala Val Ser Phe Gly Asp Lys Lys Val Phe Asn Tyr
35 40 45

Thr Leu Asn Gly Glu Gln Tyr Ser Phe Asp Pro Ile Ser Pro Cys Ala
50 55 60

ES 2 394 156 T3

Val Val Thr Thr Asn Ile Ala Trp Gln Tyr Ser Asp Val Asn Val Val
65 70 75 80

Ala Val His His Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Val
85 90 95

Asp Ile Val Cys Thr Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn
100 105 110

Gln Pro Asn Thr Glu Asn Ile Glu Arg Lys Lys Ala Asn Phe Arg Lys
115 120 125

Lys Ile Thr Leu Asn Gly Gly Asp Thr Phe Thr Ile Lys Asp Val Lys
130 135 140

Val Met Pro Glu Ser Ile Pro Ala Gly Tyr Glu Val Leu Gln Glu Leu
145 150 155 160

Asp Glu Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ile Asp Leu Gly Gly Thr Thr Leu
165 170 175

Asp Ile Ser Gln Val Met Gly Lys Leu Ser Gly Ile Ser Lys Ile Tyr
180 185 190

Gly Asp Ser Ser Leu Gly Val Ser Leu Val Thr Ser Ala Val Lys Asp
195 200 205

Ala Leu Ser Leu Ala Arg Thr Lys Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Asp Cys
210 215 220

Ile Ile Ile His Arg Lys Asp Asn Asn Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Asn
225 230 235 240

Asp Glu Asn Lys Ile Ser Ile Val Thr Glu Ala Met Asn Glu Ala Leu
245 250 255

Arg Lys Leu Glu Gln Arg Val Leu Asn Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
260 265 270

Tyr Thr His Val Met Val Ile Gly Gly Gly Ala Glu Leu Ile Ala Asp
275 280 285

Ala Val Lys Lys His Thr Gln Ile Arg Asp Glu Arg Phe Phe Lys Thr
290 295 300

Asn Asn Ser Gln Tyr Asp Leu Val Asn Gly Met Tyr Leu Ile Gly Asn
305 310 315 320

<210> 4
<211> 320
<212> PRT
<213> Escherichia coli

5

<400> 4

ES 2 394 156 T3

Met Leu Val Phe Ile Asp Asp Gly Ser Thr Asn Ile Lys Leu Gln Trp
1 5 10 15

Gln Glu Ser Asp Gly Thr Ile Lys Gln His Ile Ser Pro Asn Ser Phe
20 25 30

Lys Arg Glu Trp Ala Val Ser Phe Gly Asp Lys Lys Val Phe Asn Tyr
35 40 45

Thr Leu Asn Gly Glu Gln Tyr Ser Phe Asp Pro Ile Ser Pro Cys Ala
50 55 60

Val Val Thr Thr Asn Ile Ala Trp Gln Tyr Ser Asp Val Asn Val Val
65 70 75 80

Ala Val His His Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Val
85 90 95

Asp Ile Val Cys Thr Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn
100 105 110

Gln Pro Asn Thr Glu Asn Ile Glu Arg Lys Lys Ala Asn Phe Arg Lys
115 120 125

Lys Ile Thr Leu Asn Gly Gly Asp Thr Phe Thr Ile Lys Asp Val Lys
130 135 140

Val Met Pro Glu Ser Ile Pro Ala Gly Tyr Glu Val Leu Gln Glu Leu
145 150 155 160

Asp Glu Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ile Asp Leu Gly Gly Thr Thr Leu
165 170 175

Asp Ile Ser Gln Val Met Gly Lys Leu Ser Gly Ile Ser Lys Ile Tyr
180 185 190

Gly Asp Ser Ser Leu Gly Val Ser Leu Val Thr Ser Ala Val Lys Asp
195 200 205

Ala Leu Ser Leu Ala Arg Thr Cys Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Asp Asp
210 215 220

Ile Ile Ile His Arg Lys Asp Asn Asn Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Asn
225 230 235 240

Asp Glu Asn Lys Ile Ser Ile Val Thr Glu Ala Met Asn Glu Ala Leu
245 250 255

Arg Lys Leu Glu Gln Arg Val Leu Asn Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
260 265 270

Tyr Thr His Val Met Val Ile Gly Gly Gly Ala Glu Leu Ile Ala Asp
275 280 285

ES 2 394 156 T3

Ala Val Lys Lys His Thr Gln Ile Arg Asp Glu Arg Phe Phe Lys Thr
 290 295 300

Asn Asn Ser Gln Tyr Asp Leu Val Asn Gly Met Tyr Leu Ile Gly Asn
 305 310 315 320

<210> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 5
 Met Leu Val Phe Ile Asp Asp Gly Ser Thr Asn Ile Lys Leu Gln Trp
 1 5 10 15

Gln Glu Ser Asp Gly Thr Ile Lys Gln His Cys Ser Pro Asn Ser Phe
 20 25 30

Ala Arg Glu Trp Ala Val Ser Phe Gly Asp Lys Lys Val Phe Asn Tyr
 35 40 45

Thr Leu Asn Gly Glu Gln Tyr Ser Phe Asp Pro Ile Ser Pro Asp Ala
 50 55 60

Val Val Thr Thr Asn Ile Ala Trp Gln Tyr Ser Asp Val Asn Val Val
 65 70 75 80

Ala Val His His Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Val
 85 90 95

Asp Ile Val Cys Thr Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn
 100 105 110

Gln Pro Asn Thr Glu Asn Ile Glu Arg Lys Lys Ala Asn Phe Arg Lys
 115 120 125

Lys Ile Thr Leu Asn Gly Gly Asp Thr Phe Thr Ile Lys Asp Val Lys
 130 135 140

Val Met Pro Glu Ser Ile Pro Ala Gly Tyr Glu Val Leu Gln Glu Leu
 145 150 155 160

Asp Glu Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ile Asp Leu Gly Gly Ala Asn Leu
 165 170 175

Asp Ile Ser Gln Val Met Gly Lys Leu Ser Gly Ile Ser Lys Ile Tyr
 180 185 190

Gly Asp Ser Ser Leu Gly Val Ser Leu Val Thr Ser Ala Val Lys Asp
 195 200 205

Ala Leu Ser Leu Ala Arg Thr Lys Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Asp Asp
 210 215 220

Ile Ile Ile His Arg Lys Asp Asn Asn Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Asn
 225 230 235 240

Asp Glu Asn Lys Ile Ser Ile Val Thr Glu Ala Met Asn Glu Ala Leu
 245 250 255

Arg Lys Leu Glu Gln Arg Val Leu Asn Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
 260 265 270

