

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS  
QUIMÉRICAS DE RsbP CON EL DOMINIO SENSORIAL Per-ARNT-Sim Y  
DOMINIOS DE RESPUESTA HISTIDINA QUINASA Y FOSFATASA**

**POR**

**QFB. JESSICA JUDITH GÓMEZ LUGO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS  
con Orientación en Microbiología Aplicada**

**JUNIO, 2015**

**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS  
QUIMÉRICAS DE RsbP CON EL DOMINIO SENSORIAL Per-ARNT-Sim Y  
DOMINIOS DE RESPUESTA HISTIDINA QUINASA Y FOSFATASA**

**Revisión de tesis:**

---

**Dr. Xristo Zárate Kalfópulos**

**ASESOR**

---

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas**

**COMITÉ TUTORIAL**

---

**Dr. José Rubén Morones Ramírez**

**COMITÉ TUTORIAL**

---

**Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu**

**COMITÉ TUTORIAL**

---

**Dra. María Aracely Hernández Ramírez**

**SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que estuvieron presentes durante este trayecto en mi vida profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y CONACyT por el apoyo económico que me brindaron para llevar a cabo este proyecto. A la escuela de Graduados en Ciencias de la Facultad de Ciencias químicas por las instalaciones que me permitió utilizar.

A mi asesor de tesis, Dr. Xristo Zárate, por darme la oportunidad de trabajar a su lado y poner su confianza en mi, explicarme con paciencia y compartir su conocimiento conmigo. Por siempre comprarnos kits y todo el material que necesitábamos para trabajar mejor, y por apoyarme a realizar mi estancia en el extranjero. ¡Muchas Gracias Doc!

A mi comité evaluador, Dra. Ma. Elena Cantú, Dr. Rubén Morones y Dr. Juan Chiu, por el tiempo que invirtieron en la revisión de mi tesis, por sus criticas constructivas, correcciones, consejos y todo su apoyo.

A mis maestros, de quienes he aprendido mucho. Dra. Teresa Garza y Dr. Alberto Gómez. Especialmente quiero agradecer a mi querida maestra, Dra. Nena, por siempre confiar en mi, alentarme y apurarme, por todos sus consejos, tanto personales como académicos y sobre todo por su amistad y cariño.

A mi familia: Mami y Papi, por siempre apoyarme en todo lo que me he propuesto académicamente, por enseñarme a siempre perseguir mis sueños y a nunca rendirme aunque las situaciones sean difíciles y por estar a mi lado siempre. A mis hermanos, Paco y Sandy, por escucharme siempre. Especialmente a Daniel Barboza, por todo su apoyo, por esperarse conmigo en el laboratorio cuando tenía que quedarme hasta tarde con algún experimento, por buscar métodos alternos que me pudieran ayudar cuando una prueba no salía como lo esperaba, por siempre escucharme, por todo su amor y comprensión. ¡Gracias!

A mis queridos amigos buena onda de Biotecnología 2, por todos los buenos momentos que compartimos durante estos años. Tere Vargas, por ser la mejor amiga que pude encontrar, por siempre explicarme con paciencia, esperarme hasta tarde y cuidarme. Claudia Barahona, mi hermana PAS, por todo su apoyo emocional, por siempre ofrecerme su ayuda y por acompañarme durante las vacaciones y fines de semana en el laboratorio. A mi tercio de hermano, Isaac Díaz, por hacerme reír, escucharme y esperarme para comer. A mis amigos de INGEEN, Enrique y Papá Eder, por su amistad y todos sus consejos. Y finalmente, a los chicos de servicio social, con quien pude formar una linda amistad y quienes me ayudaban a preparar material: Oscar, Javier, Luis, Huberto, Alex y Kevin. ¡Muchas Gracias Chicos!

## **Dedicatoria**

*Este trabajo está dedicado a mi hermosa familia, mi motor.*

*A mis padres, y modelo a seguir Francisco Gómez Vega y Juana Lugo Torres.*

*A mis hermanos Paco Gómez y Sandy Gómez.*

*A mis amigos quienes me acompañaron en esta etapa*

*y a quienes guardo en mi corazón.*

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>11</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	11
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>19</b>
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1 Transducción de señales .....	19
2.2 Similitud con otros dominios.....	23
2.3 Proteínas quiméricas.....	23
2.4 Estructura del bucle enrollado .....	24
2.5 Estructura Cuaternaria .....	25
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>28</b>
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	28
3.1 Hipótesis.....	28
3.2 Objetivo General .....	28
3.3 Objetivos Específicos.....	29
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>30</b>
4. METODOLOGÍA .....	30
4.1 Materiales, reactivos y equipo .....	30
4.2 Metodología General .....	32
4.3 Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> .....	33
4.4 Recolección del sedimento celular de <i>B. subtilis</i> .....	33
4.5 Extracción de DNA Genómico .....	33
4.6 Amplificación de Insertos .....	34
4.7 Construcción de plásmidos .....	37
4.7.1 Digestión del plásmido pGEX-4T2 e Insertos.....	38
4.7.2 Ligación del plásmido pGEX-4T2 con los Insertos.....	39
4.7.3 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	40
4.7.4 Selección de transformantes y extracción de DNA plasmídico .....	41
4.7.5 Análisis de Restricción .....	41
4.8 Expresión de Proteínas.....	42
4.8.1 Transformación en <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	42

