

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 279**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2008 E 08762330 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2170937**

54 Título: **Proteína marcada de unión a DNA monocatenario y su uso en un biosensor para detectar y visualizar un DNA monocatenario**

30 Prioridad:

12.06.2007 GB 0711328

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

04.07.2014

73 Titular/es:

**MEDICAL RESEARCH COUNCIL (50.0%)
2nd Floor, David Phillips Building, Polaris House,
North Star Avenue
Swindon, SN2 1FL , GB y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DILLINGHAM, MARK;
KOWALCZYKOWSKI, STEPHEN, C. y
WEBB, MARTIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 473 279 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

Proteína marcada de unión a DNA monocatenario y su uso en un biosensor para detectar y visualizar un DNA monocatenario

Campo de la técnica

- 5 Esta invención se refiere a ensayos de DNA monocatenario, particularmente a la detección y visualización de DNA monocatenario en soluciones biológicas. Más particularmente, la presente invención se refiere a una proteína modificada de dominio de unión de DNA monocatenario, familia SSB, y al uso de una proteína tal en un ensayo biológico.

Antecedentes de la técnica

- 10 La formación y mantenimiento de DNA monocatenario (ssDNA) es una parte importante de muchos procesos que implican DNA. Por ejemplo, la separación de cadenas de DNA de doble hélice (bicatenario) (dsDNA) está catalizada por helicasas y esta exposición de las bases situadas sobre el DNA permite un tratamiento posterior, tal como la reparación o replicación. Los ensayos de actividad de helicasas son una parte importante de la comprobación de procesos biológicos relacionados.

- 15 Aun cuando existen métodos para medir ssDNA, en oposición a dsDNA, en ensayos en tiempo real, la sensibilidad y la resolución en tiempo han sido limitadas. En general, ensayos basados en fluorescencia han proporcionado la combinación de alta sensibilidad y alta resolución en tiempo que se requieren para estos tipos de medidas. Hay varios colorantes que proporcionan señales de fluorescencia para verificar la transformación de dsDNA en ssDNA. [1,2], pero muchos de ellos se unen específicamente en las estrías del dsDNA y la fluorescencia disminuye al desprenderse del DNA a medida que tiene lugar la separación de las cadenas. Este tipo de sonda puede no ser adecuado para extensiones de reacción bajas, dado que se basa en la medida de una pequeña disminución de fluorescencia frente a un ruido de fondo grande. Además, los colorantes que se unen a DNA bicatenario pueden inhibir las enzimas que actúan sobre tal DNA.

- 20 La obtención de un cambio cuantitativo de señal combinado con especificidad para el ssDNA y la discriminación frente a otras moléculas similares, tales como dsDNA, que pueden encontrarse presentes en el ensayo, proporciona un reto científico considerable.

D4 (Wan y Le 2000 Anal. Chem. vol. 72, páginas 5583-5589) describen estudios de interacciones de proteína-DNA por polarización de fluorescencia inducida por electroforesis capilar/láser.

D5 (US2005/0037377) describe la detección de factores de unión con polarización de fluorescencia.

30 Descripción de la invención

- En la presente invención se ha puesto de manifiesto que la modificación de una proteína de dominio de unión de DNA monocatenario, familia SSB, (en lo sucesivo denominada en esta memoria simplemente SSB), con objeto de unir un marcador fluorescente, da como resultado una SSB modificada que es capaz de actuar como biosensor sin requerir cofactores. La SSB interacciona con DNA monocatenario y DNA bicatenario desarrollado. La proteína modificada puede utilizarse en ensayos cinéticos con alta sensibilidad y alta resolución en tiempo para comprobar el desenrollamiento de dsDNA, por ejemplo en ensayos en tiempo real de la actividad de helicasas in vitro, o en aplicaciones tales como estudios de moléculas aisladas y ensayos de alta productividad.

- 35 Así pues, la invención proporciona una SSB modificada que comprende, al menos, un marcador detectable unido a un aminoácido de la proteína, en donde las características del marcador detectable se alteran al unir DNA monocatenario.

- 40 Un cambio de fluorescencia intrínseca ha sido observado antes en relación con la SSB. Existe una disminución de fluorescencia del triptófano cuando la SSB se une a DNA, y este hecho ha sido utilizado como sonda para la separación de cadenas de DNA [3] e interacciones de SSB-DNA [15]. No obstante, estos ensayos demuestran una sensibilidad menor en uno o dos órdenes de magnitud que el uso de la SSB modificada de la presente invención. Además, los ensayos que se basan en los cambios de la fluorescencia intrínseca del triptófano tienen limitaciones debidas a fotoblanqueo y a interferencia procedente de otras especies que absorben en la misma región de radiaciones UV que el triptófano. También se ha preparado SSB marcada isotópicamente [46].

- 45 Biosensores que no requieren cofactores y que están basados en proteínas fluorescentes han tenido éxito en varios casos proporcionando sondas rápidas de concentración de moléculas en ensayos biológicos. Tales biosensores reaccionan con la moléculas de interés produciendo un cambio de señal de la fluorescencia. Existen diversos ejemplos de este tipo de biosensores sin reactivo, tales como de fosfato [4], glucosa [5] y maltosa [6]. Varios estudios realizados describen este enfoque general [7, 8 y 9].

La familia de proteínas de dominio de unión de DNA monocatenario:

La familia de proteínas de dominio de unión de DNA monocatenario (familia SSB) constituye un ejemplo de una familia de proteínas que interaccionan con DNA monocatenario y DNA bicatenario desenrollado. Esta familia de proteínas está definida en la base de datos SCOP [10] y posee una estructura todo-beta con un pliegue OB (barrilete, cerrado; $n=5$, $S=10$). Es la familia 50263. Esta familia es distinta de la familia SCOP 50315 que tiene la estructura de un pliegue OB (barrilete, abierto; $n^*=5$, $S^*=8$). Otras proteínas de unión de cadenas aisladas que no son miembros de la familia 50263 figuran descritas en [47] y [48]. La familia SSB de proteínas desempeña un papel esencial en la replicación, recombinación y reparación de DNA, tanto en procariotas como en eucariotas. Han sido investigados miembros de esta familia de proteínas que proceden de diversos organismos procaríóticos y existen estructuras de la proteína que procede de *Escherichia coli*, en presencia y ausencia de DNA.

La SSB puede ser eucariótica o procariótica. La SSB procariótica puede ser bacteriana. Como ejemplos de SSBs bacterianas se incluyen las representadas en la Figura 8, tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus licheniformis*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas syringae* y *Listeria innocua*, así como también *T. aquaticus*, *M. smegmatis* y *D. radiodurans*.

Preferiblemente, la SSB modificada de la presente invención es una proteína SSB de *E. coli* modificada. La secuencia de la SSB de *E. coli* nativa es como sigue (número de catálogo gil 790494; SEQ ID NO: 1 en esta memoria):

```
MASRGVNVKVLVGNLQDPEVRYMPNGGAVANITLATESWRDKATGEMKEQTEWHRVVLFGKLAEVASEYLRKGS
QVYIEGQLRTRKWTQSGQDRYTTEVVVNVGGTMQMLGGRQGGGAPAGGNIGGGQPQGGWGQPQQPQGGNQF
SGGAQSRPQQSAPAAPSNEPPMDFDDDDIPF.
```

La metionina del extremo N-terminal se separa durante la expresión dando lugar a la proteína madura (véase SEQ ID NO: 6). La numeración de aminoácidos que se utiliza en esta memoria se refiere a la proteína madura que comienza en Ala-2 de la SEQ ID NO:1.

La SSB que procede de *E. coli* es codificada por el gen *ssb* de *E. coli*. Existe como un tetrámero estable que puede unir un mínimo de ~65 bases de DNA en concentraciones salinas altas [11] y la estructura del cristal pone de manifiesto DNA enrollado en torno a un tetrámero [12]. En concentraciones salinas bajas la SSB de *E. coli* puede unir una longitud de ~35 bases de ssDNA. La estructura del cristal en ausencia de DNA pone de manifiesto una disposición de monómeros diferente dentro de un tetrámero [13]. La proteína une DNA rápida y estrechamente, pero el mecanismo puede ser complejo debido a la necesidad de que el DNA se enrolle en torno a la SSB de *E. coli* [14, 15]. La unión es aparentemente cooperativa y puede haber interacción entre oligómeros de SSB vecinos a lo largo de una cadena de ssDNA. También existe evidencia de que la SSB de *E. coli* puede existir como un monómero en concentraciones bajas y puede unir débilmente DNA en este estado [16].

Al unir a DNA monocatenario, las SSBs pueden sufrir un cambio de conformación. Sin embargo, las estructuras de cristales de SSB sugieren que solamente hay cambios menores de la conformación de subunidades de la proteína en la asociación con DNA [12, 13]. Al enrollarse en torno a la superficie del tetrámero, el DNA lo hace por medio de una serie de canales existentes en la superficie de la proteína.

Marcadores

La SSB de la invención se modifica con objeto de que incluya un marcador detectable unido a un aminoácido de la proteína y cuyas características detectables se modifican al unir DNA monocatenario. Esta modificación puede resultar, pero no necesariamente, de un cambio de la conformación de la proteína. Tanto como si la modificación se debe a un cambio de la conformación de la proteína como si no, el cambio de las características detectables se debe a una modificación del medio ambiente del marcador, que está unido a la proteína de unión de DNA monocatenario.

Los marcadores utilizados con la invención pueden proporcionar diversas señales, pero los marcadores preferidos son marcadores luminiscentes. Los marcadores luminiscentes incluyen marcadores tanto fluorescentes como fosforescentes. No obstante, se considera el uso de otros marcadores. Por ejemplo, podrían utilizarse marcadores electroquímicos en donde la modificación del medio ambiente de los marcadores pudiera dar lugar a un cambio del estado redox. Un cambio tal puede detectarse empleando un electrodo.

El marcador detectable es, preferiblemente, un marcador fluorescente. Se prefiere el uso de marcadores fluorescentes que pueden ser excitados para producir fluorescencia por exposición a ciertas longitudes de onda de luz.

La unión del marcador detectable a la SSB puede reducir algunas veces la afinidad de la proteína para el DNA monocatenario. Sin embargo, esto no evita una modificación de las características detectables al unir DNA monocatenario que puede medirse cuantitativamente.

Preferiblemente, el marcador fluorescente es una cumarina o una rodamina.

Longitudes de onda de excitación más cortas, tales como las de los marcadores de la clase de cumarina, son útiles para proporcionar un biosensor adecuado para la medida de cinéticas rápidas de formación de DNA monocatenario,

por ejemplo, en ensayos en tiempo real de la actividad de DNA helicasas in vitro. Por otra parte, las longitudes de onda de excitación mar largas, tales como las de los fluoróforos de rodamina, que también demuestran mayor fotoestabilidad, hacen que un biosensor marcado tal, sea más adecuado para aplicaciones tales como estudios de moléculas aisladas y ensayos de alta productividad. Por consiguiente, los marcadores de la invención pueden tener

5 longitudes de onda de excitación más cortas, de entre aproximadamente 400-460 nm, o longitudes de onda de excitación más largas, de entre aproximadamente 540-600 nm.

Los marcadores de rodamina preferidos son funcionalizados para que proporcionen alta selectividad para la reacción con tioles, tales como las moléculas de haloacetamidotetrametilrodamina (XATR), incluso más preferiblemente las moléculas de yodoacetamidotetrametilrodamina (IATR) y bromoacetamidotetrametilrodamina (BATR). Los

10 marcadores preferidos son el 5-IATR y el 6-IATR.

El marcador de la clase de cumarina se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en N-[2-(yodoacetamido)etil]-7-dietilaminocumarina-3-carboxamida (IDCC), ácido 2-(4'-maleimidil)naftaleno-6-sulfónico (MIANS), N-[2-1-maleimidil)etil]-7-dietilaminocumarina-3-carboxamida (MDCC), C5-maleimida: xantilium 3,6-diamino-9-[2-carboxi-4(ó 5)-[[[5-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)pentil]amino]carbonil]fenil]-4,5-disulfo-, sal interna, sal

15 monosódica (Alexa Fluor 488) y C43H44Cl3N4NaO12S3 (Alexa Fluor 546).

Cuando el marcador se basa en cumarina es, preferiblemente, el IDCC.

Cuando el marcador se basa en rodamina es, preferiblemente, el 6-IATR.

Unión de marcadores:

Las SSBs de la presente invención tienen marcadores unidos a sus aminoácidos.

20 La presente invención proporciona, asimismo, un método de preparación de una SSB modificada que implica modificación de una SSB para que incluya un marcador detectable unido a un aminoácido de la proteína.

El marcador puede unirse a la SSB mediante cualesquiera medios convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, el marcador puede unirse por medio de restos de aminos o de carboxilos existentes en la proteína. Sin embargo, se prefiere especialmente el enlace por medio de los grupos tiol de restos de cisteína.

25 En un aspecto adicional de la invención, la SSB modificada comprende más de un marcador detectable. En este caso, los marcadores están unidos, preferiblemente, a restos de aminoácidos separados.