Tyr Thr His Val Met Val Ile Gly Gly Gly Ala Glu Leu Ile Ala Asp
 275 280 285

Ala Val Lys Lys His Thr Gln Ile Arg Asp Glu Arg Phe Phe Lys Thr
 290 295 300

Asn Asn Ser Gln Tyr Asp Leu Val Asn Gly Met Tyr Leu Ile Gly Asn
 305 310 315 320

Gln Ser Gly Ser His His His His His His
 325 330

<210> 6
 <211> 330
 <212> PRT
 5 <213> Escherichia coli

<400> 6
 Met Leu Val Phe Ile Asp Asp Gly Ser Thr Asn Ile Lys Leu Gln Trp
 1 5 10 15

Gln Glu Ser Asp Gly Thr Ile Lys Gln His Ile Ser Pro Asn Ser Phe
 20 25 30

Lys Arg Glu Trp Ala Val Ser Phe Gly Asp Lys Lys Val Phe Asn Tyr
 35 40 45

Thr Leu Asn Gly Glu Gln Tyr Ser Phe Asp Pro Ile Ser Pro Cys Ala
 50 55 60

Val Val Thr Thr Asn Ile Ala Trp Gln Tyr Ser Asp Val Asn Val Val
 65 70 75 80

Ala Val His His Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Val
 85 90 95

Asp Ile Val Cys Thr Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn
 100 105 110

Gln Pro Asn Thr Glu Asn Ile Glu Arg Lys Lys Ala Asn Phe Arg Lys
 115 120 125

Lys Ile Thr Leu Asn Gly Gly Asp Thr Phe Thr Ile Lys Asp Val Lys
 130 135 140

ES 2 394 156 T3

Val Met Pro Glu Ser Ile Pro Ala Gly Tyr Glu Val Leu Gln Glu Leu
145 150 155 160

Asp Glu Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ile Asp Leu Gly Gly Ala Asn Leu
165 170 175

Asp Ile Ser Gln Val Met Gly Lys Leu Ser Gly Ile Ser Lys Ile Tyr
180 185 190

Gly Asp Ser Ser Leu Gly Val Ser Leu Val Thr Ser Ala Val Lys Asp
195 200 205

Ala Leu Ser Leu Ala Arg Thr Lys Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Asp Cys
210 215 220

Ile Ile Ile His Arg Lys Asp Asn Asn Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Asn
225 230 235 240

Asp Glu Asn Lys Ile Ser Ile Val Thr Glu Ala Met Asn Glu Ala Leu
245 250 255

Arg Lys Leu Glu Gln Arg Val Leu Asn Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
260 265 270

Tyr Thr His Val Met Val Ile Gly Gly Gly Ala Glu Leu Ile Ala Asp
275 280 285

Ala Val Lys Lys His Thr Gln Ile Arg Asp Glu Arg Phe Phe Lys Thr
290 295 300

Asn Asn Ser Gln Tyr Asp Leu Val Asn Gly Met Tyr Leu Ile Gly Asn
305 310 315 320

Gln Ser Gly Ser His His His His His His
325 330

<210> 7

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 7

Met Leu Val Phe Ile Asp Asp Gly Ser Thr Asn Ile Lys Leu Gln Trp
1 5 10 15

Gln Glu Ser Asp Gly Thr Ile Lys Gln His Ile Ser Pro Asn Ser Phe
20 25 30

Ala Arg Glu Trp Ala Val Ser Phe Gly Asp Lys Lys Val Phe Asn Tyr
35 40 45

Thr Leu Asn Gly Glu Gln Tyr Ser Phe Asp Pro Ile Ser Pro Cys Ala
50 55 60

ES 2 394 156 T3

Val Val Thr Thr Asn Ile Ala Trp Gln Tyr Ser Asp Val Asn Val Val
 65 70 75 80
 Ala Val His His Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Val
 85 90
 Asp Ile Val Cys Thr Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn
 100 105 110
 Gln Pro Asn Thr Glu Asn Ile Glu Arg Lys Lys Ala Asn Phe Arg Lys
 115 120 125
 Lys Ile Thr Leu Asn Gly Gly Asp Thr Phe Thr Ile Lys Asp Val Lys
 130 135 140
 Val Met Pro Glu Ser Ile Pro Ala Gly Tyr Glu Val Leu Gln Glu Leu
 145 150 155 160
 Asp Glu Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ile Asp Leu Gly Gly Ala Asn Leu
 165 170 175
 Asp Ile Ser Gln Val Met Gly Lys Leu Ser Gly Ile Ser Lys Ile Tyr
 180 185 190
 Gly Asp Ser Ser Leu Gly Val Ser Leu Val Thr Ser Ala Val Lys Asp
 195 200 205
 Ala Leu Ser Leu Ala Arg Thr Lys Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Asp Cys
 210 215 220
 Ile Ile Ile His Arg Lys Asp Asn Asn Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Asn
 225 230 235 240
 Asp Glu Asn Lys Ile Ser Ile Val Thr Glu Ala Met Asn Glu Ala Leu
 245 250 255
 Arg Lys Leu Glu Gln Arg Val Leu Asn Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Thr His Val Met Val Ile Gly Gly Gly Ala Glu Leu Ile Ala Asp
 275 280 285
 Ala Val Lys Lys His Thr Gln Ile Arg Asp Glu Arg Phe Phe Lys Thr
 290 295 300
 Asn Asn Ser Gln Tyr Asp Leu Val Asn Gly Met Tyr Leu Ile Gly Asn
 305 310 315 320
 Gln ser Gly Ser His His His His His His
 325 330