4.8.2	Expresiones Piloto .....	43
4.8.3	Escalamiento de la expresión de proteínas .....	44
4.9	Purificación de Proteínas.....	44
4.9.1	Lisis celular y obtención de clarificados.....	45
4.9.2	Purificación: Cromatografía por Afinidad .....	45
4.9.3	Cuantificación de Proteína Total .....	47
4.9.4	Diálisis para la remoción del exceso de Glutati6n .....	48
4.9.5	Remoci6n de la prote6na de fusi6n.....	48
4.9.6	Purificaci6n: Cromatograf6a por Intercambio Ani6nico.....	49
4.10	Determinaci6n de la Estructura Cuaternaria.....	50
<b>CAP6TULO 5</b>	.....	<b>52</b>
5.	RESULTADOS .....	52
5.1	Crecimiento de <i>B. subtilis</i> .....	52
5.2	Extracci6n de DNA gen6mico .....	52
5.3	Amplificaci6n de Insertos .....	54
5.4	An6lisis de Restricci6n .....	57
5.5	Expresi6n de Prote6nas.....	60
5.5.1	Expresi6n piloto de: RsbP-PAS y RsbP .....	60
5.6	Purificaci6n de Prote6nas.....	64
5.6.1	Purificaci6n por Cromatograf6a por Afinidad.....	64
5.6.1.1	Cromatograf6a por Afinidad: RsbP-PAS .....	64
5.6.1.2	Cromatograf6a por Afinidad: RsbP .....	65
5.6.1.1	Cromatograf6a por Afinidad: PAS-HPK .....	66
5.6.1.2	Cromatograf6a por Afinidad: PAS-PASalt-PPM.....	67
5.6.2	Cuantificaci6n de Prote6na Total .....	68
5.6.3	Remoci6n de la Prote6na de Fusi6n .....	70
5.6.4	Purificaci6n por Cromatograf6a por Intercambio Ani6nico .....	72
5.6.4.1	Cromatograf6a por Intercambio Ani6nico: RsbP-PAS.....	72
5.6.4.2	Cromatograf6a por Intercambio Ani6nico: RsbP .....	73
5.7	Determinaci6n de la Estructura Cuaternaria.....	74
<b>CAP6TULO 6</b>	.....	<b>81</b>
6.	DISCUSI6N DE RESULTADOS.....	81
<b>CAP6TULO 7</b>	.....	<b>87</b>
7.	CONCLUSIONES.....	87
<b>CAP6TULO 8</b>	.....	<b>89</b>
8.	PERSPECTIVAS.....	90
<b>CAP6TULO 9</b>	.....	<b>91</b>
9.	SEGURIDAD EN EL TRABAJO Y DISPOSICI6N DE RESIDUOS .....	91

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características principales y secuencias de aminoácidos de las proteínas a expresar, purificar y caracterizar. ....	18
Tabla 2. Composición de la solución amortiguadora de lisis .....	34
Tabla 3. Iniciadores usados para la amplificación de RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM .....	35
Tabla 4. Componentes y condiciones para la amplificación de RsbP-PAS .....	36
Tabla 5. Componentes y condiciones para la amplificación de RsbP .....	36
Tabla 6. Componentes y condiciones para la amplificación de PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM.....	37
Tabla 7. Componentes y condiciones para la digestión del plásmido pGEX-4T2.....	38
Tabla 8. Componentes y condiciones para la digestión del inserto.....	39
Tabla 9. Componentes para el análisis de restricción.....	41
Tabla 10. Composición de la solución amortiguadora de unión (PBS 1x).....	46
Tabla 11. Composición de la solución amortiguadora de elución .....	46
Tabla 12. Composición del reactivo Bradford.....	47
Tabla 13. Marcadores de Peso Molecular para Cromatografía de Exclusión por tamaño .....	50
Tabla 14. Cantidad en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína obtenida mediante cuantificación por el método Bradford .....	69
Tabla 15. Valores de Absorbancia y mL de elución de estándares para determinación de estructura cuaternaria .....	77
Tabla 16. Disposición de residuos generados .....	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación estructural del dominio PAS. Amezcua C, Harper SM, Rutter J, Gardner KH (2002).....	12
Figura 2. Representación de proteínas homólogas a RsbP. Nadezhdin EV., Brody MS, Price CW (2011).....	15
Figura 3. Representación gráfica de las proteínas a expresar, purificar y caracterizar en este proyecto.....	17
Figura 4. Representación gráfica y topografía de NifL de <i>A. vinelandii</i> . Möglich A, Ayers R, Moffat K (2009).....	20
Figura 5. Representación de la secuencia del bucle enrollado mediante alineación de proteínas. La secuencia se muestra entre las flechas azules. Möglich A, Ayers R, Moffat K (2009).....	25
Figura 6. Cromatograma de Exclusión por tamaño de RsbP-His-tagged. Nadezhdin E V., Brody MS, Price CW (2011).....	26
Figura 7. Determinación de la Estructura Cuaternaria de PAS1 del PhyA. a) SDS-PAGE de las fracciones de elución de PAS1. b) Cromatograma de Exclusión por tamaño de PAS 1. Kim J, Bhoo SH, Han YJ, Zarate X, Furuya M, Song PS (2006) .....	27
Figura 8. Extracción de DNA Genómico de <i>B. subtilis</i> en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido del DNA genómico extraído a partir de 6 mL de sedimento celular en el carril 2, y el carril 3 muestra el DNA genómico extraído a partir de 8 mL de sedimento celular.....	53
Figura 9. Amplificación de RsbP-PAS y RsbP en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se encuentra la amplificación de RsbP-PAS, en el carril 3 la amplificación de RsbP, y en los carriles 4 y 5 se encuentran los controles negativos, sin enzima y sin DNA molde respectivamente. ....	54
Figura 10. Amplificación de RsbP en gel de agarosa al 0.7% modificando la cantidad de Mg <sup>++</sup> y el número de ciclos en la PCR utilizando como DNA molde el amplificado de RsbP. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, seguido de la amplificación de RsbP con 6 y 8 µL de Mg <sup>++</sup> respectivamente (carriles 2 y 3), y en el carril 4 la amplificación de RsbP con 6 µL de Mg <sup>++</sup> y utilizando como DNA molde la primera amplificación del gen.....	55