En una realización de la invención, cada uno de los monómeros de la SSB tiene el mismo número de marcadores unidos a él. Puede haber un marcador por monómero o, alternativamente, dos, tres o cuatro marcadores unidos a cada monómero.

30 En otro aspecto de la invención, cuando más de un monómero del tetrámero de SSB es modificado para que incluya un marcador detectable, tales marcadores pueden apilarse.

Si es apropiado, pueden emplearse restos naturales de cisteína existentes en la secuencia de la SSB para la unión del marcador. Sin embargo, cuando no se encuentran disponibles restos naturales de cisteína para unir el marcador, pueden construirse restos de cisteína en la secuencia de la SSB, preferiblemente mediante mutagénesis dirigida al

35 sitio.

La invención proporciona una SSB en donde un resto de cisteína no de tipo nativo, ha sido reemplazado por un resto de cisteína.

La mutagénesis dirigida al sitio puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica para este fin. Brevemente, sin embargo, se aísla el gen que codifica la SSB, y se construyen sondas de oligonucleótidos para alterar, por recombinación, el codón que codifica el aminoácido que se desea cambiar en un codón que codifica cisteína. Seguidamente, el gen mutado es expresado, típicamente, en un sistema de expresión bacteriano, produciendo la proteína mutada.

40

La invención proporciona también una SSB en donde el marcador está unido a una región de la superficie de la proteína. Regiones de la proteína tales como una superficie de interacción de subunidad-subunidad, no son expuestas y por tanto son inadecuadas con la finalidad de obtener marcadores. A los restos situados en la superficie puede accederse con mayor facilidad con la finalidad de obtener marcadores y es menos probable que se altere la configuración global de la proteína cuando se marca..

45

Preferiblemente, los restos escogidos para la unión de los marcadores están situados en una región de la superficie de la proteína, que está por encima de un canal de unión y sobre bucles de la estructura de la proteína. Se conocen en la técnica estructuras 3D de varias SSBs. Los restos escogidos no están situados en una región de la proteína que pudiera interactuar directamente con la superficie de unión de DNA per se, si no que están bastante próximos a la superficie del DNA de modo que el marcador unido pueda ser afectado por la presencia del DNA. Esta estrategia es un compromiso entre la rotura de la unión de DNA por ejemplo por unión de DNA impedida

50

estéricamente (por estar “demasiado próximo”) y la no obtención de un cambio de señal (por estar “demasiado alejado”). No obstante, puede resultar una modificación del medio ambiente del marcador procedente de un cambio de conformación de una región de la proteína a la que el marcador no se une directamente.

5 Al emplear SSB de *E. coli*, se encontraron restos adecuados para la unión de marcadores situados por encima del canal de unión pero que, probablemente, no estaban implicados en la estructura secundaria de la proteína, en dos bucles, en los restos aproximados M23-A28 y K87-Q94. También se tomó en consideración en qué dirección apuntaba el aminoácido de tipo nativo, ya que esto puede proporcionar alguna orientación respecto a donde puede caer el marcador.

10 Al emplear SSB de *E. coli*, los sitios de unión preferidos para un marcador de la clase de cumarina son el resto 26 (glicocola en la secuencia de tipo nativo) o el resto 92 (serina en la secuencia de tipo nativo) de la secuencia de aminoácidos de SSB de *E. coli*. Los restos se numeran desde el extremo N-terminal de la SSB de *E. coli* madura. En la presente invención, preferiblemente, o bien G26 o bien S92 es convertido en cisteína. La SSB de *E. coli* de la presente invención, modificada para que incorpore un marcador de cumarina, posee una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO: 3 que contienen las mutaciones G26C o S92C, respectivamente.
15 Preferiblemente se une IDCC al resto de cisteína.

Al emplear SSB de *E. coli*, el sitio de unión preferido para un marcador de la clase de rodamina es el resto 88 (triptófano, en la secuencia de tipo nativo) de la secuencia de aminoácidos de SSB de *E. coli*. Los restos se numeran desde el extremo N-terminal de la SSB de *E. coli* madura. En la presente invención, preferiblemente, W88 es convertido en cisteína. La SSB de *E. coli* de la presente invención, modificada para que incorpore el marcador de rodamina, posee la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 que contiene la mutación de W88.
20 Preferiblemente se une 6-IATR al resto de cisteína.

La presente invención proporciona también una proteína SSB de *E. coli* modificada que tiene una secuencia de SEQ ID NO:6 que comprende la mutación S92C, G26C ó W88C.

25 Los restos de aminoácidos correspondientes existente en otras SSBs pueden ser identificados basándose en la homología de secuencias, por ejemplo utilizando la alineación de la Figura 8. Puede observarse de la Figura 8 que la mutación G26 está conservada en estas siete proteínas y que la posición 88 es un resto aromático hidrófobo, es decir, un triptófano o una tirosina en todos los casos.

30 Los fluoróforos rara vez se unen directamente a un aminoácido, sino que en lugar de eso se unen por medio de un engarce. La elección del engarce puede tener efecto también sobre el modo en que actúa la SSB marcada, ya que el tamaño, la forma y la flexibilidad del engarce pueden cambiar la aptitud de un engarce para entrar en proximidad con otros grupos.

35 Los marcadores se unen a la SSB, preferiblemente, de modo que no introduce un nuevo centro quiral. Por tanto, el aducto marcador-proteína no existe en forma diastereoisómera lo que permite así obtener una SSB marcada sustancialmente homogénea. Esto puede conseguirse mediante el uso de engarces tales como las haloacetamidas (preferiblemente yodacetamidas).

Cuando se utilizan marcadores tales como rodaminas es preferible también reducir al mínimo cualquier rodamina unida no covalentemente, dado que es probable que ésta tenga fluorescencia alta y aumente los niveles del ruido de fondo. Por tanto, las condiciones experimentales deben escogerse apropiadamente según se describe más adelante.

40 Después de unir el marcador, habitualmente se purifica la proteína marcada para separarla del marcador libre y de cualquier proteína marcada erróneamente. Esta proteína marcada erróneamente puede ser una proteína sin marcar con la que no había reaccionado el marcador, o una proteína donde el marcador se ha unido en la posición equivocada (o bien en lugar del marcador deseado o además de éste). Durante la purificación de la proteína marcada, puede incluirse el tratamiento con un reactivo tiólico, tal como β -mercaptoetanol, ditiotreitól o 2-mercaptoetanosulfonato de sodio, ya que esto puede mejorar la respuesta de fluorescencia de la proteína.
45

50 Cuando puede unirse más de un marcador, se prefiere usar la proteína en forma homogénea. Una forma homogénea, p.ej. especies puras marcadas doblemente, pueden purificarse (por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba) para obtener especies homogéneas, doblemente marcadas. Las SSBs marcadas una vez o marcadas doblemente pueden diferenciarse por métodos tales como espectrometría de masas de electropulverización.

El marcador detectable pone de manifiesto, preferiblemente, un aumento de sus características detectables al unir DNA monocatenario. Ventajosamente, este aumento es por lo menos de 4 veces, más preferiblemente de 5 veces y lo más preferiblemente, de 6 veces o más.

Métodos de ensayo:

Las SSBs marcadas, de la invención, pueden utilizarse en ensayos de uso bioquímico general para detectar DNA monocatenario en una muestra. Por ejemplo, par detectar la separación de cadenas de DNA bicatenario que está catalizada por helicasas, y permite el tratamiento posterior tal como reparación y replicación. Alternativamente, las SSBs marcadas, de la invención, pueden emplearse en ensayos realizados para medir la separación de DNA monocatenario. o en ensayos realizados para medir la disminución de DNA bicatenario. Estos ensayos pueden ser cualitativos o cuantitativos. La invención es particularmente útil para seguir las cinéticas de reacciones, debido al rápido tiempo de reacción de las SSBs. Los ensayos pueden utilizarse para seleccionar métodos para obtener inhibidores de enzimas de tratamiento de DNA. Tales ensayos comprenden analizar los niveles de DNA monocatenario in vitro utilizando una SSB según la presente invención, en presencia y ausencia de los inhibidores y analizando la existencia de una alteración en los niveles de DNA monocatenario.

El DNA monocatenario puede ser una cadena aislada de DNA o puede ser una región de una cadena aislada de un DNA dúplex.

La muestra puede proceder de cualquier origen, e incluye suero, orina, saliva, sudor, cultivo de tejidos, extractos celulares, líneas celulares, alimentos, bebidas, productos farmacéuticos y productos medioambientales (por ejemplo, agua). Si las concentraciones de DNA monocatenario en la muestra son altas, las muestras pueden diluirse según sea necesario para conseguir una cuantificación exacta de los niveles de DNA monocatenario

Las cinéticas de estos métodos pueden depender de la concentración salina o de la presencia de un anión particular. Un experto en la técnica sería capaz de seleccionar las condiciones apropiadas para llevar a cabo los métodos de la invención.

Estos métodos serán, típicamente, ensayos in vitro.

Así pues, la invención proporciona un método para detectar DNA monocatenario en una muestra, que comprende las etapas de:

- (i) mezclar la muestra con la SSB modificada que comprende al menos un marcador detectable; y
- (ii) detectar un cambio en la muestra que proviene de la interacción entre el DNA monocatenario y la SSB.

El cambio detectado en (ii) puede ser relacionado con la concentración de DNA monocatenario existente en la muestra.

Empleando este método, que utiliza una SSB modificada, es posible seguir las cinéticas de sistemas biológico, debido al tiempo de reacción, extremadamente rápido, del método.

La invención proporciona también una SSB modificada de la invención, para usar en un análisis de DNA monocatenario

Otro aspecto de la invención proporciona una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1, en la que uno o más restos de aminoácidos de tipo nativo han sido cambiados a un resto de cisteína, La invención proporciona, además, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4. La invención proporciona adicionalmente las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencia polipeptídicas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

General:

La expresión “que comprende” engloba “que incluye” así como “que consiste”, p.ej. una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, p. ej. X + Y.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” , p. ej. una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

El término “aproximadamente” con respecto a un valor numérico x, significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 muestra los espectros de fluorescencia y titulación del complejo IDCC- SSB de E. coli con dT70 (SEQ ID NO: 5). Las condiciones de medida fueron las de la Tabla 1.. La Figura 1A expone los espectros de excitación y emisión en presencia y ausencia de dT70 580 nM. La excitación se realizó a 433 nm y la emisión a 476 nm. La Figura 1B expone la titulación de la intensidad de emisión (excitación a 430 nm, emisión a 475 nm) en función de dT70.. Las líneas son el mejor ajuste lineal hasta dT70 0,28 μM y la mejor línea horizontal de ajuste para los puntos restantes.

La Figura 2 expone las cinéticas de asociación de IDCC-SSB de E. coli con dT70, Se mezcló IDCC- SSB de E. coli 5 nM con diversas concentraciones de dT70 y se siguió la intensidad de la fluorescencia con el tiempo en un aparato

