

## ***Conclusions generals***

### *Sobre la determinació estructural de la proteïna p4:*

La proteïna p4 cristal·litza amb 2M NaCl i 10% PEG 6000 en un cristall de simetria ròmbica i el grup espacial  $P2_12_12_1$ .

Els cristalls de proteïna p4 incorporen, de manera ordenada, el compost hexaclorplatínat, observant-se en el cristall un canvi en el grup espacial, passant de  $P2_12_12_1$  a  $C222_1$ .

S'ha determinat l'estructura de la proteïna p4 derivatitzada mitjançant el mètode de la dispersió anòmala amb múltiples longituds d'ona, utilitzant el platí com a dispersor anòmal, fins a una resolució de 3.5 Å. S'han estès les fases fins a 3 Å, el màxim de resolució disponible pel cristall derivatitzat amb hexaclorplatínat. S'ha afinat l'estructura a 3 Å, observant-se en el cristall 3 molècules de proteïna per unitat asimètrica, formant un dímer i mig.

S'ha resolt i afinat l'estructura de la proteïna p4 nativa fins a una resolució de 2 Å a partir dels cristalls de grup espacial  $P2_12_12_1$  mitjançant la tècnica del reemplaçament molecular, utilitzant com a model de cerca el dímer de proteïna p4 afinat fins a 3 Å.

### *Sobre l'estructura de la proteïna p4:*

La proteïna p4 presenta un plegament de tipus  $\alpha/\beta$  antiparal·lel, format per una fulla  $\beta$  central de 5 cadenes antiparal·leles envoltada, per una cara, per 3 hèlix  $\alpha$  i per l'altra d'una petita hèlix  $\alpha$  carboxi terminal. A l'extrem amino terminal presenta un *loop* o ganxo rígid, estabilitzat per nombroses interaccions.

La unitat funcional de la proteïna p4 és un dímer, amb simetria 2. Els contactes observats en la dimerització són tots de caràcter hidrofòbic, creant-se una cavitat interna sense solvent entre els dos protòmers on es situa el platí.

*Sobre la determinació estructural del complex p4-DNA:*

S'ha purificat el complex format per la proteïna p4 i un fragment de DNA de 41 parells de bases que conté el lloc d'unió del promotor A3 de la proteïna p4, mitjançant cromatografia d'exclusió de tamany molecular.

El complex p4-DNA cristal·litza amb Tris pH=8,5 100 mM; 20% PEG 2000 MME i MgCl<sub>2</sub> 100 mM en un cristall de simetria monoclínic i grup espacial P2.

S'ha determinat l'estructura de la proteïna p4 unida al seu lloc d'unió del promotor A3 fins a una resolució de 2.7 Å mitjançant la tècnica del reemplaçament molecular utilitzant com a models de cerca el dímer de la proteïna p4 afinat fins a 2 Å i fragments de DNA ideals en conformació B de 10 parells de bases.

*Sobre l'estructura del complex p4-DNA:*

La proteïna p4 s'uneix al DNA com a dímer i provoca una curvatura de 70° en el DNA. La proteïna p4 uneix el DNA d'una manera nova, contactant-lo per tres punts al llarg de l'eix longitudinal del DNA i en cada punt estabilitza l'estretament del solc menor provocant la curvatura.

Els contactes entre cada monòmer de p4 i el DNA es donen en 2 punts de l'estructura de p4. El primer correspon al *loop* o ganxo amino terminal que reconeix específicament dues bases del DNA introduint-se en el solc major del DNA. El segon punt de contacte el trobem en la zona de dimerització de la proteïna p4, on intervenen els mateixos residus en els dos monòmers.

Proposem d'anomenar aquest nou motiu d'unió al DNA, *hook binding motif*. La unió al DNA no provoca canvis en l'estructura de la proteïna p4, essent el DNA el que s'adapta a la forma de la proteïna.

La determinació estructural de la proteïna p4 i del seu complex amb DNA permet explicar la diferent afinitat pel seu lloc d'unió que presenten varis mutants puntuals de la proteïna p4.

L'estructura de la proteïna p4 complexada amb DNA ens permet proposar un mecanisme d'unió a DNA i un hipotètic model de interacció amb el domini carboxi terminal de la subunitat  $\alpha$  de la RNA polimerasa.