Figura 11. Amplificación de PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 la amplificación de PAS-HPK, y en el carril 2 la amplificación de PAS-PASalt-PPM. ....	56
Figura 12. Análisis de Restricción para RsbP-PAS y RsbP en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, los carriles 2 – 4 corresponden al análisis del DNA plasmídico con el inserto de RsbP-PAS, y los carriles 6 – 10 muestran el análisis del DNA plasmídico con el inserto de RsbP. ....	57
Figura 13. Análisis de Restricción para PAS-HPK en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, los carriles 2- 6 muestran el análisis del DNA plasmídico con el inserto de PAS-HPK.....	58
Figura 14. Análisis de Restricción para PAS-PASalt-PPM en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en los carriles 2 – 6 muestran el análisis del DNA plasmídico con el inserto de PAS-PASalt-PPM.....	59
Figura 15. PCR para la comprobación de los insertos de PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra la amplificación de PAS-HPK, seguido del marcador del peso molecular en el carril 2, y la amplificación de PAS-PASalt-PPM en el carril 3. ....	59
Figura 16. Expresiones piloto para RsbP-PAS y RsbP mediante SDS-PAGE al 12%. En el carril 2 se observa el control negativo <i>E. coli</i> BL21(DE3), los carriles 2-5 contienen clonas con RsbP-PAS, y los carriles 6 -10 contienen clonas con RsbP.....	61
Figura 17. Expresiones piloto para PAS-HPK mediante SDS-PAGE al 10%. El carril 2 muestra las proteínas expresadas por <i>E. coli</i> BL21(DE3) que es el control negativo. Los carriles 3 – 8 muestran las aparición de nuevas bandas que corresponden a PAS-HPK.....	62
Figura 18. Expresión Piloto para PAS-PASalt-PPM por SDS-PAGE al 10%. Los carriles 2, 4, 6 y 8 contienen la fracción soluble de diferentes clonas y los carriles 3, 5, 7 y 9 muestran la fracción insoluble de las mismas clonas seleccionadas. En el carril 10 se observa el control negativo <i>E. coli</i> BL21(DE3). ....	63
Figura 19. Análisis de fracciones de RsbP-PAS por SDS-PAGE al 12%. El carril 2 muestra la fracción de lavado, en el carril 3 se observa la fracción no unida, y los carriles 4-9 las fracciones de elución de la proteína.....	64
Figura 20. Análisis de fracciones de RsbP por SDS-PAGE al 12%. El carril 2 muestra la fracción no unida, en el carril 3 se observa la fracción de lavado, y los carriles 4-9 las fracciones de elución de la proteína.....	66
Figura 21. Análisis de las fracciones de elución de PAS-HPK por SDS-PAGE al 10%. El carril 2 muestra el lisado de proteínas de <i>E. coli</i> , el carril 3 muestra la fracción no unida, en el carril tres se observa la fracción de lavado, y los carriles 5-7 las fracciones de elución de la proteína. ....	67
Figura 22. Análisis de las fracciones de elución de PAS-PASalt-PPM por SDS-PAGE al 12%. El carril 2 muestra el lisado de proteínas de <i>E. coli</i> , el carril 3 muestra la fracción no unida, en el carril 4 se observa la fracción de lavado, y los carriles 5-8 las fracciones de elución de la proteína.....	68
Figura 23. Curva de calibración para la cuantificación de proteína total utilizando el método Bradford.....	69