- de flujo detenido. Las condiciones fueron las de la Tabla 1, excepto que las medidas se realizaron a 25°C. La Figura 2A expone trazas individuales típicas en concentraciones nanomolares de dT70. Las trazas fueron normalizadas para acabar en 100% y salto de 5% de una a otra. Las trazas rápidas tienen amplitud disminuida, debida principalmente a pérdida de señal durante el tiempo muerto del instrumento (~ 2 min). La Figura 2B muestra la dependencia de la velocidad con respecto a la concentración de DNA. Cada traza se ajustó a un único exponencial. Los resultados indicados son los valores medios de, típicamente, 3 trazas procedentes de cada uno de dos experimentos realizados por separado. Todas las constantes de velocidad que provienen de trazas individuales fueron ajustadas a una hipérbola, según se describe más adelante.
- La Figura 3 expone las cinéticas de disociación de IDCC-SSB de *E. coli*-dT70. 5 nM de este complejo se mezcló con un gran exceso de SSB de *E. coli* sin marcar, como cebo. Se utilizó SSB de *E. coli* S92C en la concentración indicada. Las condiciones experimentales fueron las de la Figura 2.
- La Figura 3 expone una titulación de competición de dT70 en una mezcla de SSB de *E. coli* sin marcar (S92C) e IDCC-SSB de *E. coli*. Por otra parte las condiciones son como las de la Figura 1. Los resultados fueron ajustados a la ecuación de equilibrios en competición de las especies siguientes: SSB de *E. coli*, SSB de *E. coli*-dT70, IDCC-SSB de *E. coli* e IDCC-SSB de *E. coli*-dT70 asumiéndose una unión estrecha, así que, esencialmente, no había DNA libre hasta exceso sobre las dos especies de SSB de *E. coli*. La ordenada es la extensión de formación de IDCC-SSB de *E. coli*-dT70 medida por la fluorescencia. La línea muestra el mejor ajuste con IDCC-SSB de *E. coli*, 0,13 μM, SSB de *E. coli* 0,25 μM (concentraciones de tetrámeros) y la razón de $K_d(\text{IDCC-SSB de } E. coli)/K_d(\text{SSB de } E. coli)$ es 28.
- La Figura 5 expone un ensayo de desenrollamiento de dsDNA, utilizando la helicasa RecBCD. Se mezcló DNA plasmídico linearizado 1 nM (pADGFO _ ClaI – 3 kb) en un aparato de flujo detenido, con exceso de RecBCD en presencia de ATP e IDCC-SSB de *E. coli* 500 nM.
- La Figura 6 muestra los espectros de absorbancia y fluorescencia y la titulación de rodamina-SSB de *E. coli* con dT70. La Figura 6A muestra espectros de absorbancia en función de la concentración nanomolar de dT70 (0, 124, 247, 267 y 487 nM en orden de intensidad creciente a 560 nm). Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente para tetrámeros de rodamina-SSB de *E. coli*- 0,4 μM en el seno de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. NaCl 200 mM, DTT 1 mM, y albúmina de suero bovino 5 μM. La Figura 6 B expone los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de rodamina-SSB de *E. coli*, 250 nM (concentración de tetrámero) medidos a 30°C en el mismo tampón, en presencia y ausencia de dT70 580 nM. La excitación tuvo lugar a 556 nm y la emisión a 579 nm.
- La Figura 7 expone la titulación de la intensidad de emisión (excitación a 556 nm, emisión a 579 nm) en función de dT70, de rodamina-SSB de *E. coli*. El complejo de rodamina-SSB de *E. coli* 0,4 μM tenía añadido en partes alícuotas dT70. Las líneas son el mejor ajuste lineal desde 0 – 0,98 dT70/ rodamina-SSB de *E. coli*-, y la línea horizontal de mejor ajuste para los puntos restantes.
- La Figura 8 muestra una alineación de siete secuencias de SSB procedente de *Escherichia coli*, *Enterobacteria fago P1*, *salmonella Typhimurium*, *bacillus licheniformis*, *campylobacter jejuni*, *pseudomonas syringae* y *listeria inocua*.
- La Figura 9 expone un ensayo en el que se emplea IDCC-SSB para verificar la actividad de helicasa de PcrA y RecBCD. La Figura 9a muestra el desenrollamiento de tres longitudes diferentes de sustratos de DNA, catalizado por PcrA/RepD, monitorizado utilizando la fluorescencia de IDCC-SSB. El esquema muestra el DNA plasmídico linearizado: la proteína iniciadora RepD carga PcrA en sitios oriD, y la helicasa desenrolla progresivamente el dúplex a la derecha de oriD. La distancia (en pares de bases) entre el oriD y el extremo del DNA está indicada. El testigo de “-ATP” estaba sobre el DNA más largo. La Figura 9b muestra el desenrollamiento de pADGF0 linearizado por RecBCD de saturación, verificado usando la fluorescencia de IDCC-SSB. El esquema muestra el plásmido pADGF0 con la longitud del DNA indicada.
- La Figura 10 expone una comparación de ensayos de IDCC-SSB y de desplazamiento de colorante para la helicasa AddAB. Los experimentos se realizaron según se describe en el apartado Procedimientos Operatorios Experimentales. La Figura 10a muestra un ensayo de IDCC-SSB a alta y baja fuerza iónica y 37°C. El testigo que se indica esta a baja fuerza iónica en ausencia de ATP. La Figura 10b muestra un ensayo de IDCC-SSB como en la Figura 10a, pero con pBR322 50 nM (en nucleótidos). La Figura 10c expone un ensayo de desplazamiento de colorante. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las de la Figura 10a, pero el IDCC-SSB había sido reemplazado con SSB nativa y el tampón se había suplementado con el colorante Hoechst 33258 200 nM. Las señales de fluorescencia se calibraron usando EcoRI-pBR322 linearizado desnaturalizado por calor, en condiciones idénticas de la disolución (concentración salina alta y baja) y de las condiciones instrumentales.

Modos para llevar a cabo la invención

Preparación de proteínas SSB de *E. coli* mutantes:

- El gen *ssb* de *E. coli* de tipo nativo, fue clonado en un vector pET15b usando PCR con cebadores que contenían los sitios de restricciones NdeI y BamHI de flaqueo. Este vector se utilizó como molde para la mutagénesis dirigida al sitio produciendo genes de SSB *E. coli* G26C, S92C ó W88C. Las construcciones de pET15b fueron secuenciadas

para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas y la integridad del resto del gen *ssb*. Los genes mutados fueron transferidos después a vectores pET22b usando los sitios de restricción NdeI y BamHI, y estos vectores se utilizaron para transformar BL21 pLysS de sobreexpresión utilizando el sistema de promotor T7. Se cultivaron células en 2 l de LB a 37°C hasta fase semi-log y se indujo expresión con IPTG 1 mM. Al cabo de tres horas las células fueron cosechadas, resuspendidas en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM y sacarosa al 10%, y se guardó a -80°C.

Las proteínas SSB de *E. coli* mutantes fueron purificadas a 4°C utilizando una modificación del método de Lohman et al. [14]. La suspensión de células se descongeló y se añadió PMSF 0,1 mM. La lisis celular producida por ultrasonidos fue seguida de centrifugación. Se recogió el sobrenadante y se añadió lentamente polimin P (solución de reserva al 10%, pH 6,9) a 0,4%, seguida de agitación constante durante 15 minutos. Se recogió un pelet mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos y después se volvió a suspender completamente en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, glicerina al 20%, EDTA 1 mM y NaCl 0,4 M, empleando un homogeneizador Dounce, seguido de agitación durante 30 minutos. Se retiró el material insoluble por centrifugación a 10K durante 20 minutos. Se añadió al sobrenadante sulfato amónico sólido, muy lentamente, a 150 g/l. Después de agitar durante 30 minutos se recogió un pelet por centrifugación a 13 K durante 30 min. El pelet se volvió a suspender en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, glicerina al 20%, EDTA 1 mM y NaCl 0,2 M. La suspensión se centrifugó a 18K durante 20 minutos y se hizo pasar a través de un filtro de jeringuilla de 0,2 µm. Una columna de heparina Hi-Trap de 5 ml se equilibró en Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, glicerina al 20% y EDTA 1 mM. La muestra se cargó en una concentración salina baja mezclando con tampón equilibrador (en la razón de 16:84 de muestra con respecto al volumen de tampón) inmediatamente antes de la columna, en la cámara de mezcla del aparato de cromatografía. Esto es necesario debido a que la SSB de *E. coli* es propensa a precipitar si se mantiene durante períodos de tiempo largos en la baja concentración salina necesaria para la unión a la heparina. La columna se lavó luego con tampón equilibrador y se eluyó la SSB de *E. coli* con un gradiente de 150 ml de NaCl desde 0 a 1 M, en el seno de este tampón. Se reunieron las fracciones pico, se dializaron extensamente frente a tampón de almacenamiento (Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, glicerina al 50% y β-mercaptoetanol 1 mM), y se conservó a -80°C. La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción teórico de 27880 M⁻¹cm⁻¹ para el monómero. Las concentraciones dadas en la presente memoria son las del monómero, a menos que se establezca de otro modo.

Marcación de proteínas SSB mutantes:

Mutantes de cisteína de SSB de *E. coli* fueron modificados covalentemente con una diversidad de colorantes fluorescentes.

Se usó el siguiente protocolo para marcar el SSB de *E. coli* G26C con yodoacetamida de dietilaminocumarina, IDCC. Una alícuota de SSB de *E. coli* (G26C) (5 mg en 1,3 ml) se incubó con ditiotreitól (DTT) durante 10 minutos en el seno de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 500 mM y glicerina al 20%. Se separó el DTT de la proteína empleando una columna PD10, previamente equilibrada en el mismo tampón, que había sido desgasificado haciendo pasar nitrógeno. Se añadió IDCC en un exceso cuádruple con respecto a la proteína ~100 µM, y se incubó bajo nitrógeno durante 2 horas a temperatura ambiente, agitando en todo momento y protegiendo de la luz. Se separó el exceso de IDCC por reacción con sulfato de 2-mercaptoetano y sodio (un exceso de 10 veces con respecto a la proteína) durante 10 minutos. La mezcla de incubación se filtró a través de una membrana [poli(éter sulfona) con poros de 0,2 µm]. Se aisló la proteína por paso por una columna de filtración en gel P4 (1 x 30 cm) equilibrada previamente en Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM, NaCl 500 mM y glicerina al 20%. La concentración de proteína se calculó a partir de la absorbancia de la cumarina en 430 nm, donde el coeficiente de extinción es 44800 M⁻¹cm⁻¹, suponiendo que es el mismo que el de IDCC, [17]. Se añadió glicerina a la proteína marcada (IDCC-SSB) que después se guardó a -80°C.

El protocolo que sigue se utilizó para marcar SSB de *E. coli* W88C con 6-IATR. Una alícuota de SSB de *E. coli* (W88C) (5 mg) en el seno de tampón de almacenamiento (0,4 ml) se incubó con DTT 5 mM durante 10 minutos y luego se cargó a una columna de filtración en gel PD10, previamente equilibrada en Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM, NaCl 500 mM y glicerina al 20%. Se eluyó la proteína con el mismo tampón, dando por resultado 1,5 ml de SSB de *E. coli* 93 µM. Se añadió 6-IATR a 372 µM y la solución se cubrió con nitrógeno, se protegió de la luz y se mezcló todo el tiempo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se añadió mercaptoetilsulfonato sódico (931 µM) para retirar el exceso de 6-IATR y la solución se incubó durante 10 minutos. La mezcla de incubación se filtró a través de una membrana [poli(éter sulfona), poros de 0,2 µm]. Se aisló la proteína por paso a través de una columna de filtración en gel P4 (1 x 30 cm), equilibrada previamente en Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM, NaCl 500 mM y glicerina al 20%. La concentración de proteína se calculó tomando un coeficiente de extinción de 52 mM⁻¹cm⁻¹ en 534 nm (véase más adelante). Se añadió glicerina para hacerla al 50% (v/v) y la proteína (6-IATR-SSB) se guardó en partes alícuotas a -80°C.

En la práctica puede ocurrir también marcación sobre aminas cuando se usan reactivos selectivos de tioles. La espectrometría de masas de la SSB de *E. coli* marcada con rodamina mostró que ~90% de la proteína era el producto deseado, marcada únicamente la SSB de *E. coli*, junto con pequeñas cantidades de proteína sin marcar y marcada doblemente. Las condiciones de marcado descritas reducen al mínimo estos productos secundarios.

Además, es importante intentar minimizar la rodamina unida no covalentemente ya que es probable que ésta tenga fluorescencia alta y por tanto aumente el ruido de fondo. La filtración en gel después de realizar el marcado parecía eficaz en esto: la purificación posterior en una columna de heparina dio por resultado solamente un ligero aumento de intensificación de la fluorescencia en la unión de DNA.

- 5 Las masas moleculares de las proteínas sin marcar y marcadas se determinaron por espectrometría de masas en electropulverización según se ha descrito anteriormente [4].

Otros colorantes y otras SSBs de *E. coli* mutantes se marcaron de un modo similar al de los métodos antes descritos en esta memoria, con alguna variación en el período de tiempo o las concentraciones de proteínas y colorantes.

- 10 Medidas de absorbancia y fluorescencia :

Los espectros de absorbancia se obtuvieron en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Las medidas de fluorescencia se obtuvieron en un fluorímetro Cary Eclipse equipado con una lámpara de xenón, utilizando cubetas de 3 mm de paso de luz. Los rendimientos cuánticos se midieron a 20°C en cubetas de 1 cm de paso de luz utilizando soluciones con absorbancia de $\sim 0,03 \text{ cm}^{-1}$ en la longitud de onda de excitación. Los espectros de emisión corregidos se obtuvieron desde 435 a 600 nm. Los rendimientos cuánticos de IDCC-SSB de *E. coli* se midieron con respecto a Coumarin 343 que tiene el valor conocido de 0,63 [18].

- 15 Se realizaron experimentos de flujo detenido en un aparato SF61MX de HiTech, equipado con una lámpara de mercurio-xenón y el soporte lógico IS-2 de Hi-Tech. El aparato tenía un monocromador y rendijas de 4 mm en la luz de excitación y un filtro de corte apropiado en la emisión (excitación, 436 nm y filtro de 455 nm para la IDCC-SSB de *E. coli*) En las medidas descritas en esta memoria, las concentraciones establecidas son las de la cámara de mezcla, a menos que se exponga de otro modo. Los resultados obtenidos fueron ajustados a curvas teóricas empleando o bien el soporte lógico de HiTech o el Grafit 5 [19].

Ensayos de especificidad::

- 25 Se desnaturizó por calor Lambda DNA calentando la siguiente solución durante 5 minutos a 95°C: DNA 261 μM (en términos de nucleótidos), Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, sacarosa al 10% (v/v), acetato magnésico 2 mM y DTT 2 mM. El producto se puso sobre hielo y se empleó inmediatamente. ssRNA (como una escala de siete tramos) se desnaturizó por calor y se empleó del mismo modo. Los ácidos nucleicos se ensayaron con IDCC-SSB de *E. coli* añadiendo IDCC-SSB de *E. coli* de 23 μM (en términos de nucleótidos) a 400 nM, a 30°C en el seno de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, DTT 1 mM y albúmina de suero bovino 5 μM . La excitación fue a 430 nm y la emisión a 475 nm.