REIVINDICACIONES

1. Molécula fijadora de ADP que comprende un polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a al menos los aminoácidos 11 a 310 de SEQ ID n.º 1, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución respecto a la SEQ ID n.º 1 en el aminoácido C287, y en donde dicho polipéptido comprende un resto de cisteína adicional para la conexión de al menos un resto indicador, y en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 68% con la SEQ ID n.º 1 en los restos de aminoácidos presentes en dicho polipéptido que corresponden a los mostrados en la columna III de la tabla A.
2. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende una o más sustituciones respecto a la SEQ ID n.º 1 en uno o más restos de aminoácidos seleccionados entre D6, G8, S9, T10, K13, N69, T101, E148, D170, G172, G173, T174, T175, D177, D223, I227, E284 o Q308.
3. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones seleccionadas entre:
- (i) I27C; o
 - (ii) D63C y K216C; o
 - (iii) D63C y D224C.
4. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones adicionales seleccionadas entre:
- (iv) T175N; o
 - (v) T174A y T175A; o
 - (vi) T174A y T175N; o
 - (vii) T175L.
5. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución o sustituciones adicionales seleccionadas entre:
- (iv) T175N; o
 - (v) T174A y T175A; o
 - (vi) T174A y T175N.
6. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución adicional de K33A.
7. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende al menos un fluoróforo conectado a ésta, en donde dicho fluoróforo está conectado a una posición en el polipéptido de tal forma que el cambio conformacional del polipéptido tras la fijación del ADP ocasiona un cambio correspondiente en la fluorescencia de dicho fluoróforo.
8. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el o cada fluoróforo está conectado al polipéptido a través de un resto de aminoácido que corresponde a uno o más de I27C, D63C, K216C o D224C.
9. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha molécula comprende adicionalmente al menos un resto *N*-[2-(1-maleimidil)etil]-7-dietilaminocumarin-3-carboxamida (MDCC) conectado a ésta.
10. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha molécula comprende adicionalmente al menos dos restos 5-yodoacetamidotetrametilrodamina (5-IATR) conectados a ésta.
11. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha molécula comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 5.
12. Molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha molécula comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 6 o SEQ ID n.º 7.
13. Ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la porción polipeptídica de una molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

- 5
14. Procedimiento para monitorizar los cambios de la concentración de ADP de una muestra, que comprende poner en contacto dicha muestra con una molécula fijadora de ADP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y determinar los cambios de conformación de dicha molécula fijadora de ADP, en donde los cambios de conformación de dicha molécula fijadora de ADP indican cambios de la concentración de ADP en dicha muestra.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la conformación de dicha molécula fijadora de ADP se monitoriza mediante la medición de cambios de fluorescencia de un fluoróforo comprendido por dicha molécula fijadora de ADP.