Figura 24. Separación de GST y RsbP-PAS por SDS-PAGE al 15% utilizando la proteasa trombina. En el carril 2 se muestra la proteína sin digerir (GST-RsbP-PAS), los carriles 3-7 muestran la separación de la proteína de fusión y la proteína de interés a diferentes horas de la reacción.....	70
Figura 25. Separación de GST y RsbP por SDS-PAGE al 12% utilizando la proteasa trombina. En el carril 2 se muestra la proteína sin digerir (GST-RsbP), los carriles 3-7 muestran la separación de la proteína de fusión y la proteína de interés a diferentes horas de la reacción.....	71
Figura 26. Análisis de fracciones de RsbP-PAS por SDS-PAGE al 15%. Los carriles 5-12 corresponden a las fracciones de elución de la proteína RsbP-PAS.....	72
Figura 27. Análisis de las fracciones de RsbP por SDS-PAGE al 12%. Los carriles 7-10 corresponden a las fracciones de elución de la proteína RsbP.....	73
Figura 28. Cromatograma de elución del Azul Dextrano para la determinación del volumen muerto ( $V_0$ ) mediante cromatografía de exclusión por tamaño.....	74
Figura 29. Cromatograma de elución de los estándares $\beta$ -amilasa (pico 1) y Citocromo C (pico 2) mediante cromatografía de exclusión por tamaño.....	75
Figura 30. Cromatograma de elución de los estándares Alcohol deshidrogenasa (pico 1) y Anhidrasa carbónica (pico 2) mediante cromatografía de exclusión por tamaño.....	76
Figura 31. Cromatograma de elución del estándar de Albúmina de Suero Bovino mediante cromatografía de exclusión por tamaño.....	76
Figura 32. Curva de calibración de estándares de peso molecular conocido. B-amilasa 200 kDa, Alchokol deshidrogenasa 150 kDa, Albúmina de suero bovino 66 kDa, Anhidrasa carbónica 29 kDa y Citocromo C 12.4 kDa.....	78
Figura 33. Cromatograma de exclusión por tamaño de RsbP-PAS. Los símbolos de color negro indican el volumen de elución de los estándares de referencia, el símbolo rojo indica el volumen de elución del máximo pico de absorción de la proteína. .	79
Figura 34. Cromatograma de exclusión por tamaño de RsbP. Los símbolos de color negro indican el volumen de elución de los estándares de referencia, el símbolo rojo indica el volumen de elución del máximo pico de absorción de la proteína. .	80

## NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
μL	Microlitros
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATCC	American Type Culture Collection
BL21(DE3)	Cepa <i>E. coli</i>
BSA	Albúmina de Suero Bovina
DH5α	Cepa <i>E. coli</i>
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
GST	Glutación-S-Transferasa
HPK	Histidina Proteina Quinasa
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranósido
kDa	Kilodaltones
mAu	Miliunidades de absorbancia
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanometros
PAS	Per-ARNT-Sim
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Per	Period Circadian Protein
pmoles	Picomoles
PPM	Proteína Fosfatasa M

rpm	Revoluciones por minuto
RsbP	Regulador de $\sigma^B$ conectado con fosfatasa
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Sim	Single-Minded Protein
TAE	Tris-ácido acético-EDTA

## RESUMEN

Jessica Judith Gómez Lugo

Fecha de Graduación: Junio, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio:** Expresión, purificación y caracterización de proteínas quiméricas de RsbP con el dominio sensorial Per-ARNT-Sim y dominios de respuesta histidina quinasa y fosfatasa.

Número de páginas: 97

Candidato para el grado de Maestría  
en Ciencias con Orientación en  
Microbiología Aplicada

**Área de Estudio:** Ingeniería Genética

**Propósito y Método del Estudio:** Los organismos monitorean una serie de señales internas y externas para ajustar su comportamiento frente a diferentes entornos. Las proteínas encargadas de la transducción de señales son llamadas proteínas sensoriales, y éstas contienen dominios sensoriales que son sensibles a las señales tales como la absorción de la luz o la unión de una sustancia química o ligando; y dominios de respuesta que poseen actividad biológica.

Algunas proteínas sensoriales contienen dominios Per-ARNT-Sim (PAS), estos dominios son relativamente pequeños, de aproximadamente 110 aminoácidos y han sido reportados en todos los reinos de la vida. En proteínas, un dominio se caracteriza por una secuencia de aminoácidos específica, sin embargo, los dominios PAS difieren de esta definición, pero sí se caracterizan por poseer una estructura definida que consta de cinco plegamientos beta antiparalelos flanqueados por varias alfa hélices cuya estructura les permite detectar cambios físicos y químicos. Estos dominios pueden activar diferentes dominios de respuesta, que en bacterias incluyen a fosfatasa e histidina quinasa.

Se planteó la siguiente hipótesis: El dominio Per-ARNT-Sim (PAS) de RsbP es capaz de interactuar con distintos dominios de respuesta, ya sea fosfatasa o histidina quinasa formando estructuras cuaternarias definidas. El objetivo general es: Establecer la relación estructura-función de dominios PAS bacterianos determinando interacciones específicas con distintos dominios de respuesta. La metodología incluye las técnicas de clonación tradicionales, expresión y purificación de proteínas por medio de cromatografía por afinidad y por intercambio aniónico y finalmente el estudio del estado oligomérico por medio de cromatografía de exclusión.

**Contribuciones y Conclusiones:** en el presente estudio se expresó, purificó y caracterizó el dominio sensorial PAS de RsbP (RsbP-PAS) y la proteína completa RsbP de *B. subtilis*. Estas proteínas se expresaron y purificaron utilizando la proteína glutatión S-transferasa (GST) como proteína de fusión. Mediante cromatografía de exclusión por tamaño se determinó la estructura cuaternaria del dominio sensorial PAS de RsbP siendo un monómero y la proteína completa RsbP como tetrámero.

Además en este estudio se llevó a cabo la construcción de dos proteínas quiméricas de RsbP. La primera esta compuesta de la siguiente manera, (RsbP-PAS) como dominio sensorial, bucle enrollado, el cual conecta al dominio sensorial con el dominio de respuesta, e histidina quinasa (PAS-HPK) como dominio de respuesta; y la segunda, (RsbP-PAS) como dominio sensorial, el primer dominio PAS del fitocromo A que conecta ambos dominios y fosfatasa como dominio de respuesta (PAS-PASalt-PPM). Estas proteínas se expresaron utilizando la proteína glutatión S-transferasa como proteína de fusión la cual permite la purificación por afinidad. En el caso de PAS-HPK se obtuvo suficiente proteína soluble, sin embargo, PAS-PASalt-HPK mostró la presencia de cuerpos de inclusión los cuales disminuyen el rendimiento de proteína soluble y dificultan su purificación.