Ensayos de helicasas :

- 35 Todos los experimentos se realizaron a 37°C. Todos los resultados presentados son medidas representativas de trazas aisladas sin promediar. Para las medidas de la actividad de la helicasa PcrA, los experimentos fueron llevados a cabo incubando previamente PcrA 25 nM y RepD (monómero) 4 nM con sustrato de DNA pCERoriD 1 nM (nucleótidos 6,2 μM) en el seno de un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM e IDCC-SSB (monómero) 1,1 μM durante 5 minutos. La reacción se inició mezclando rápidamente con un volumen igual de ATP 0,5 mM en el mismo tampón. El protocolo de este experimento es esencialmente idéntico al llevado a cabo anteriormente [20] excepto que la SSB de *Bacillus subtilis* de tipo nativo ha sido reemplazado directamente con IDCC-SSB. Para las medidas de la actividad de helicasa RecBCD-nucleasa, se llevaron a cabo experimentos incubando previamente RecBCD (saturación) 5 nM con Clal-pADGF0 DNA linearizado (nucleótidos 6,1 μM), 1 nM, en el seno de un tampón que contenía Tris-acetato 25 mM, pH 7,5, acetato magnésico 2 mM, DTT 1 mM e IDCC-SSB (monómero) 1,1 μM , durante 5 minutos. La reacción se inició mezclando rápidamente con ATP 1 mM en el mismo tampón. Las señales de fluorescencia se calibraron empleando Lambda DNA desnaturizado por calor, en idénticas condiciones de la solución e instrumentales. Para las medidas de la actividad de AddAB, se llevaron a cabo experimentos incubando previamente AddADI172ABD961A 2,5 nM [21, 22] con EcoRI-DNA pBR322 linearizado nucleótidos 870 nM) 0,1 nM (a menos que se establezca de otro modo), en el seno de un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, MgCl₂ 5,2 mM, IDCC-SSB (monómero) 175 nM y o bien NaCl 20 nM (fuerza iónica baja) o NaCl 200 nM (fuerza iónica alta) durante 5 minutos. La reacción se inició mezclando rápidamente con un volumen igual de ATP 0,5 mM, en el mismo tampón. Para el ensayo de desplazamiento de colorante, la IDCC-SSB se reemplazó con SSB nativa y el tampón se suplementó con el colorante 33258 de Hoechst, 200 nM. Las señales de fluorescencia se calibraron empleando EcoRI-pBR322 linearizado desnaturizado por calor, en idénticas condiciones de la solución (concentración salina alta y baja) y de condiciones instrumentales. La calibración con Lambda DNA desnaturizado por calor produjo, virtualmente, idénticos resultados. Para todos los experimentos, los resultados de desenrollamiento representan gráficamente en unidades arbitrarias de fluorescencia y como ssDNA nanomolar aparente (en nucleótidos), basado en las calibraciones. Ha de apreciarse que la medida es la de la unión de SSB, en vez de ssDNA per se, y que estos valores pueden diferir si se produce ssDNA en una forma que no pueda ser fijada por la proteína SSB (por ejemplo, si existe actividad extensa de nucleasas).

- Mutantes de cumarina-SSB de E. coli (S92C y G26C)

Resultados :

Las estructuras cristalinas de SSB de E. coli sugieren que existen solamente cambios menores en la conformación de subunidades de la proteína en la asociación con DNA [12, 13]. En el enrollamiento en torno a la superficie del tetrámero, el DNA se enrolla por medio de una serie de canales existentes en la superficie de la proteína. Se escogieron dos sitios para la marcación con fluoróforos, sobre bucles que se encuentran en la parte superior de tales canales, y se introdujeron cisteínas aisladas en la proteína para proporcionar estos sitios. Una mutación (S92C) está en un bucle que está sustancialmente inalterado entre las estructuras unidas y sin unir, Otra mutación (G26C) está en el borde de un canal y en un bucle que puede ser flexible existente en la estructura libre de DNA, pero está bien definida en la forma unida de DNA. En cualquiera de los dos caso, el enrollamiento de DNA en torno a la superficie de la SSB de E.coli proporciona una oportunidad importante de cambios en el medio ambiente de los fluoróforos. Principalmente, se escogieron con estas dos SSBs de E. coli fluoróforos cuya intensidad cambia con el medio ambiente.

La Tabla 1 expone los cambios de intensidad de la fluorescencia de estas dos SSBs de E. coli mutantes. Con objeto de obtener una molécula adecuada para realizar medidas de soluciones, los criterios principales son un aumento de la fluorescencia adecuadamente grande al unirse a DNA, junto con un rendimiento cuántico de la fluorescencia razonablemente brillante. Se midieron los espectros de fluorescencia de SSB de E. coli marcada 260 nM (concentración de tetrámero), a 30°C, en el seno de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, DTT 1 mM y albúmina de suero bovino 5 µM.

La excitación tuvo lugar en la longitud de onda apropiada para el fluoróforo y se midieron las intensidades de emisión en el máximo, en ausencia y presencia de dT70 de saturación. Las dos cumarinas, IDCC y MDCC dieron la máxima intensificación de la fluorescencia con G26C y esta proteína mutante marcada con IDCC, IDCC-SSB de E. coli, se escogió para estudios adicionales por dos razones. En primer lugar, proporciona consistentemente un aumento mayor que MDCC. En segundo lugar, no tiene las complicaciones potenciales de formación de un centro quiral al reaccionar con un tiol. En el caso de MDCC, la reacción de su maleimida con una cisteína de proteína causa la producción de diastereoisómeros. Cuando se observó este fenómeno con un sensor similar de fosfato, se puso de manifiesto que los dos diastereoisómeros tienen propiedades diferentes de fluorescencia [4]. Por el contrario, la reacción de IDCC son un tiol producía solamente una especie molecular única.

Tabla 1: Cambios de fluorescencia para una inspección de varias combinaciones de SSB de E. coli mutante: : colorante.

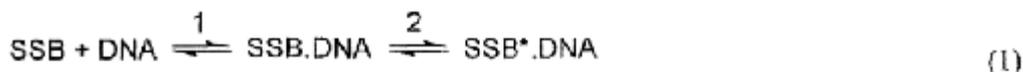
Marcador fluorescente	Razón de fluorescencia (+/- dT70)	
	S92C	G26C
IDCC	2,8	6,1
MDCC	2,2	4,9
MIANS	0,4	-
6-IATR	1.3	2,8
Alexa Fluor 488	3,1	3,3
Alexa Fluor 546	1,5	2,3

La Figura 1 muestra el cambio de los espectros de fluorescencia cuando IDCC-SSB de E. coli fija DNA. El cambio fue similar cuando se empleó poli-dT (el poli-dT consiste en cadenas de poli(dT) de diversas longitudes, cada una de cuyas longitudes tiene, aproximadamente, algunos cientos de bases). Pudieron obtenerse aumentos de la fluorescencia de ~ 6 veces. Una titulación de DNA en una solución de IDCC-SSB de E. coli pone de manifiesto un aumento de fluorescencia claramente lineal, seguido de una rotura acusada a medida que se mantiene la fluorescencia máxima. Este hecho es consistente con una unión de DNA muy estrecha con la SSB de E.coli. La ligera curvatura en la titulación a DNA bajo sugiere que se encuentra presente una pequeña cantidad de SSB de E. coli sin marcar y ésta une más estrechamente al DNA. En esta preparación, los espectros de masas sugieren que ~5-10% de la SSB de E. coli está sin marcar. Otras combinaciones de colorante-SSB de E. coli pusieron de manifiesto, asimismo, tal curvatura

Se midió el rendimiento cuántico de fluorescencia de IDCC-SSB de E. coli para evaluar cuan fluorescente es la sonda en términos absolutos en ausencia de DNA. El rendimiento cuántico es 0,029 y 0,15 en presencia de dT70 de saturación. Obsérvese que el rendimiento cuántico refleja el área integrada del espectro de emisión, en ves de la intensidad en una longitud de onda particular. En comparación, la dietilaminocumarina unida a una molécula pequeña y, por tanto, que presumiblemente tiene solamente el medio ambiente medio, posee un rendimiento

cuántico de 0,01 a 0,04 [4], [23]. Este hecho sugiere que en ausencia de DNA, la fluorescencia de la cumarina es inafectada en gran parte por la proteína.

Con objeto de valorar la aplicabilidad de IDCC-SSB de *E. coli* como sonda de ensayos cinéticos, es importante conocer las velocidades posibles de unión y disociación de DNA. Las características cinéticas de asociación se midieron en condiciones de pseudo-primer orden con un gran exceso de dT70 sobre IDCC-SSB de *E. coli* (Figura 2). Las trazas de fluorescencias individuales se ajustaban bien a exponenciales sencillos y la velocidad aumentaba con la concentración de DNA. La dependencia de la concentración de DNA sugería que la relación existente puede ser hiperbólica y esto se ajustaba a los resultados obtenidos. Tal dependencia es consistente con un mecanismo de unión de dos etapas:



En este caso, el ajuste da $1/K_1 = 518 \text{ nM}$ y $k_{+2} = 642 \text{ s}^{-1}$. La interceptación con la ordenada no es significativamente diferente de cero y no da una medida exacta de la velocidad de disociación. Implicaciones posibles de este mecanismo de dos etapas se describen más adelante.

Las cinéticas de disociación se midieron directamente por desplazamiento de IDCC – SSB de *E. coli* desde su complejo con dT70 por SSB de *E. coli* sin marcar (Figura 3). La pretensión de este tipo de medidas es obtener condiciones en que la velocidad observada venga determinada solamente por la disociación del complejo. El uso de un gran exceso del cebo, en este caso SSB de *E. coli* sin marcar, normalmente consigue esto. Un ensayo consiste en variar la concentración del cebo; una velocidad constante es consistente con la limitación de la velocidad de disociación. En este caso, las trazas observadas variaban con la concentración de SSB de *E. coli* sin marcar y las trazas no se ajustaban bien a exponenciales sencillos. Sin embargo, las trazas sugieren que las velocidades observadas son $\sim 0,1 \text{ s}^{-1}$. Razones posibles de las trazas de complejos se proporcionan más adelante en términos de enrollamiento del DNA en torno a la SSB de *E. coli*.

Con objeto de determinar el efecto de la marcación sobre la afinidad de SSB de *E. coli* para el ssDNA, se tituló el dT70 en una mezcla de SSB de *E. coli* e IDCC-SSB de *E. coli* (Figura 4). Es evidente que concentraciones bajas de DNA se unen principalmente a la SSB de *E. coli* sin marcar, ya que solamente existe un pequeño aumento de fluorescencia. Esto implica que la proteína sin marcar posee la mayor afinidad. El ajuste de los resultados obtenidos de equilibrios de unión en competencia, según describe la leyenda de la figura, sugiere que la razón de las constantes de disociación es 28. Con objeto de poner de manifiesto que este cambio de afinidad no es específico para el marcador de cumarina, la medida se repitió con SSB G26C marcada con 6-IART y este ensayo dio el mismo resultado.

La especificidad de la respuesta se midió para otras especies de ácidos nucleicos, según se ha descrito anteriormente. Lambda dsDNA no dio respuesta, pero después de tratamiento por calor dio el aumento total de fluorescencia. El ssRNA (antes o después del tratamiento por calor) no dio respuesta. Estos resultados sugieren que el IDCC.SSB de *E. coli* es específico del ssDNA.

El sensor sin reactivo IDCC-SSB de *E. coli* puede destinarse a análisis de helicasas para el desenrollamiento de dsDNA. En la Figura 5 se proporciona un ejemplo, una medida de desenrollamiento por RecBCD de una longitud de 3 kb de dsDNA. En las condiciones utilizadas, RecBCD tiene alta capacidad de procesamiento y puede desenrollar la totalidad del DNA [24]. El aumento de fluorescencia es lineal hasta que la longitud total de DNA esta desenrollada. Debido a que la helicasa se une a extremos romos, en las condiciones de esta memoria, la RecBCD desenrolla desde cada uno de los extremos del DNA lineal a ~ 1500 bases por segundo, similar a lo medido usando un ensayo de desplazamiento de colorante [24].

La RecBCD está implicada en la reparación recombinante de roturas de DNA e inicia el desenrollamiento desde extremos del DNA. La helicasa RecBCD es la más rápida y de mayor capacidad de procesamiento que se indica en la bibliografía [25, 26, 1] El desenrollamiento de DNA por la helicasa RecBCD-nucleasa se verificó de nuevo. Después de la adición de ATP a complejos de RecBCD-DNA preformados, hay un aumento rápido, lineal, de fluorescencia seguido por un punto de rotura acusado que marca el final de la reacción de desenrollamiento al cabo de 0,9 segundos aproximadamente. Esto sugiere una velocidad de desenrollamiento de $\sim 1700 \text{ bp s}^{-1}$ por sitio de unión de RecBCD (Figura 9b), en excelente acuerdo con las estimaciones previas [27].