Figura 1

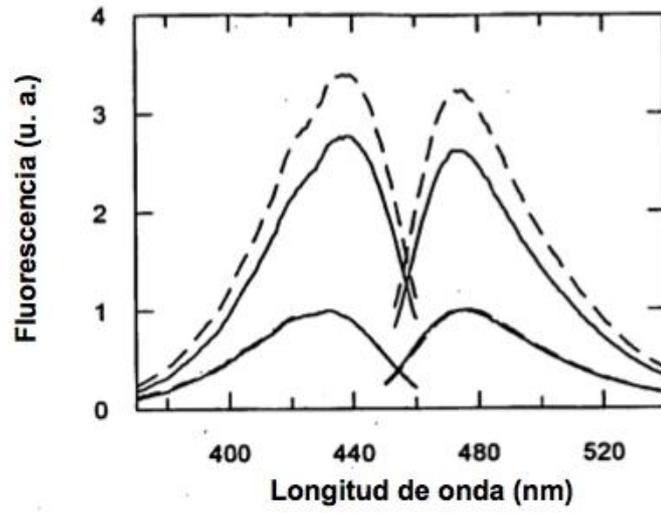


Figura 2A

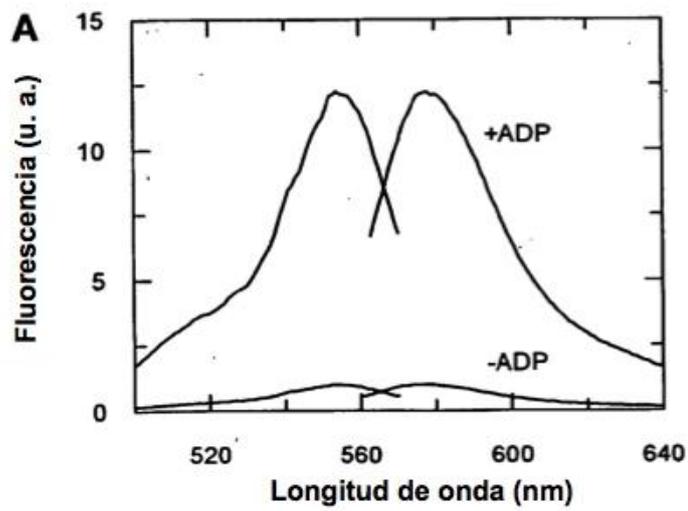


Figura 2B

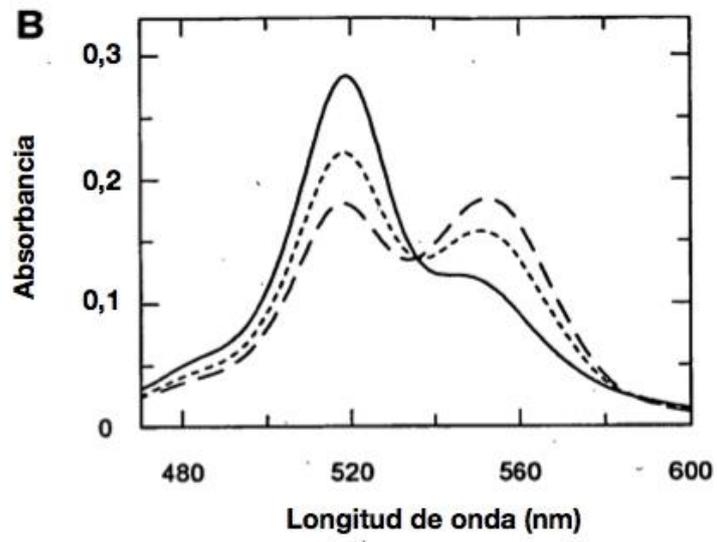


Figura 3

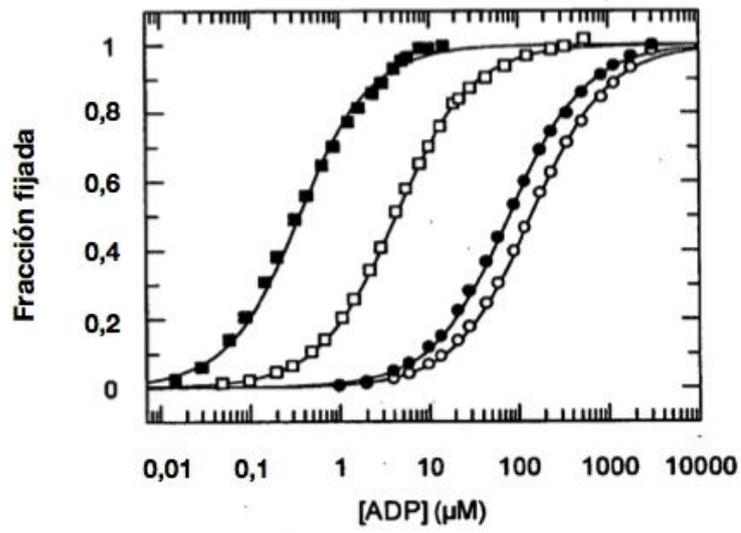


Figura 4

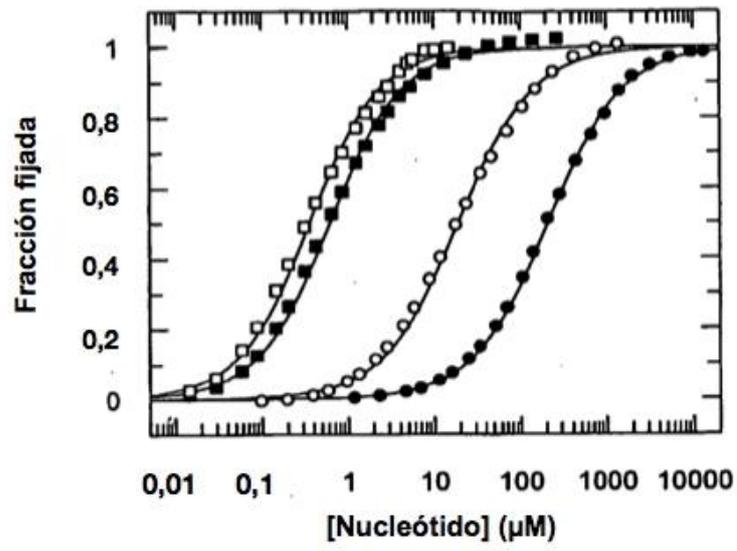