Es importante señalar que en estudios posteriores se mejorará la obtención de proteína soluble de las proteínas quiméricas, para mejorar sus rendimientos de purificación y su caracterización y de esta manera conocer el estado oligomérico que éstas presentan; para corroborar la teoría que el dominio PAS puede activar diferentes dominios de respuesta ya sea con la presencia del bucle enrollado y/o la presencia de dominios PAS alternos; y posteriormente determinar los mecanismos de transducción de señales que estos dominios presentan.

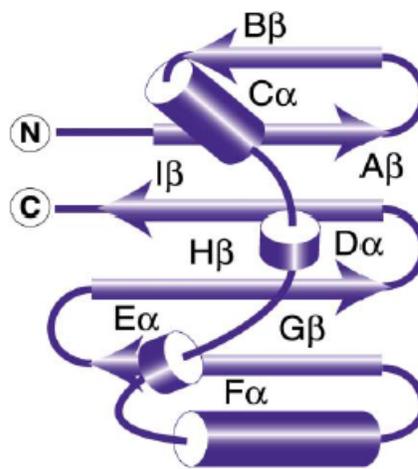
# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

Los organismos perciben una serie de señales internas y externas para adaptar su comportamiento frente a diferentes entornos. Los organismos procariotas, poseen sofisticadas redes de transducción de señales que contienen receptores especializados que interactúan directamente con las señales ambientales(1). Las proteínas encargadas de la transducción de señales son llamadas proteínas sensoriales, y éstas contienen dominios sensoriales (input) que son sensibles a las señales tales como la absorción de la luz o la unión de una sustancia química o ligando; y dominios de respuesta (output) que poseen actividad biológica, tal como actividad enzimática o de unión al DNA(2), (3).

Algunas proteínas sensoriales contienen dominios Per-ARNT-Sim (PAS); PAS es un acrónimo formado por nombres de proteínas cuyas secuencias fueron encontradas por primera vez en *Drosophila* y proviene de “Period Circadian Protein” (Per), “Aryl

Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator” (ARNT) y “Single-Minded Protein” (Sim)(4). Comparándolos con otros dominios, éstos no conservan una secuencia de aminoácidos representativa, pero sí se caracterizan por poseer un pliegue estructural distintivo que consiste en cinco plegamientos beta antiparalelos flanqueados por varias alfa hélices cuya estructura les permite detectar cambios físicos y químicos (Figura 1)(5).



**Figura 1. Representación estructural del dominio PAS. Amezcua C, Harper SM, Rutter J, Gardner KH (2002).**

Los dominios PAS son estructuralmente homólogos y se caracterizan por conservar un plegamiento que consta de aproximadamente 110 aminoácidos (2), (6). Estudios demuestran que son dominios de señalización que se encuentran en todos los reinos de la vida, además representan un dominio sensorial y de interacción ampliamente distribuido que se puede adaptar a una gran variedad de señales (7), (8).

Así mismo, regulan procesos tan diversos como fototropismo en plantas superiores, tensión de los canales iónicos en los seres humanos y la fijación de nitrógeno en Rhizobacterias (8), (9).