Se llevaron a cabo ensayos adicionales para demostrar el uso del biosensor sin reactivo de IDCC-SSB para verificar el desenrollamiento de DNA catalizado por DNA helicasas. Se empleó IDCC-SSB en concentraciones muy por encima de la K_d medida y en una estequiometría de, aproximadamente, 1 monómero de IDCC-SSB por cada 5 nucleótidos de DNA sustrato, para asegurar una respuesta lineal de la fluorescencia sin tener en cuenta el modo de unión de la SSB (véase el apartado “discusión”). En un ejemplo (Figura 9a) se desenrollaron tres longitudes diferentes de sustratos dsDNA por la helicasa PcrA, después de la mella por RepD en el origen oriD [28, 29]. En todos los casos, el dsDNA tiene el sitio oriD en una posición diferente con relación a un extremo. El

desenrollamiento por PcrA partiendo desde oriD es unidireccional, y por tanto cada sustrato es desenrollado por la helicasa en extensiones diferentes. Las velocidades y la extensión de las reacciones están en buena concordancia con las determinadas en idénticas condiciones usando la fluorescencia de triptófano [20]. Sin embargo, los resultados obtenidos son de mucha mayor calidad: se evita la obtención de la media de muchas trazas y las correcciones importantes de fotoblanqueo cuando se emplea la fluorescencia de IDCC extrínseca. Además, el uso de IDCC-SSB permite también un análisis fácil del efecto de las concentraciones de PcrA y RepD sobre el desenrollamiento observado, que anteriormente había estado limitado por la fluorescencia de los componentes como ruido de fondo.

En otro ejemplo, se analizó el desenrollamiento de DNA plasmídico linearizado mediante un mutante deficiente en nucleasa del *B. subtilis* AddAB helicasa-nucleasa (Figura 10). AddAB es un análogo funcional de RecBCD que está implicado también en el procesamiento de roturas de DNA para reparación por recombinación. Este análogo se une estrechamente a extremos de DNA libres y, en presencia de ATP, transloca y desenrolla el DNA de modo rápido y capacidad de procesamiento [30]. El resultado obtenido a partir del sensor IDCC-SSB se comparó directamente con los de los ensayos de desplazamiento de colorante [1], en fuerza iónica tanto baja como alta. En fuerza iónica baja AddAB desenrolla >90% del DNA sustrato a una velocidad máxima observada de 400 nM nucleótidos.s⁻¹ (equivalente a ~ 1000 bp s⁻¹ por sitio de unión de AddAB). Como podría esperarse de una proteína de unión de DNA, el desenrollamiento de DNA catalizado por AddAB es menos efectivo en fuerza iónica alta, y tanto la extensión como la velocidad máxima observada (85 nM de nucleótidos.s⁻¹) de la reacción están disminuidas. Es importante, sin embargo, conocer que el ensayo de desplazamiento de colorante produce trazas similares a las obtenidas empleando IDCC-SSB sin tener en cuenta la fuerza iónica; las velocidades máximas observadas son 340 y 110 nM de nucleótidos.s⁻¹, respectivamente. Como era de esperar, la amplitud de desenrollamiento observada era proporcional a la concentración de DNA sustrato y la medida de una traza aislada de DNA sustrato 50 nM (en nucleótidos) retenía una razón excelente de señal a ruido (Figura 10b).

Discusión:

Se describe la caracterización de SSB de *E. coli* marcada con un único fluoróforo por subunidad para uso como un biosensor sin reactivo para ssDNA. Aun cuando se ensayaron tipos diferentes de fluoróforos las mejores propiedades de las señales se obtuvieron con un derivado de dietilaminocumarina, IDCC. Cuando está unido a la cisteína de la SSB de *E. coli* G26C, el rendimiento cuántico de fluorescencia es similar al de la cumarina en una molécula pequeña en medio acuoso. Al unirse DNA a la SSB de *E. coli* hay un gran aumento de la intensidad de la fluorescencia, pero esencialmente no hay cambio en la absorbancia de la cumarina.

Experimentos de competición realizados con SSB de *E. coli* sin marcar, sugieren que esta última une ssDNA ~20 veces más firmemente que lo que lo hace la IDCC-SSB de *E. coli*. Incluso así, la proteína marcada todavía fija DNA muy firmemente y parece carecer de fijación de dsDNA en las condiciones de salinidad alta empleadas en este estudio. Fue posible realizar una titulación de dT70 en tetrámeros de IDCC-SSB de *E. coli* 2,5 nM. La forma de la respuesta de fluorescencia era similar a la de la Figura 1, así como la $K_d \gg 2,5$ nM, pero no fue posible obtener una estimación del valor. Las cinéticas de asociación y disociación fueron modeladas utilizando un mecanismo de dos etapas. De éste, la etapa 1 posee una constante de equilibrio ($1/K_1$) de 518 nM. En cuanto a $k_{+2} = 642$ s⁻¹ y $k_{-2} \sim 0,1$ s⁻¹, la constante de disociación global es ~ 80 pM.

El trabajo previo sobre las cinéticas [15] permitió distinguir tres etapas en el mecanismo de unión, mediante la obtención de resultados de resolución de microsegundos empleando técnicas de relajación. Las etapas fueron interpretadas en términos de envoltura del DNA en torno al tetrámero. Otro estudio [31] que utilizó, en particular, DNA marcado con fluoróforos y métodos de flujo detenido (y así tiempos de milisegundos), tenía un mecanismo de unión de dos etapas siendo la primera etapa, probablemente, una difusión regulada. En las presentes medidas, la pendiente de la tangente a la hipérbola de la Figura 2B en baja concentración de DNA es $k_{+2}K_1$ en términos del mecanismo de la Ecuación 1, asumiendo que la etapa 1 es rápida con relación a la etapa 2. Esta pendiente es ~109 M⁻¹s⁻¹, lo que sugiere también que la unión puede estar regulada por difusión. Los estudios previos estimaron la constante de velocidad de disociación como 0,044 s⁻¹ a 25°C y NaCl 200 mM, probablemente consistente con el valor obtenido aquí. También pusieron de manifiesto que las cinéticas son muy dependientes de la concentración salina y de si el anión es cloruro o bromuro.

En las concentraciones utilizadas en la medida de cinéticas de disociación, cualquier DNA disociado debe unirse al cepo, SSB de *E. coli* sin marcar en ~25 s⁻¹, incluso a la concentración más baja. Esto sugiere, asimismo, que la disociación es más compleja que la simple separación de DNA y proteína. Si el DNA se desenrolla en varias etapas, la SSB de *E. coli*, cepo, podría comenzar a unir a la cadena de DNA parcialmente separada, antes de la disociación completa desde la SSB de *E. coli* marcada. En este caso la unión bimolecular de la SSB de *E. coli* al cepo está en competencia no con la reunión bimolecular de SSB de *E. coli* marcada, al DNA, sino la re-envoltura unimolecular del DNA parcialmente separado.

Los ensayos de helicasas demuestran que el complejo IDCC-SSB de *E. coli* puede utilizarse con alta resolución de tiempo y alta sensibilidad. Esta sonda no requiere cofactores y por tanto está incluida en la clase de biosensores sin reactivo. Los resultados sugieren que el ensayo es entre uno y dos ordenes de magnitud más sensible que el uso de la fluorescencia del triptófano con SSB de *E. coli* [3]. Este último ensayo puede tener también limitaciones debido a

fotoblanqueo e interferencia procedente de otras especies que absorben en la misma región de longitudes de onda que el triptófano. Aparte de aspectos de sensibilidad, el ensayo que utiliza IDCC-SSB de E.coli tiene la ventaja de que la fluorescencia aumenta al formarse ssDNA, lo que hace potencialmente más fácil medir extensiones bajas de reacción frente a un ruido de fondo de fluorescencia bajo..

- 5 El uso de IDCC-SSB evita las limitaciones de la fluorescencia interna del triptófano, con respecto a la carencia de sensibilidad, fotoblanqueo e interferencia procedente de otras especies, tales como proteínas y ácidos nucleicos que absorben en la misma región de longitudes de onda UV que el triptófano. El uso de IDCC-SSB es entre uno y dos ordenes de magnitud más sensible que el uso de la fluorescencia interna del triptófano en ensayos equivalentes con helicasas, donde la disminución máxima de fluorescencia es una tercera parte del valor de partida, en oposición a un aumento de ~6 veces con IDCC-SSB. Sin duda, es posible detectar fácilmente el desenrollamiento de concentraciones nanomolares bajas (en nucleótidos) de DNA con buena razón de señal a ruido (Figura 10b).

- 10 Los ensayos que se basan en colorantes que se unen a dsDNA pueden ofrecer buena sensibilidad, pero pueden dar por resultado fotoescisión del DNA sustrato o inhibición de la reacción de interés [32, 33]. Verdaderamente, no fue posible obtener una señal útil del desenrollamiento de DNA mediante el sistema PcrA-RepD utilizando el ensayo de desplazamiento de colorante (resultados no expuestos), Además, el tanto por ciento de carga del colorante sobre el DNA puede afectar a su unión y a las propiedades de fluorescencia debido a amontonamiento de los sitios de unión [34]. Además, existe una disminución de fluorescencia a medida que se forma ssDNA, Por el contrario, el ensayo que emplea IDCC-SSB pone de manifiesto un aumento de fluorescencia al formarse ssDNA, lo que hace más fácil medir bajas extensiones de reacción frente a un ruido de fondo de fluorescencia bajo.

- 15 Consideraciones prácticas del uso de IDCC-SSB en ensayos con helicasas, giran en parte sobre las propiedades ópticas, como se ha indicado anteriormente. Las concentraciones apropiadas de IDCC_SSB añadidas dependerán de la sensibilidad requerida de la medida, de la afinidad de esta proteína para el DNA y de una razón adecuada de SSB respecto a DNA. En alta fuerza iónica la constante de disociación obtenida de una titulación con dT70 es ~2,6 nM. Aun cuando ésta no tiene en cuenta la cooperatividad potencial en la unión a DNA más largos, proporciona una guía con respecto a los límites inferiores de concentraciones. Además, con objeto de obtener una respuesta relativamente lineal de DNA frente a fluorescencia, una buena consideración de trabajo es usar el equivalente de aproximadamente un monómero de IDCC-SSB por una longitud de cinco bases de ssDNA. Esto aseguraría que no solamente permanecerá en exceso el IDCC-SSB sobre el DNA cualquiera que sea el modo de unión, sino que también la respuesta de señal tendrá aproximadamente una respuesta lineal, equivalente a la primera parte de las titulaciones. A semejanza de muchos ensayos de fluorescencia, puede necesitarse una curva de calibración para una cuantificación completa.

- 20 El IDCC-SSB puede utilizarse con alta resolución de tiempo y alta sensibilidad para medir la actividad de helicasas en soluciones masivas. Debido a la alta sensibilidad y al aumento de la fluorescencia durante el desenrollamiento de dsDNA, este biosensor o variantes basadas en SSB pueden utilizarse potencialmente para el estudio de cualquier transacción de DNA que lleve consigo intermedios de DNA usando técnicas masivas, de alta productividad o de moléculas sencillas.

- Rodamina-mutantes de SSB (W88C)

Resultados:

- 40 Con objeto de obtener ventaja de la longitud de onda más larga y alta fotoestabilidad de la rodamina, ha sido desarrollado un mutante de la SSB de E.coli de una cisteína solamente (W88C) marcado con 6-yodoacetamidotetrametilrodamina (6-IATR). Se obtuvieron intensificaciones de fluorescencia de ~4.5 veces en la unión de DNA con relación a la fluorescencia, en ausencia DNA monocatenario.

- 45 Los espectros tanto de fluorescencia como de absorbancia muestran cambios grandes cuando se une DNA (Figura 6). El espectro de absorbancia muestra los cambios esperados de una desviación del equilibrio monómero-dímero para la rodamina. El dímero (λ_{max} ~520 nm) posee un espectro de absorbancia diferente del del monómero (λ_{max} ~550 nm) y tiene poca fluorescencia o no tiene fluorescencia en comparación con el monómero [35]. Para este aducto, el punto isobéptico está en 534 nm, 6 nm mayor que el del aducto de 6-IATR.-sulfonato de 2-mercaptoetilo [36]. Por tanto se utilizó el mismo coeficiente de extinción (52 mM⁻¹ cm⁻¹) pero en 534 nm, con objeto de cuantificar la proteína marcada..

- 50 Los espectros de fluorescencia ponen de manifiesto un aumento de fluorescencia de ~4,5 veces después de la adición o bien de dT70 (Figura 6) o poli-dT (el poli-dT consiste en cadenas de poli(dT) de diversas longitudes, cada una de cuyas longitudes tiene, aproximadamente, algunos cientos de bases; resultados no expuestos). Una titulación de dTto en rodamina-SSB de E.coli (Figura 7) muestra un ascenso aproximadamente lineal de fluorescencia hasta que la proteína está saturada en 1:1 dT70: tetrámero de SSB de E. coli. Un cambio de fluorescencia similar se observó con poli-dT (resultados no indicados). Esto sugiere que la fluorescencia no resulta afectada cuando dos tetrámeros están próximos uno a otro a lo largo de un fragmento de DNA largo, en oposición a un tetrámero que une una longitud de 70 nucleótidos, que es la longitud mínima a enrollar en torno a un tetrámero. La titulación indica también que existe una unión estrecha de DNA a rodamina-SSB de E.coli. La ligera curvatura es

debida, probablemente, a la pequeña cantidad de proteína sin marcar que fija DNA más estrechamente, como se ha descrito anteriormente para el IDCC-SSB de *E. coli* marcado con cumarina.