Figura 5A

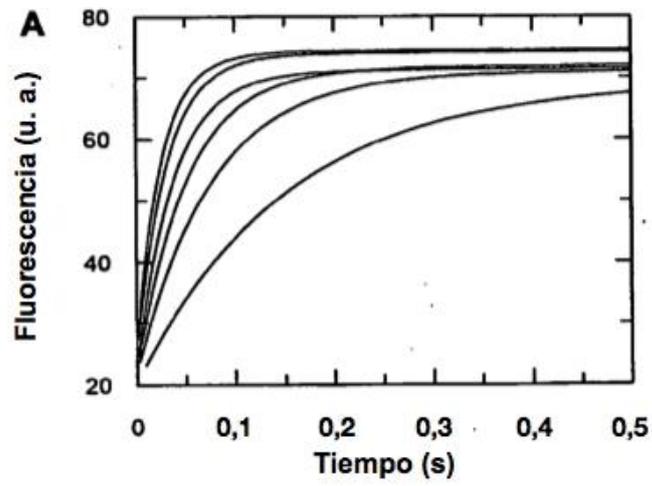


Figura 5B

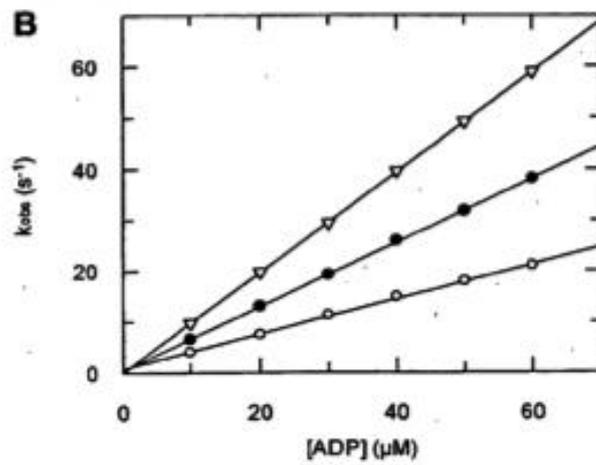


Figura 5C

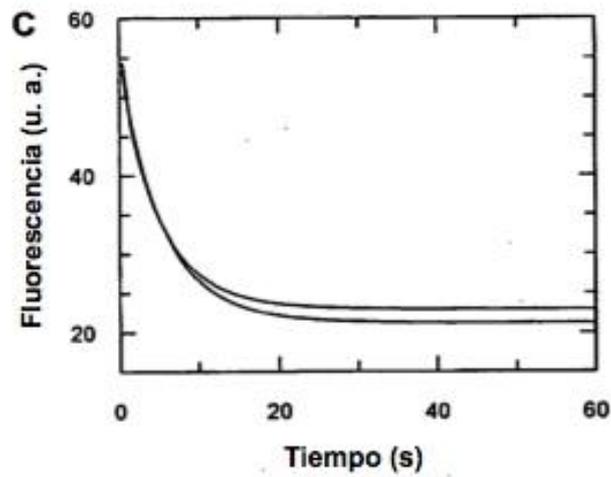


Figura 6A

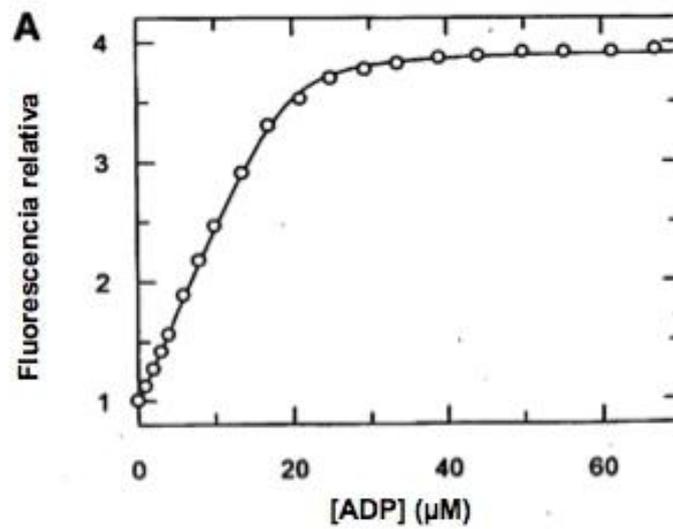


Figura 6B