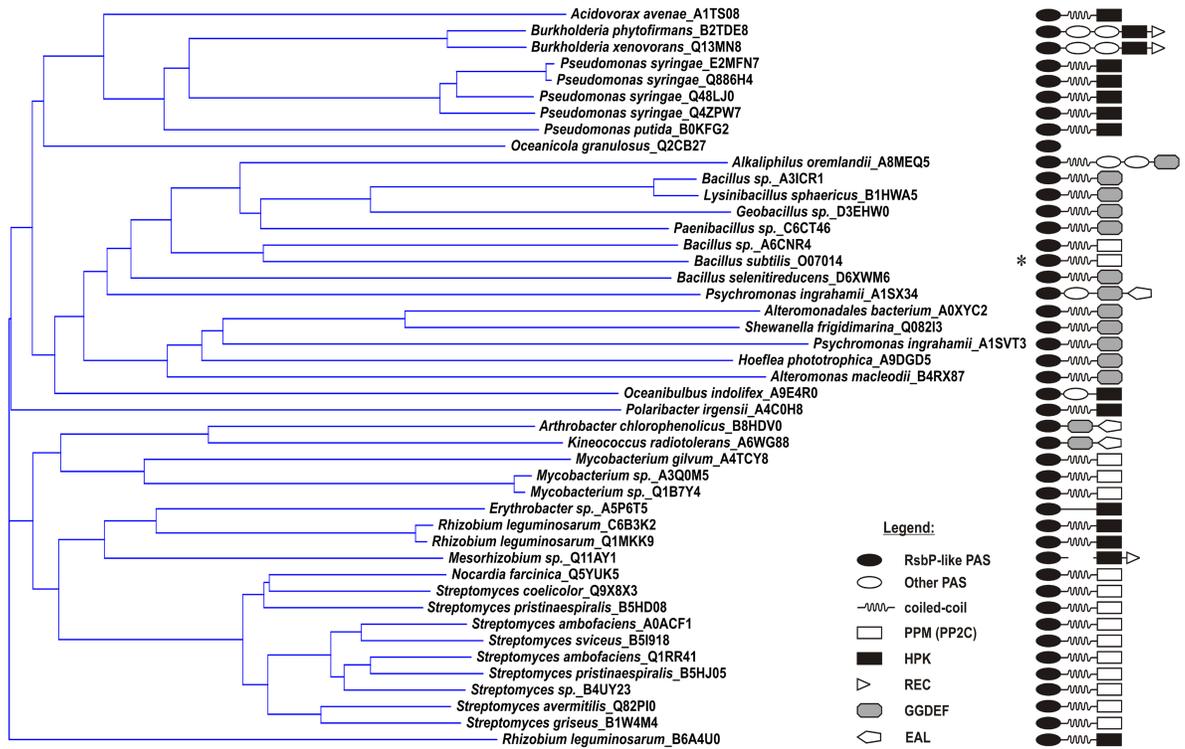
Los dominios PAS se pueden unir a una gran variedad de cofactores, incluyendo Flavín Adenín Dinucleótido (FAD), Flavín Mononucleótido (FMN), grupo heme y el ácido 4-hidroxicinámico (10). Estos cofactores se pueden unir de forma covalente o no covalente, en algunos sensores PAS éstos constituyen la señal a la que responde la proteína, por ejemplo el citrato del sensor CitA (10). En otros casos el cofactor actúa directamente como mediador en la detección de la señal, por ejemplo, cuando los cofactores de flavina absorben la luz azul (subdominio LOV) o cuando un cofactor heme se une al oxígeno. Algunos dominios PAS también se unen a una serie de ligandos químicamente distintos y con alta afinidad. La detección en los cambios ambientales por estas fracciones inducen un cambio en la estructura cuaternaria del dominio PAS (11). Cabe mencionar que varios dominios PAS a menudo se pueden encontrar en tándem dentro de una misma proteína. Es probable que muchos dominios PAS ejerzan su papel fisiológico en la ausencia de cualquier cofactor. Así mismo, varios dominios PAS tales como los de *Vibrio harveyi* no se unen directamente al cofactor, sino que lo asocian con los dominios de otro sensor que puede hacerlo (12).

En bacterias, los dominios de respuesta más representativos incluyen a histidina quinasa (HPK), fosfatasas (PPM), guanilatociclasas (GGDEF) y fosfodiesterasas (EAL) (2).

Estos dominios están unidos covalentemente al dominio PAS con un bucle enrollado entre ellos o con uno o más dominios PAS distintos (5). Estos dominios de respuesta son comunes durante el proceso de transducción de señales en Bacteria y controlan su comportamiento para su adaptación y supervivencia; además pueden actuar como sensores de luz, potencial redox, en la concentración de oxígeno en el sensor histidina quinasa y en la modulación en la interacción proteína-proteína (4).

RsbP (regulador de  $\sigma^B$  conectado con fosfatasa) de *Bacillus subtilis* es una proteína que contiene un dominio PAS en la región N-terminal (RsbP-PAS), una región central con capacidad de formar un bucle enrollado y una fosfatasa (PPM) en la región C-terminal (5).

En la Figura 2 se observan todas las proteínas homólogas a RsbP-PAS. A la izquierda se muestran los géneros y especies de los microorganismos que expresan estas proteínas. A la derecha se muestran los dominios de respuesta que pueden ser activados por el dominio PAS.



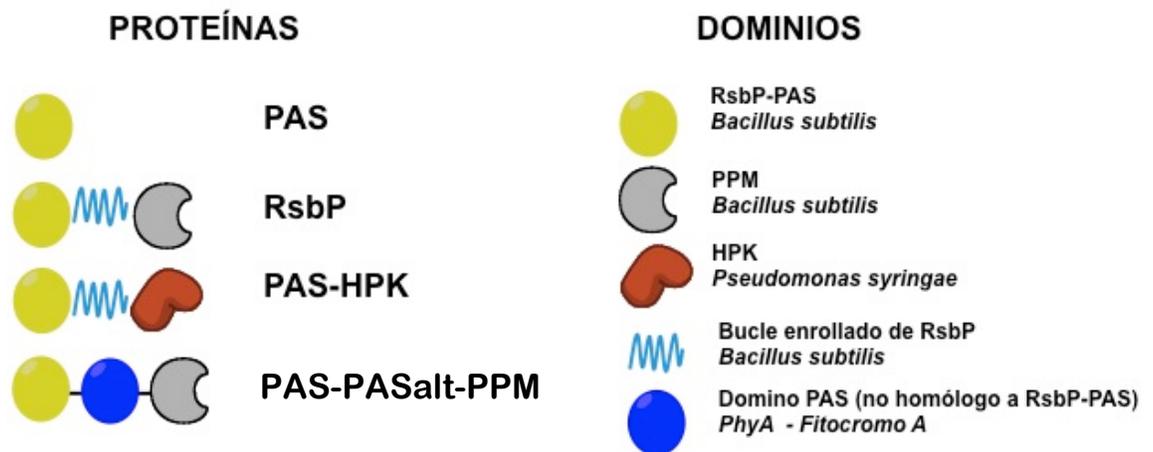
**Figura 2. Representación de proteínas homólogas a RsbP. Nadezhdin EV., Brody MS, Price CW (2011).**

Para determinar el proceso por el cual los dominios PAS perciben y comunican las señales, es necesario identificar mecanismos comunes en las proteínas que poseen dominios PAS unidos a dominios de respuesta. Recientemente se han descubierto proteínas utilizando bases de datos como PSI-BLAST y la base de datos de Dominios Conservados, que contienen dominios homólogos a RsbP-PAS en el extremo N-terminal y están asociados con dominios de respuesta fosfatasa PPM en bacterias Gram positivas y con dominios histidina quinasa en bacterias Gram negativas (13), (14); los genes de estas proteínas se encuentran en operones homólogos a *rsbQP* de *Bacillus subtilis* (5).