Discusión :

5 Las propiedades ópticas sugieren que la base del cambio de fluorescencia con esta rodamina-SSB de *E. coli* es el cambio en extensión de apilación de dos monómeros de rodamina cuando el ssDNA se une a la proteína. La rodamina monómera posee un rendimiento cuántico alto de fluorescencia . Dos restos de rodamina, cuando físicamente están próximos uno a otro y orientados correctamente, pueden apilarse [37, 41]. Esta propiedad de las rodaminas ha sido utilizada anteriormente en muchos ensayos y en un biosensor de fosfato inorgánico, utilizando una proteína que une fosfato, doblemente marcada con rodamina (rodamina-PBP)[42]. El mecanismo mediante el cual ocurre esta extinción tiene lugar por medio de un proceso denominado copulación de excitón, ha sido discutido [43-45]

15 En el caso de rodamina-SSB de *E. coli*, la cisteína aislada de cada subunidad da lugar a una sola rodamina. Según las estructuras cristalinas conocidas [12, 13] las cisteínas están situadas en horquillas β y las horquillas de subunidades adyacentes son paralelas y tienen una superficie que contacta unas con otras. Según estas estructuras, esta región cambia poco en la unión de DNA; la distancia existente entre los átomos de $C\alpha$ de los dos triptófanos de subunidades adyacentes de proteína SSB de *E. coli* sin modificar permanece en $\sim 1,8$ nm. En la estructura con DNA unido, parece improbable que las dos rodaminas situadas sobre horquillas adyacentes puedan apilarse una con otra: el DNA está, probablemente, manteniendo estos bucles rígidos y crea una barrera física para las rodaminas que se alcanzan una con otra. La situación es menos clara para la estructura libre de DNA. Los bucles pueden ser más flexibles y la falta de DNA sobre la superficie permite más libertad de posición. Además, la estructura posee un par de horquillas paralelas, antiparalelas con respecto a otro par, que cae adyacente; esto refleja, posiblemente, interacciones de tetrámero-tetrámero

25 La rodamina-SSB de *E. coli* complementa la IDCC-SSB de *E. coli* marcada con cumarina. Esta última tiene un cambio de fluorescencia mayor y posee la ventaja de que cualquier impureza de cumarina (tal como proteína doblemente marcada o cumarina sin enlazar) aporte, probablemente, solo una fluorescencia baja al ruido de fondo. La longitud de onda más alta de la rodamina proporciona ventajas para la fuente óptica y la fotoestabilidad, aun cuando es probable que las impurezas de rodamina aporten fluorescencia alta al ruido de fondo.. Sin embargo, sin purificación extraordinaria alguna, se obtiene un cambio de fluorescencia de $\sim 4,5$ veces. Por consiguiente, esta molécula es, probablemente, adecuada para aplicaciones tales como ensayos de alta productividad y estudios de moléculas sencillas en donde puede usarse una luz intensa de excitación.

Referencias

- [1] Eggleston, A. K., Rahim, N. A., and Kowalczykowski, S. C. (1996) A helicase assay based on the displacement of fluorescent, nucleic acid-binding ligands, *Nucleic Acids Res.* 24, 1179-1186.
- [2] Rye, H. S., Quesada, M. A., Peck, K., Mathies, R. A., and Giazar, A. N. (1991) High-sensitivity two-color detection of double-stranded DNA with a confocal fluorescence gel scanner using ethidium homodimer and thiazole orange, *Nucl. Acids Res.* 19, 327-333.
- [3] Roman, L. J., and Kowalczykowski, S. C. (1989) Characterization of the helicase activity of the *Escherichia coli* recBCD enzyme using a novel helicase assay, *Biochemistry* 28, 2863-2873.
- [4] Brune, M., Hunter, J. L., Howell, S. A., Martin, S. R., Hazlett, T. L., Corrie, J. E. T., and Webb, M. R. (1998) Mechanism of inorganic phosphate interaction with phosphate binding protein from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 37, 10370-10380.
- [5] Tolosa, L., Gryczynski, I., Eichhorn, L. R., Dattelbaum, J. D., Castellano, F. N., Rao, G., and Lakowicz, J. R. (1999) Glucose sensor for low-cost lifetime-based sensing using a genetically engineered protein, *Anal. Biochem.* 267, 114-120.
- [6] Dattelbaum, J. D., Looger, L. L., Benson, D. E., Sali, K. M., Thompson, R. B., and Hellinga, H. W. (2005) Analysis of allosteric signal transduction mechanisms in an engineered fluorescent maltose biosensor, *Protein Sci.* 14, 284-291.
- [7] Dwyer, M. A., and Hellinga, H. W. (2004) Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 495-504.
- [8] Moschou, E. A., Bachas, L. G., Daunert, S., and Deo, S. K. (2006) Hinge-Motion Binding Proteins: Unraveling Their Analytical Potential, *Anal. Chem.* 78, 6692 - 6700.
- [9] Webb, M. R. (2006) Development of fluorescent biosensors for probing the function of motor proteins, *Molecular Biosystems submitted*.
- [10] Murzin *et al.*, (1995) 3 Mol Biol 247, 536-540.
- [11] Lohman, T. M., and Ferrari, M. E. (1994) *Escherichia Coli* Single-Stranded DNA-Binding Protein: Multiple DNA-Binding Modes and Cooperativities, *Annual Review of Biochemistry* 63, 527-570.
- [12] Raghunathan, S., Kozlov, A. G., Lohman, T. M., and Waksman, G. (2000) Structure of the DNA binding domain of *E. coli* SSB bound to ssDNA, *Nature Struct. Biol.* 7, 648-652.
- [13] Raghunathan, S., Ricard, C. S., Lohman, T. M., and Waksman, G. (1997) Crystal structure of the homo-tetrameric DNA binding domain of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein determined by multiwavelength x-ray diffraction on the selenomethionyl protein at 2.9-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6652-6657.
- [14] Lohman, T. M., Green, J. M., and Beyer, R. S. (1986) Large-scale overproduction and rapid purification of the *Escherichia coli* ssb gene product. Expression of the ssb gene under λ -PL control, *Biochemistry* 25, 21-25.
- [15] Kuznetsov, S. V., Kozlov, A. G., Lohman, T. M., and Ansari, A. (2006) Microsecond Dynamics of Protein-DNA Interactions: Direct Observation of the Wrapping/Unwrapping Kinetics of Single-stranded DNA around the *E. coli* SSB Tetramer, *J. Mol. Biol.* 359, 55-65.
- [16] Bujalowski, W., and Lohman, T. M. (1991) Monomers of the *Escherichia coli* SSB-1 mutant protein bind single-stranded DNA, *J. Mol. Biol.* 217, 63-74.
- [17] Corrie, J. E. T. (1994) Thiol-reactive fluorescent probes for protein labelling, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2975-2982.
- [18] Fletcher, A. N., and Bliss, D. E. (1978) Laser dye stability. Part 5. Effect of chemical substituents of bicyclic dyes upon photodegradation parameters, *Appl. Phys.* 16, 289-295.
- [19] Leatherbarrow, R. J. (2001) *Graft Version 5*, Erithacus Software Ltd., Horley, U.K.

- [20] Zhang, W., M. S. Dillingham, C. D. Thomas, S. Allen, C. J. Roberts, and P. Soultanas. 2007. Directional loading and stimulation of PcrA helicase by the replication initiator protein RepD. *J. Mol. Biol.* 371:336-348.
- [21] Yeeles, J. T. P., and M. S. Dillingham. 2007. A dual-nuclease mechanism for DNA break processing by AddAB-type helicase-nucleases. *J. Mol. Biol.* 371:66-78.
- [22] Singleton, M. R., M. S. Dillingham, M. Gaudier, S. C. Kowalczykowski, and D. B. Wigley. 2004. Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* 432:187-193.
- [23] Webb, M. R., and Corrie, J. E. T. (2001) Novel coumarin-labeled analogues of purine nucleotides as fluorescent probes of the actomyosin ATPase, *Biophys. J.* 80, 76a.
- [24] Dillingham, M. S., Webb, M. R., and Kowalczykowski, S. C. (2005) Bipolar DNA translocation contributes to highly processive DNA unwinding by RecBCD enzyme, *J. Biol. Chem.* 280, 37069-37077
- [25] Roman, L. J., and S. C. Kowalczykowski. 1989. Characterization of the helicase activity of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme using a novel helicase assay. *Biochemistry* 28:2863-2873.
- [26] Bianco, P. R., L. R. Brewer, M. Corzett, R. Balhorn, Y. Yeh, S. C. Kowalczykowski, and R. J. Baskin. 2001. Processive translocation and DNA unwinding by individual RecBCD enzyme molecules. *Nature* 409:374-377.
- [27] Dillingham, M. S., M. R. Webb, and S. C. Kowalczykowski. 2005. Bipolar DNA translocation contributes to highly processive DNA unwinding by RecBCD enzyme. *J. Biol. Chem.* 280:37069-37077.
- [28] Thomas, C. D., D. F. Balson, and W. V. Shaw. 1990. *In vitro* studies of the initiation of Staphylococcal plasmid replication. Specificity of RepD for its origin (*oriD*) and characterization of the RepD-*ori* tyrosyl ester intermediate. *J. Biol. Chem.* 265:5519-5530.
- [29] Soultanas, P., M. S. Dillingham, F. Papadopoulos, S. E. Phillips, C. D. Thomas, and D. B. Wigley. 1999. Plasmid replication initiator protein RepD increases the processivity of PcrA DNA helicase. *Nucleic Acids Res.* 27:1421-1428.
- [30] Chedin, F., and S. C. Kowalczykowski. 2002. A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram-positive bacteria: insights into the initiation of DNA recombination. *Mol. Microbiol.* 43:823-834.
- [31] Kozlov, A. G., and Lohman, T. M. (2002) Stopped-Flow Studies of the Kinetics of Single-Stranded DNA Binding and Wrapping around the ϕ -*Escherichia coli* SSB Tetramer, *Biochemistry* 41, 6032-6044.
- [32] Akerman, B., and E. Tuite. 1996. Single- and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO. *Nucleic Acids Res.* 24:1080-1090.
- [33] OhUigin, C., D. J. McConnell, J. M. Kelly, and W. J. M. van der Putten. 1987. Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucleic Acids Res.* 15:7411-7427.
- [34] Carisson, C., M. Johnson, and B. Akerman. 1995. Double bands in DNA gel electrophoresis caused by bis-intercalating dyes. *Nucleic Acids Res.* 23:2413-2420.
- [35] Chambers, R. W., Kajiwara, T., and Kearns, D. R. (1974) Effect of dimer formation on the electronic absorption and emission spectra of ionic dyes, *J. Phys. Chem.* 78, 380-387
- [36] Corrie, J. E. T., and Craik, J. S. (1994) Synthesis and characterisation of pure isomers of iodoacetamidotetramethylrhodamine, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2967-2974.
- [37] Förster, T., and König, E. (1957) Absorptionsspektren und Fluoreszenzeigenschaften konzentrierter Lösungen organischer Farbstoffe, *Z. Elektrochem.* 61, 344-348.