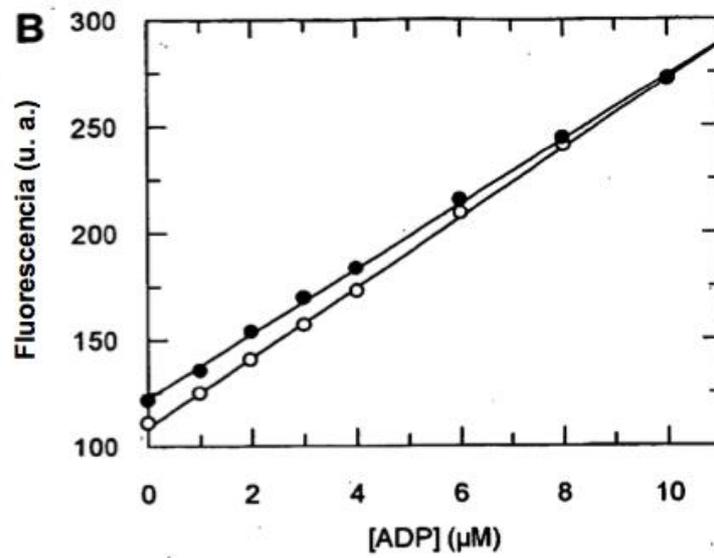


Figura 7A

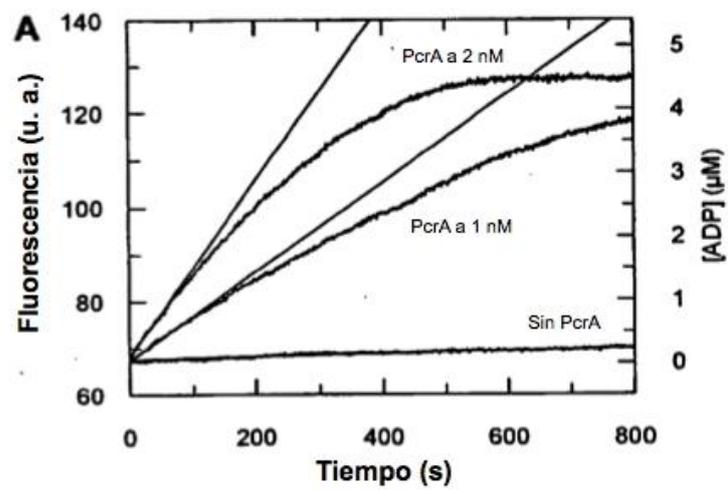


Figura 7B

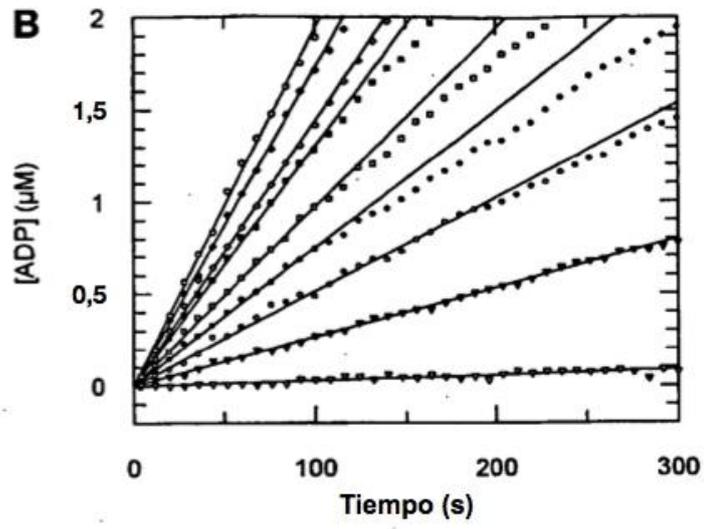


Figura 7C

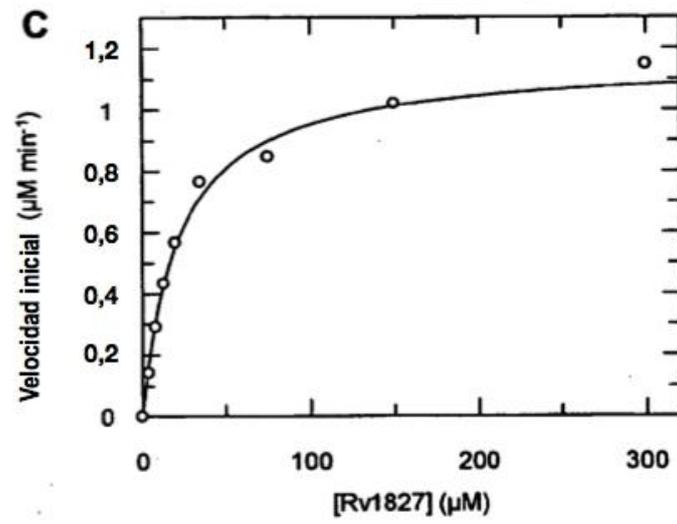


Figura 8

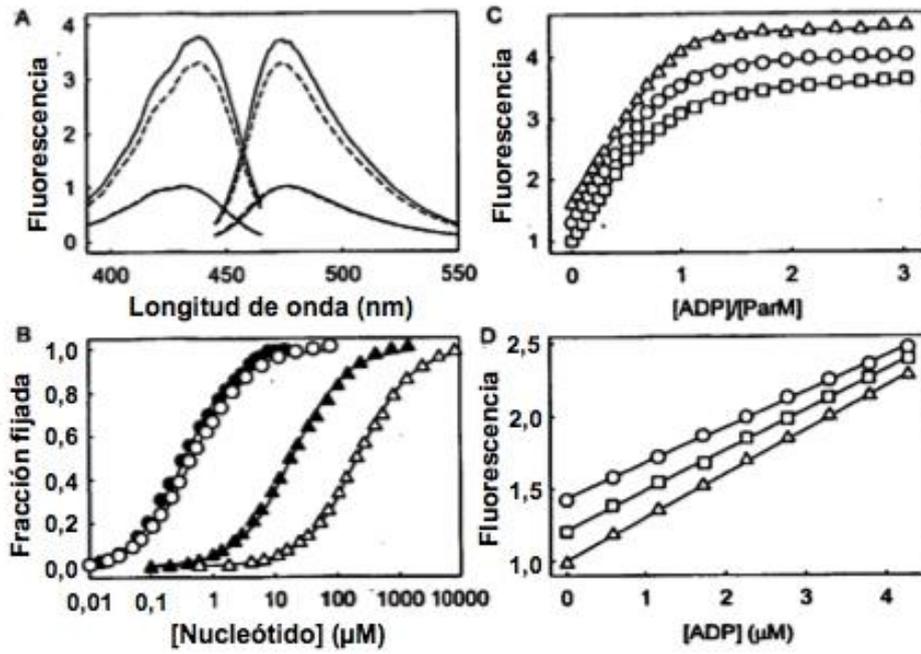