Dentro de las posibles aplicaciones de este proyecto se encuentra el diseño de enzimas recombinantes que se activen con la presencia de un ligando específico; también es posible crear sensores ambientales utilizando dominios PAS sensibles a la luz o potencial redox en bacterias genéticamente modificadas (15).

En este proyecto se propone la expresión, purificación y caracterización de varias de estas proteínas bacterianas, creando proteínas quiméricas con diferentes combinaciones de un sólo dominio PAS (RsbP-PAS) y un dominio de respuesta, como fosfatasa e histidina quinasa (Figura 3). Determinando las variaciones en las estructuras cuaternarias de las diferentes combinaciones, se podría deducir por lo menos uno de los mecanismos de interacción, es decir, los cambios en la formación de estructuras

oligoméricas debido a las posibles interacciones de dominios distintos (11). También se cambiará el tipo de unión entre los dos dominios: bucle enrollado por un dominio PAS completo y distinto a RsbP-PAS, verificando así la contribución del bucle o del dominio PAS a la estructura cuaternaria.



**Figura 3. Representación gráfica de las proteínas a expresar, purificar y caracterizar en este proyecto.**

Estos experimentos permitirán descubrir mecanismos de interacción entre dominios PAS y los diferentes dominios de respuesta que existen en Bacteria, contribuyendo así a descifrar los procesos de transducción de señales en estos organismos (11). En la tabla 1 se muestran las características principales y secuencias de aminoácidos de las proteínas a expresar, purificar y caracterizar en este proyecto. En azul se muestra la secuencia de RsbP-PAS.

**Tabla 1. Características principales y secuencias de aminoácidos de las proteínas a expresar, purificar y caracterizar.**

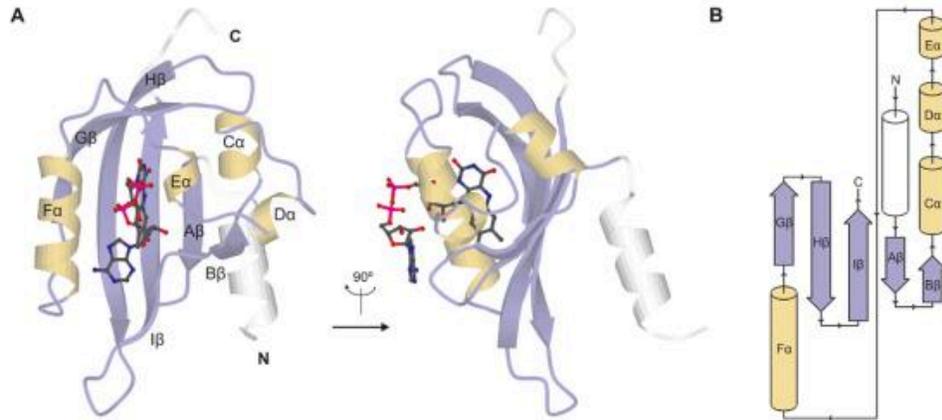
Proteína	Peso molecular en pares de bases	Peso molecular en Da.	Punto Isoeléctrico
<b>RsbP-PAS</b>	330	12,441.56	4.87
MDKQLNDAPCGFLALSEEGSIIAANRTLIKILDYEPEQVIGQHNMMLTIPAQLFCQLYFFPLLKLE HHIEEYISLKARDGEEIPVLINAIARHDSGASVFDCVLIPMR			
<b>RsbP</b>	1,212	46,030.42	5.0
MDKQLNDAPCGFLALSEEGSIIAANRTLIKILDYEPEQVIGQHNMMLTIPAQLFCQLYFFPLLKLE HHIEEYISLKARDGEEIPVLINAIARHDSGASVFDCVLIPMRKRNEYENELLIARNEAQEALLAKQKA NAELEIALETLKAKQEEELLEINKQNQQFKLNTKRELELARKIQKNSLTEPIVNDQVQIDSYYNASSLS GDLYGYYQIDEHRYGIIILDVMGHGISSALITMSLHPLFQRQITQGLSPVKVMKELDRHLHSLFQND EEARHYCTAIYLEIDIARQRIDYVNAGHPPALWQDDSGTQHLLHATSPPIGMFEDLEFQSSSLYTE DGRLLLYTDGVMPTASCYLFDLLKDHPDPIADLKEKILTSLQHQKEAHHKSDDECFILVDVK			
<b>PAS-HPK</b>	1,152	42,735.15	5.38
MDKQLNDAPCGFLALSEEGSIIAANRTLIKILDYEPEQVIGQHNMMLTIPAQLFCQLYFFPLLKLE HHIEEYISLKARDGEEIPVLINAIARHDSGASVFDCVLIPMLAEERNKYERELLAARKLAEELLQHQM TVQSELTARNRLRLAHAAEIRAIFAEQMIGIVSHDLRNPLAAIKMAAGLLERTKLESRQERILGHIH HSTDRAERMIVDLLDFTHARVGSGITVVPQLIDLHAVVARGVEELRQVPHRVLVHRSEGGACSA DPDRLLQVLGNLVSNAVNYGEDGSDILITSSFETYLIKLSVHNFGEPIPLEKVDDLYEPMHVVSDDSD ETRTVGLGLFIVREIIRAHLGEITVSSSTDAGTTFTVAFPRPVV			
<b>PAS-PASalt-PPM</b>	1,311	48,860.93	4.92
MDKQLNDAPCGFLALSEEGSIIAANRTLIKILDYEPEQVIGQHNMMLTIPAQLFCQLYFFPLLKLE HHIEEYISLKARDGEEIPVLINAIARHDSGASVFDCVLIPMGLAELQAVTSEMVRMETATVPILAVD GNGLVNGWNQKAAELTGLRVDDAIGRHILTLVEDSSVPVQRMPLYLALQGKEEKEVRFVVKTHGP KRDDGPVILVFNACASRDLDHVVGVCFVAQDMTELSGDLYGYYQIDEHRYGIIILDVMGHGISSA LITMSLHPLFQRQITQGLSPVKVMKELDRHLHSLFQNDDEEARHYCTAIYLEIDIARQRIDYVNAGHPP ALWQDDSGTQHLLHATSPPIGMFEDLEFQSSSLYTEGRLLLYTDGVMPTASCYLFDLLKDHPD SPIADLKEKILTSLQHQKEAHHKSDDECFILVDVK			