- [38] Selwyn, J. E., and Steinfeld, J. I. (1972) Aggregation equilibria of xanthene dyes, *J. Phys. Chem.* 76, 762-774.
- [39] Geoghegan, K. F., Rosner, P. J., and Hoth, L. R. (2000) Dye-pair reporter systems for protein-peptide molecular interactions, *Bioconjugate Chem.* 11, 71-77.
- [40] Blackman, M. J., Corrie, J. E. T., Croney, J. C., Kelly, G., Eccleston, J. F., and Jameson, D. M. (2002) Structural and biochemical characterization of a fluorogenic rhodamine-labeled malarial protease substrate, *Biochemistry* 41, 12244-12252.
- [41] Packard, B. Z., Toptygin, D. D., Komoriya, A., and Brand, L. (1996) Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11640-11645.
- [42] Okoh, M. P., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T., and Webb, M. R. (2006) A biosensor for inorganic phosphate using a rhodamine-labeled phosphate binding protein, *Biochemistry* 45, 14764 - 14771.
- [43] Kasha, M. (1963) Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates, *Radiat. Res.* 20, 55-70.
- [44] Kasha, M., Rawls, H. R., and Ashraf El-Bayoumi, M. (1965) The exciton model in molecular spectroscopy, *Pure Appl. Chem.* 11, 371-392.
- [45] Scholes, G. D., and Ghiggino, K. P. (1994) Electronic interactions and interchromophore electron transfer, *J. Phys. Chem.* 98, 4580-4590.
- [46] Chen, J., Smith, D. L., and Griep, M. A. (1998) The role of the 6 lysines and the terminal amine of *Escherichia coli* single-strand binding protein in its binding of single-stranded DNA, *Protein Science* 7, 1781-1788.
- [47] CAA 11: 149330
- [48] Morin, N., Delsert, C., and Klessig, D. F. (1989) Mutations that affect phosphorylation of the adenovirus DNA-binding protein alter its ability to enhance its own synthesis, *Journal of Virology* 63, 5228-5237.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una proteína de dominio de unión de DNA monocatenario, familia SSB, que comprende al menos un marcador detectable unido a un aminoácido de la proteína, en donde las características del marcador detectable se modifican al unir DNA monocatenario.
- 5 2.- Una proteína según la reivindicación 1, que es sensible a la unión de DNA monocatenario, en donde el marcador detectable se une a una región de la superficie de la proteína.
- 3.- Una proteína según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el marcador detectable se une por medio de un resto de cisteína de la proteína.
- 10 4.- Una proteína según la reivindicación 3, en donde el resto de cisteína ha sido construido en la secuencia de la proteína.
- 5.- Una proteína según cualquier reivindicación precedente, que es una SSB de E. coli modificada.
- 6.- La proteína según la reivindicación 5, en donde la SSB de E. coli modificada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 4.
- 15 7.- Una proteína según la reivindicación 4, que es una SSB de E. coli mutada que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 que comprende:
- i) la mutación S92C, G26C o W88C, o
- ii) un resto de cisteína construido en la secuencia de la proteína para reemplazar a uno o más de los restos M23-A28 y K87-Q94.
- 20 8.- Una proteína según cualquier reivindicación precedente, en donde el marcador detectable es un marcador fluorescente.
- 9.- La proteína según la reivindicación 8, en donde el marcador detectable es una cumarina o una rodamina.
- 10.- Una proteína según la reivindicación 9, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en cumarinas tales como N-[2-(yodoacetamido)etil]-7-dietilaminocumarina-3-carboxamida; MANS, ácido 2-(4'-maleimidilnilino)naftaleno-6-sulfónico (IDCC), N-[2-(1-maleimidil)etil]-7-dietilaminocumarina-3-carboxamida (MDCC), Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 546, y rodaminas tales como 6-yodoacetamidotetrametilrodamina (6-IATR).
- 25 11.- Una proteína según la reivindicación 10, en donde el marcador es IDCC ó 6-IATR.
- 12.- Una proteína según cualquier reivindicación precedente, que comprende más de un marcador detectable.
- 13.-Un procedimiento de preparación de una proteína SSB según cualquier reivindicación precedente, que comprende la modificación de una SSB para incluir un marcador detectable unido a un aminoácido de la proteína.
- 30 14.- Un método para detectar DNA monocatenario en una muestra, que comprende las etapas de:
- (i) mezclar la muestra con la proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y
- (ii) detectar un cambio en la mezcla que proviene de la interacción entre el DNA monocatenario y la proteína SSB,
- 35 15.- Un método de selección de inhibidores de enzimas de tratamiento de DNA, que comprende analizar los niveles de DNA monocatenario in vitro empleando una SSB según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en presencia y ausencia de los inhibidores, y analizar una alteración de los niveles de DNA monocatenario.