Figura 9

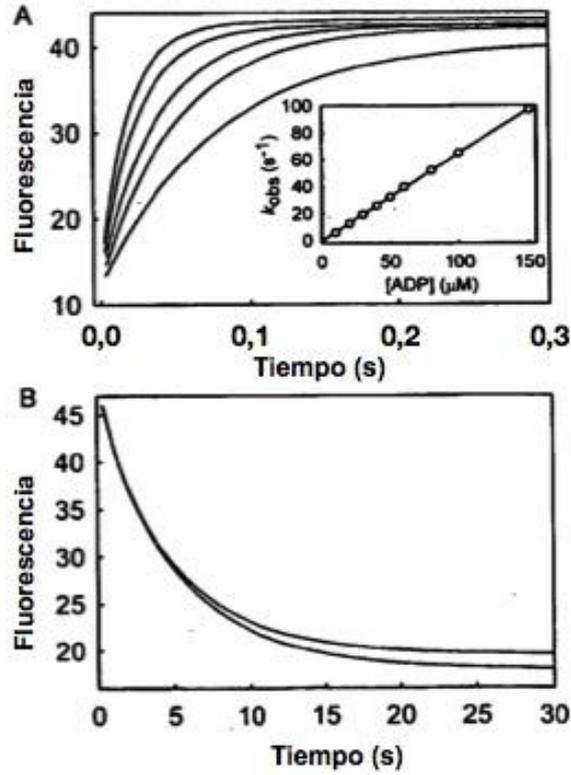


Figura 10

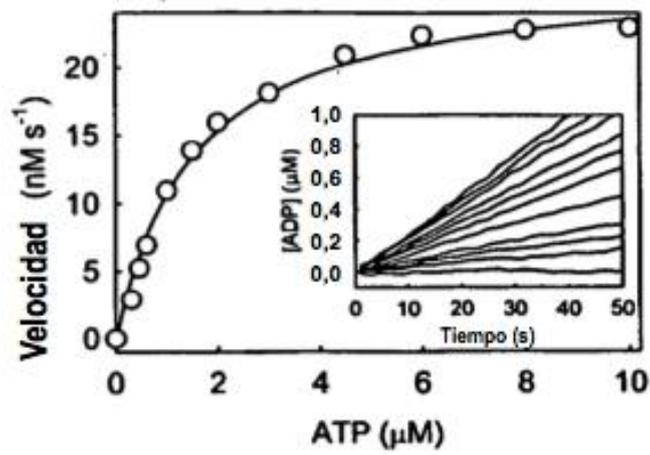


Figura 11

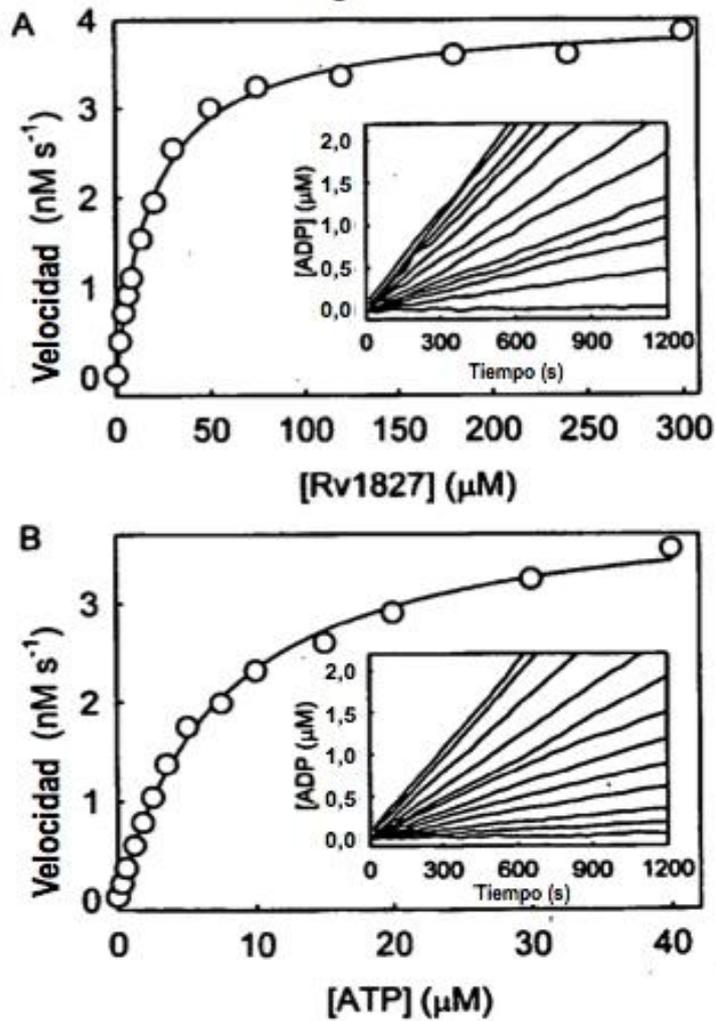


Figura 12

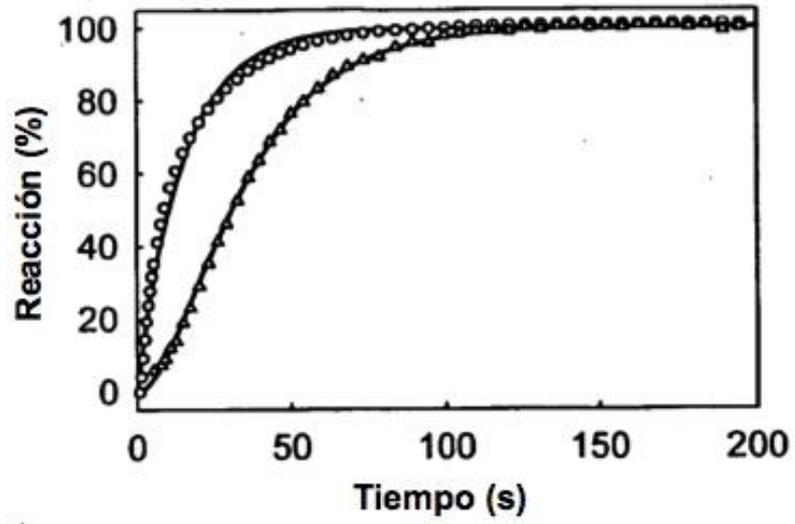


Figura 13