FIG. 1A

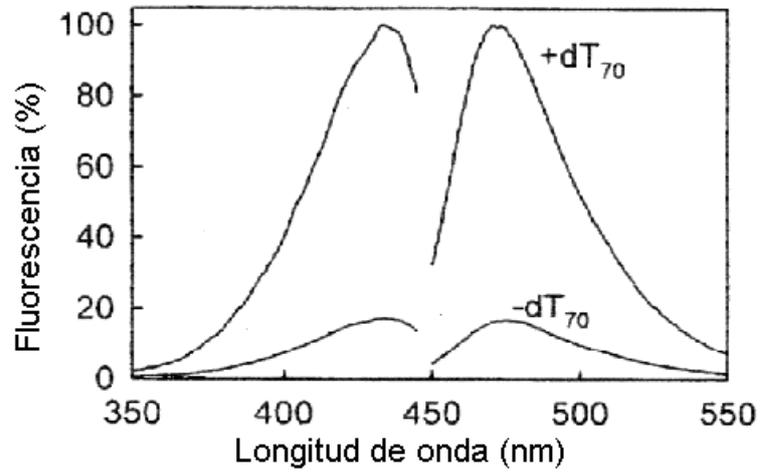


FIG. 1B

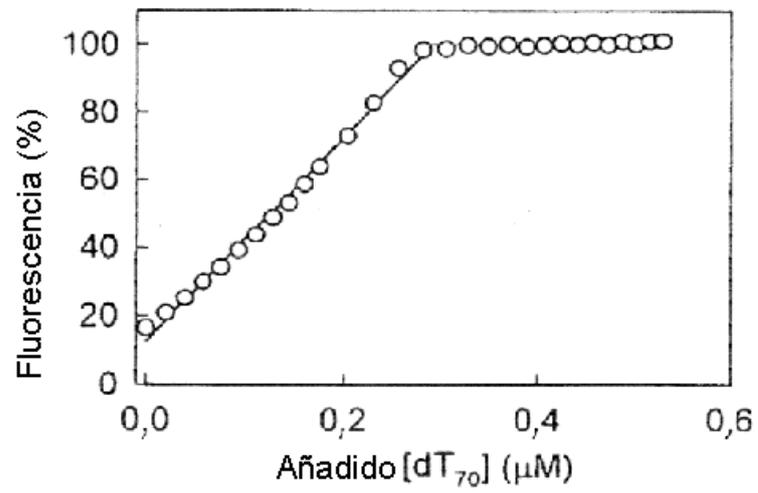


FIG. 2A

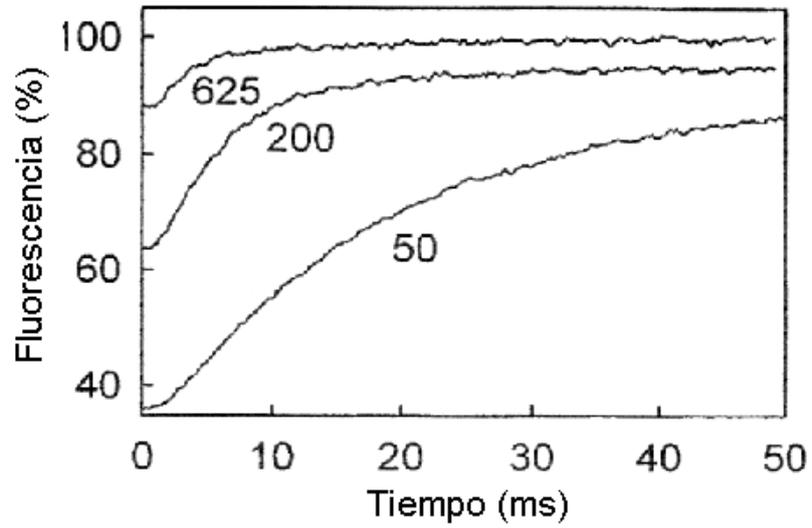


FIG. 2B

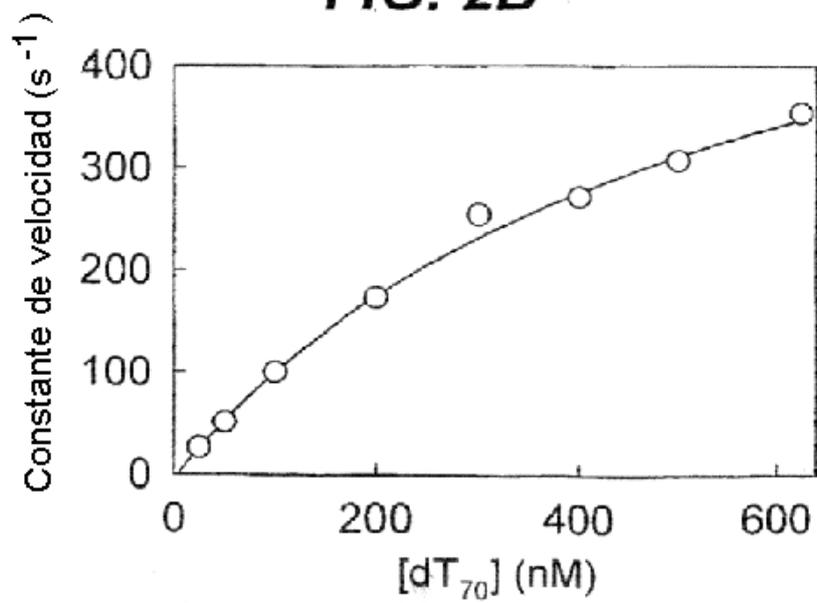


FIG. 3

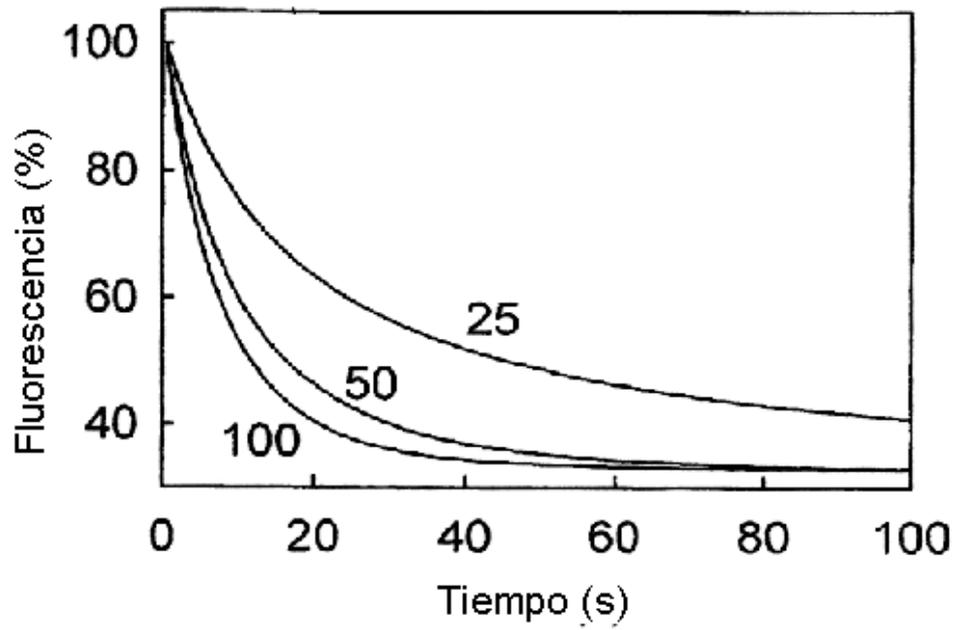


FIG. 4

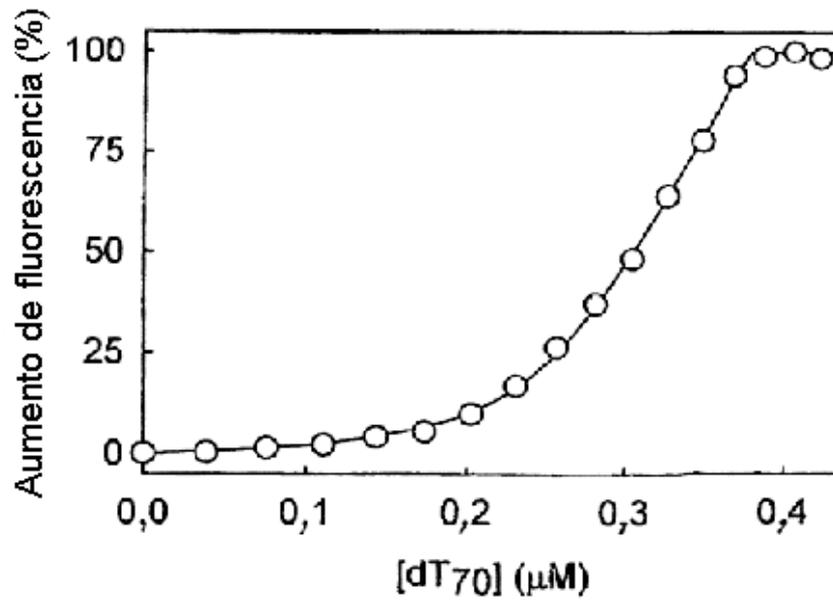


FIG. 5

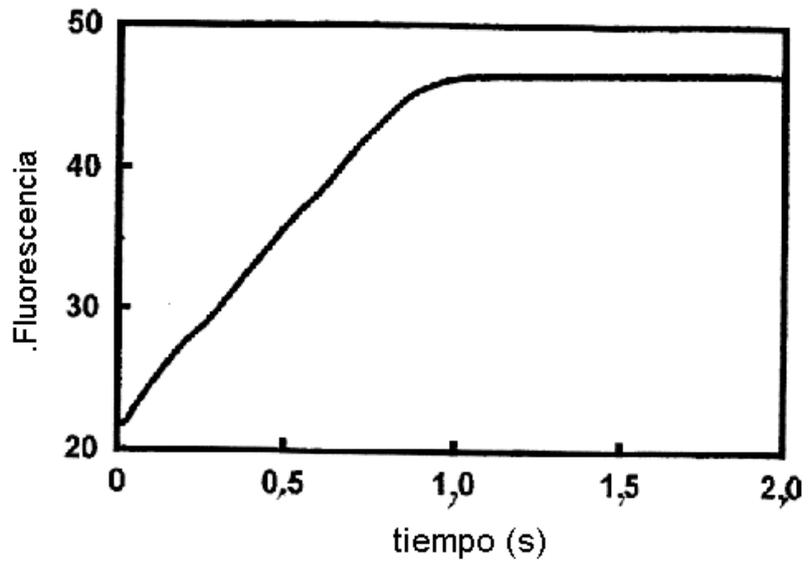


FIG. 7

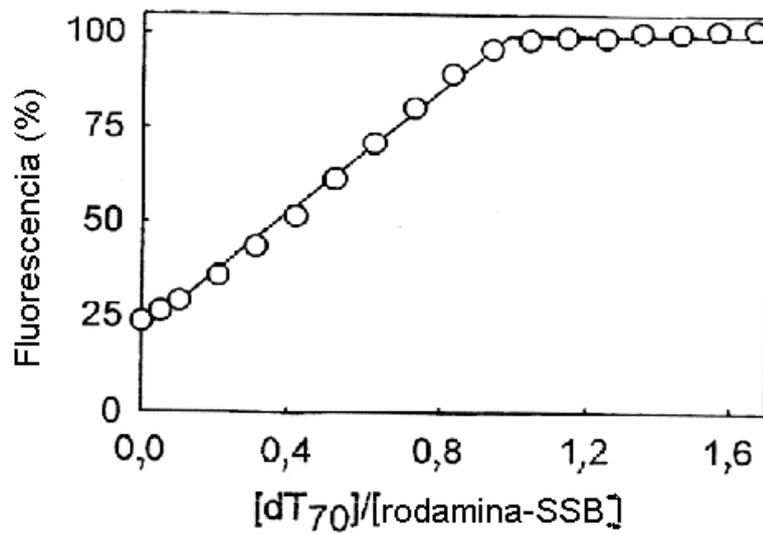


FIG. 6A

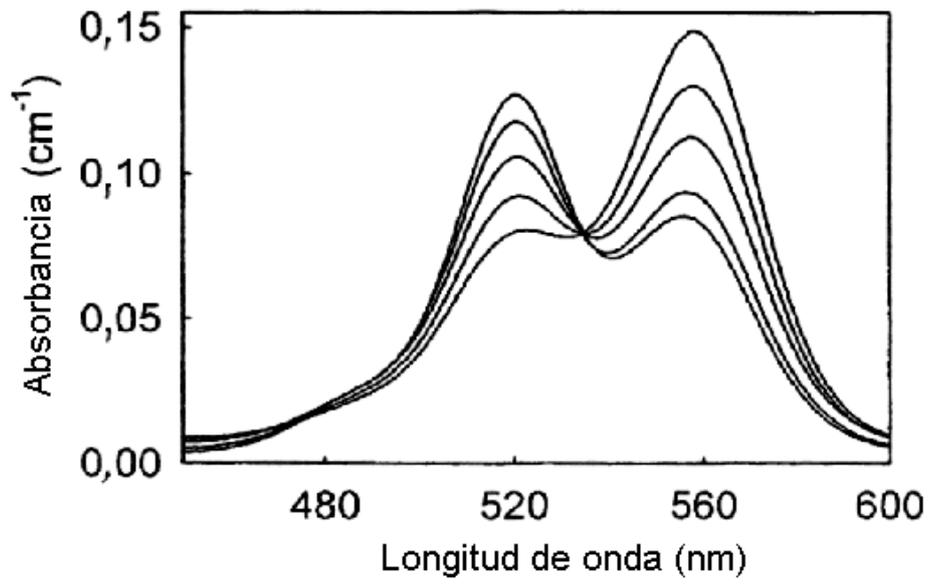


FIG. 6B

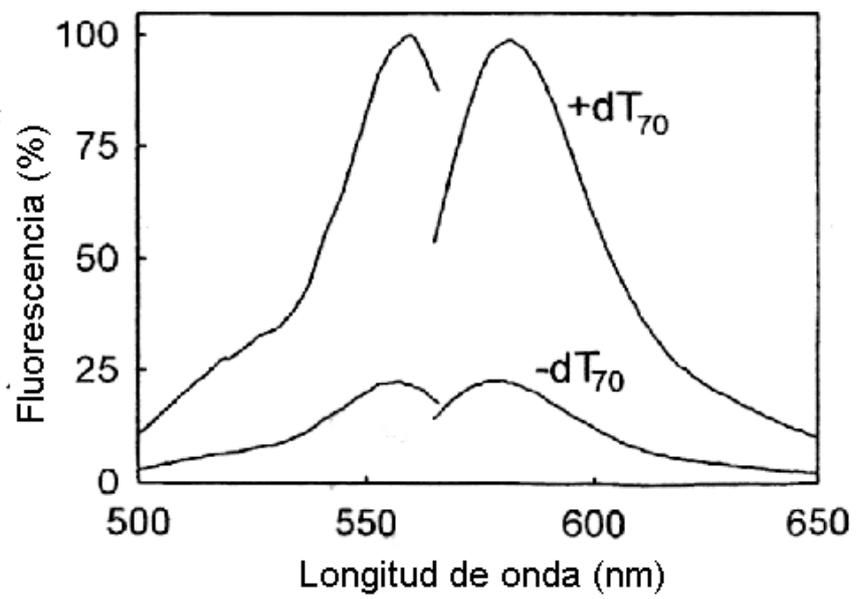


FIG. 8

Escherichia coli 1790494	MASRGVNKVLVGNLGDPEVRYMPNGGAVANITLAISESWRDKATGEMKEQTENHRVVL
Enterobacteria phage P1 46401640	MAQRGVNKVLIGTLGQDPEIRYIPNGGAVGRLSIATNESWRDKQTGQQKEQTENHKVVVL
Salmonella typhimurium 20521565	MSARGINKVILVGRLGNDPEVRYIPNGGAVANLQVATSESWRDKQTGEMREQTENHRVVL
Bacillus licheniformis 52350536	----MLNRVVLVGRLLTKDPELRYTPSGAAVATFLLAVNRFTFTNQOG---EREADFINCVV
Campylobacter jejuni 24115640	-----MNQVNLGGYLGKDFELKYPNGSAFAKFTLVGVSENRRNEKG-EYEAYTSWIPIL
Pseudomonas syringae 38257082	-MARGINKVILVGTGGQDPCRYLPNGTAVTNLSLATSEQWTDKQSGQKVEKTEWHRVSL
Listeria innocua 16799117	----MMNRVVLVGRLLTKDPELRYTPAGVAVATFLLAVNRFTFTNQOG---EREADFINCVV
Escherichia coli 1790494	FGKLAEVASEYLRKGSQVYIEGQLRTRKWTQDSGQDRYTTTEVVVVVGGTMMQLGGRQGGG
Enterobacteria phage P1 46401640	FGKLAEIASEYLRKGSQVYIEGKLRKWTDDAGVERYTEIIVSQGGTMMIGARRDD
Salmonella typhimurium 20521565	FGKLAEVAGEYLRKGAQVYIEGQLRTRSWDDN-GITRYITEILVKTGTMMIGSAPQON
Bacillus licheniformis 52350536	WRRQAEVANFLKKSGLAGVDGRLQTRSYENQOQRVYVTEVQAESVQFLEPKG--GCSG
Campylobacter jejuni 24115640	FGRKAEVANQYIKKGRFLGTGKI VTSYTDQYGNIRYGMQVVISSEFIEKKAEQND
Pseudomonas syringae 38257082	FGKVAEIAAGEYLRKGSQVYIEGKLTREWEKD-GIKRYYTEIIVVDMQGTMLLGGRRPQGD
Listeria innocua 16799117	WRKPAENVANFLKKSAGMAGVDGRVQTRNYEGNDGKRIVVTEIVAESVQFLEPRNSNGGGG

Escherichia coli 1790494	A---	PAGGNIGGQPOGGWGQPQQPOGGNQFS-GGAQS--RPOQSAPAAPSNPEPP-----
Enterobacteria phage P1 46401640	-----	SQSSNGWGSNQPONHQOYS-GGG-----KPOQNA-----NNEPP-----
Salmonella typhimurium 20521565	-----	AQAQPKPQONGQPOSADATKKGAKTKGRGRKAAQPEPQPQTPEGE-D
Bacillus licheniformis 52350536	S-----	GGYSGGQ-----GGQHFGGQNEPAPFGSSQNNQNRNQNSFNDDPFANDG
Campylobacter jejuni 24115640	-----	YKGEPOPNIITP-----PKEAETMQSIDENQ-----AE
Pseudomonas syringae 38257082	SQHSQNGQSGSDHQEPPROQAPOQAAPKPSGKGAAPKPPRASGKQAQAKAPQPPA	
Listeria innocua 16799117	N-----	NNYQGGNNNNYNNNGNFGOAPTNNGGFGDQQQSONQNYQSTNDDFFASDG
Escherichia coli 1790494	MDFD---	DDIPE
Enterobacteria phage P1 46401640	MDFD---	DDIPE
Salmonella typhimurium 20521565	YGFS---	DDIPE
Bacillus licheniformis 52350536	KPIDISDDDLPE	
Campylobacter jejuni 24115640	IYMQ--	DDENLPE
Pseudomonas syringae 38257082	GDFDGGDDNIFEMDPYRFNMLV	
Listeria innocua 16799117	KPIDISDDDLPE	

FIG. 8 (Continuación)

FIG. 9A

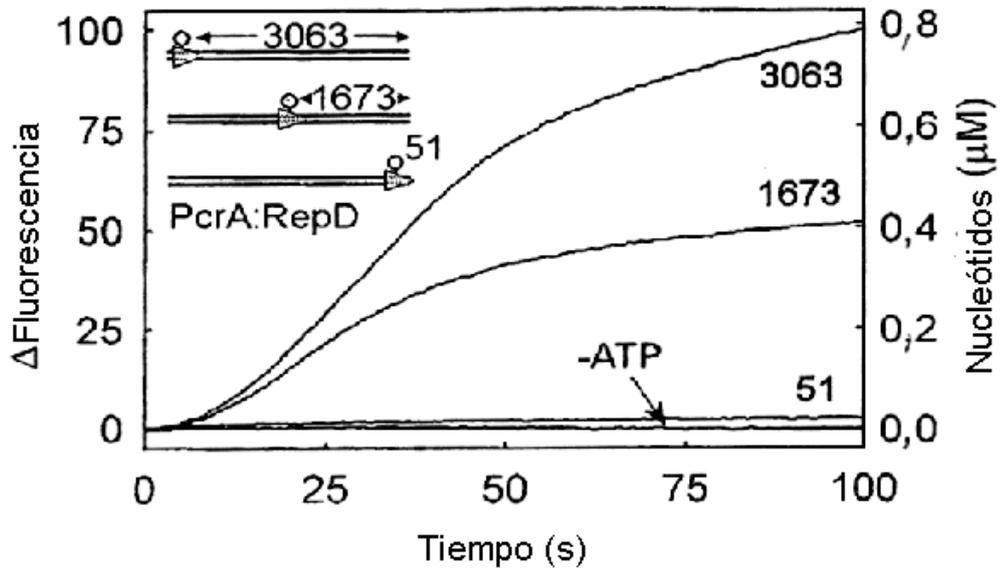


FIG. 9B

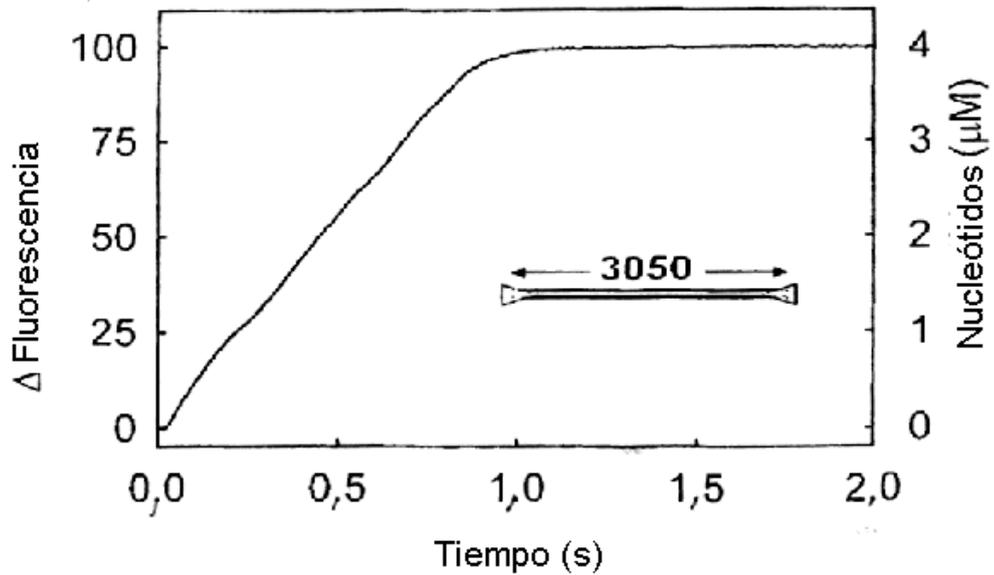


FIG. 10