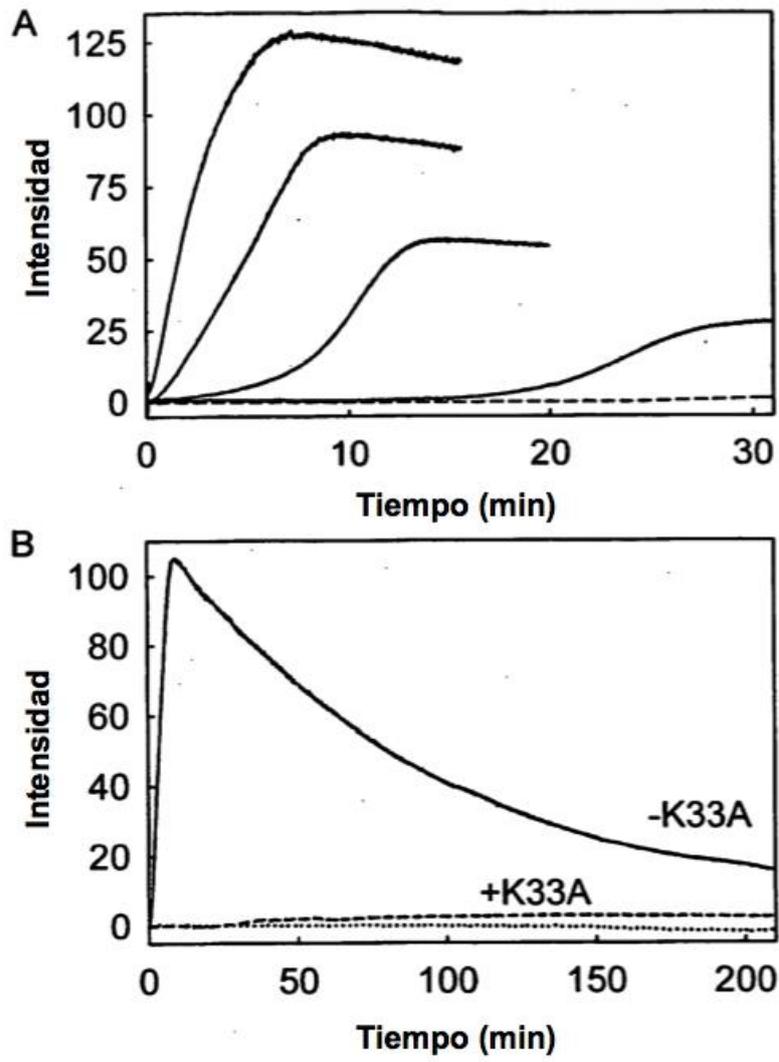


Figura 14

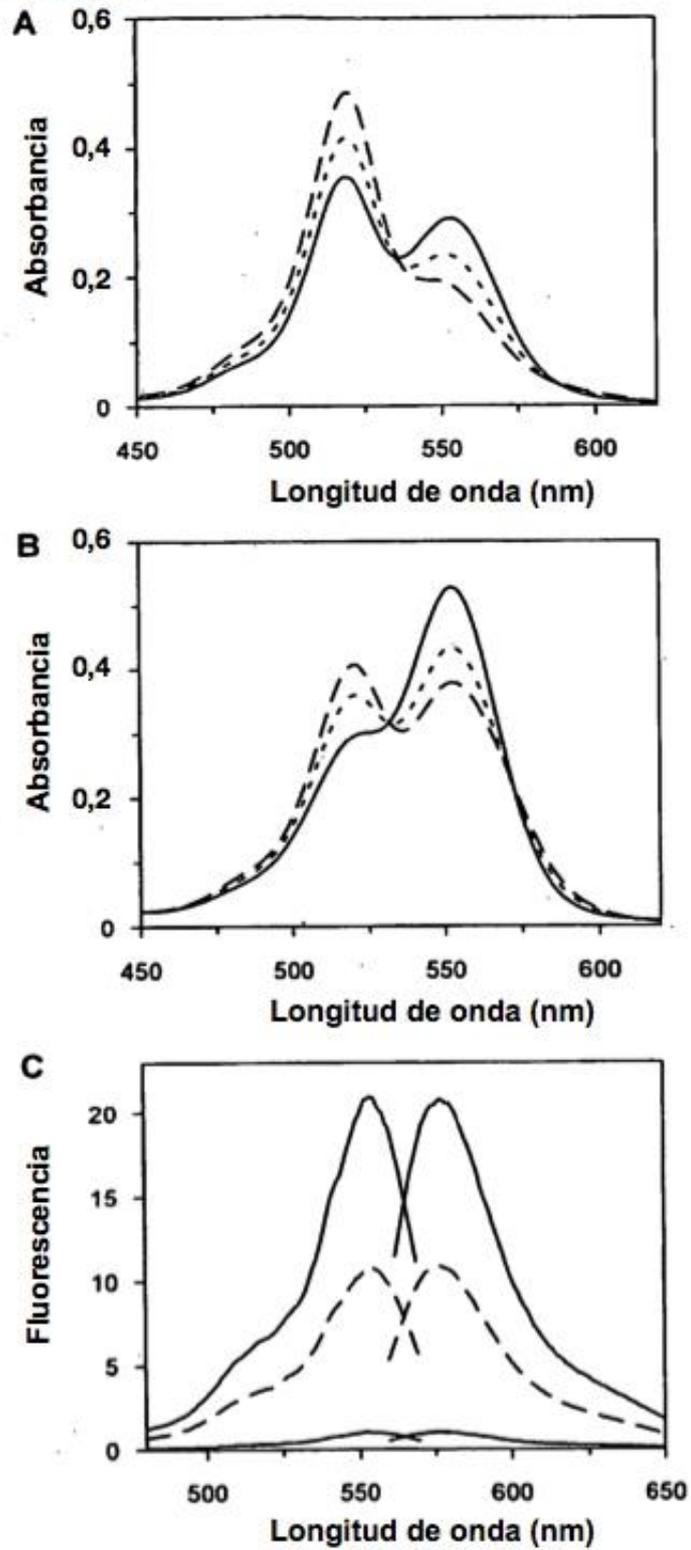


Figura 15

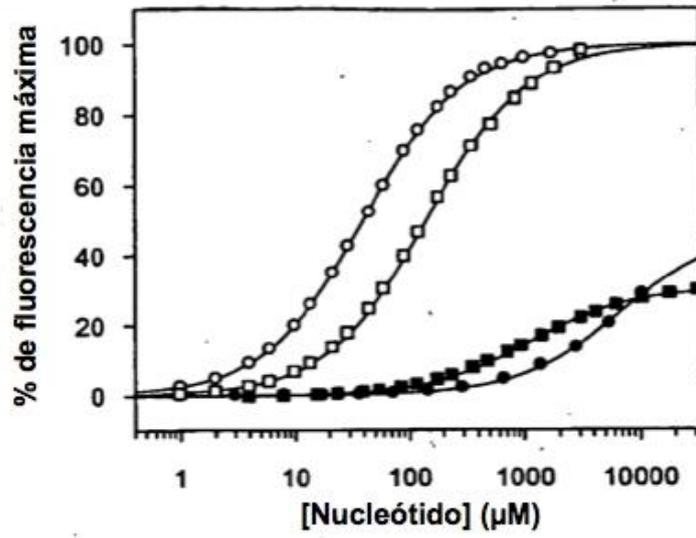


Figura 16

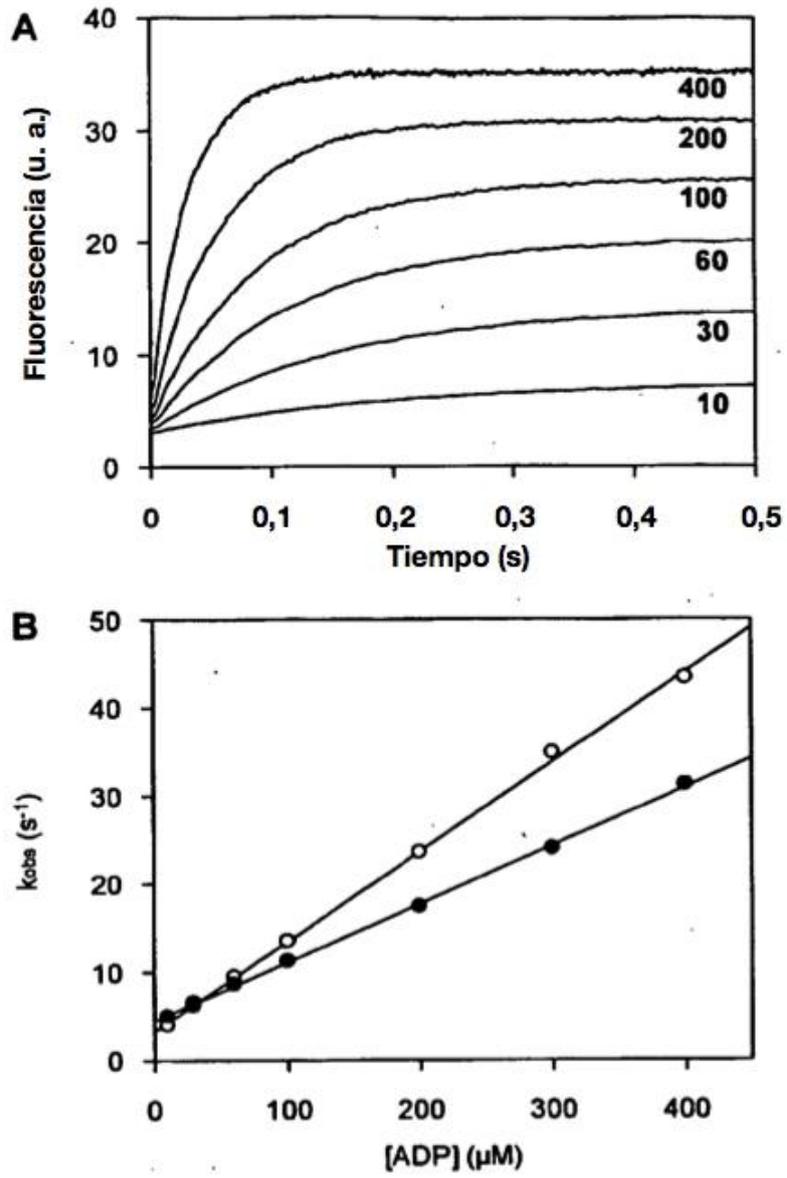


Figura 17

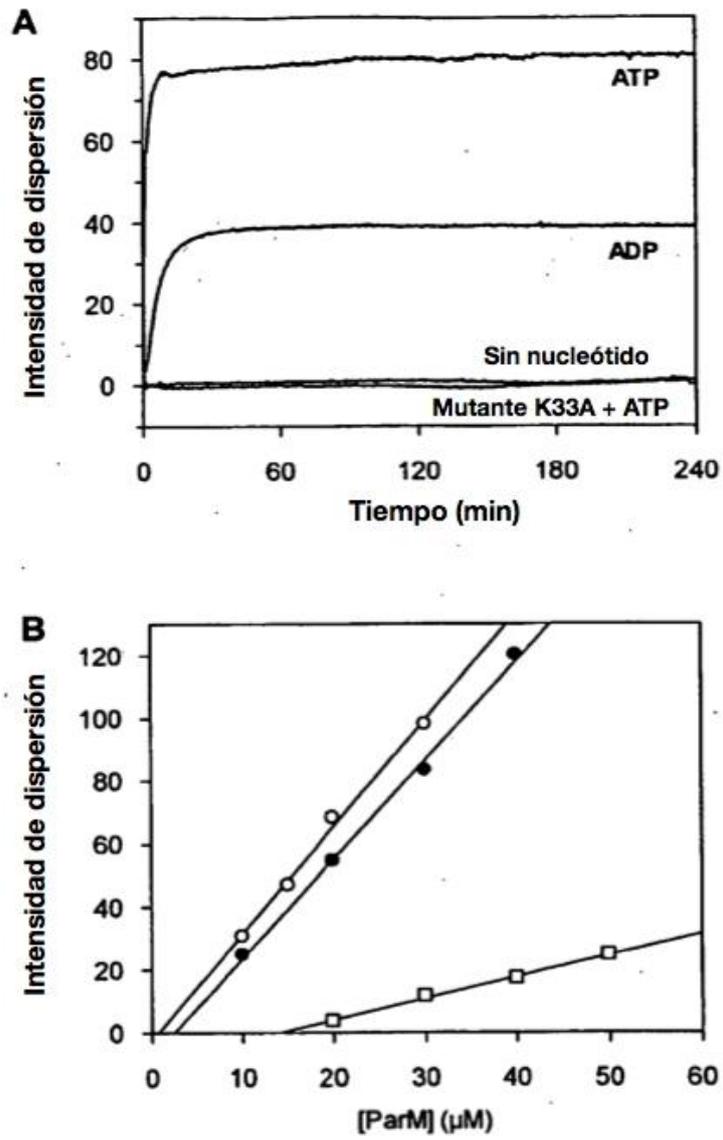


Figura 18