## CAPÍTULO 2

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1 Transducción de señales

NifL de *Azotobacter vinelandii* es una proteína sensible al potencial redox que contiene dos dominios PAS (16). La región N-terminal de estos (PAS1) se une a un cofactor FAD y se requiere para la detección redox mientras que el segundo dominio PAS de NifL (PAS2) no tiene ningún cofactor aparente y su función es desconocida (Figura 4A) (17), (18). En la Figura 4B se presenta la topografía de NifL, donde se puede observar la estructura que define a los dominios PAS.



**Figura 4. Representación gráfica y topografía de NifL de *A. vinelandii*. Möglich A, Ayers R, Moffat K (2009).**

NifL regula la transcripción de los genes *nif* en *A. vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* mediante interacciones con el activador transcripcional NifA (19). Cuando las circunstancias ambientales no favorecen la fijación del nitrógeno, NifL inhibe la actividad de NifA formando un complejo proteína-proteína, la estabilidad de este complejo y la actividad de NifA son controlados por NifL en respuesta al potencial redox de la célula y su habilidad para fijar el nitrógeno (20).

RsbP-PAS juega un papel importante en el control de la actividad de la fosfatasa que es necesaria para accionar el factor  $\sigma^B$ , el cual es un componente de la RNA polimerasa que se une a la subunidad del núcleo de la enzima que le brinda especificidad al promotor, este factor confiere resistencia al estrés en las células durante la fase estacionaria (21). La actividad de  $\sigma^B$  está gobernada por una vía de transducción de señales con dos ramas distintas. Una rama es específica para

lastensiones de energía, tales como carbono, fósforo, o la limitación de oxígeno, y la otra es específica para las tensiones ambientales, como el ácido, etanol, calor o estrés salino (22). La exposición de la bacteria con diversas limitaciones en su crecimiento induce la síntesis de diversas proteínas y a la activación de este tipo de factores que protegen a la célula de diferentes tipos de estrés. La respuesta a este estrés conlleva a un estado que le permite a *B. subtilis* sobrevivir en el ambiente e incluso le permite sobrevivir a algunos procesos alimenticios (23).

Estudios demuestran que RsbP a la vez interactúa con RsbQ, una proteína con actividad  $\alpha/\beta$  hidrolasa y ambas forman un módulo sensorial que controla a *B. subtilis* en condiciones de baja energía (22).

*Shewanella frigidimarina* es una bacteria capaz de transferir electrones a óxidos de metal sólidos, además de poseer una importante versatilidad anaeróbica. Estas características le brindan un considerable potencial para la remediación de ambientes que están contaminados con radioisótopos. La habilidad de *Shewanella* para crecer en ambientes pocos favorables parece estar relacionada con la transducción de señales, siendo esta un elemento clave para que estas especies se mantengan con vida (24).

Utilizando PSI-BLAST y la base de datos de Dominios Conservados, se ha descubierto que *Shewanella frigidimarina* contiene un dominio homólogo a RsbP-PAS en el extremo N-terminal y está asociado con un dominio de respuesta GGDEF. Utilizando este mismo sistema se ha encontrado que *Pseudomonas syringae* contiene un dominio homólogo a RsbP-PAS en el extremo N-terminal y está asociado con un dominio de respuesta HPK (5) (13) (14).

PAS-HPK controla decisiones celulares importantes en los microorganismos; por ejemplo, bloquea la producción de glucógeno mediante la fosforilación y la inhibición de la glucógeno sintasa. Además, estudios genéticos y bioquímicos involucran a PAS-HPK en el control de la síntesis de proteínas. Estas dos características de almacenar o utilizar el azúcar y la tasa de síntesis de proteínas se encuentran fuertemente implicadas en la energía celular (25).

Se han identificado dominios PAS unidos a histidina quinasa en mamíferos y se han relacionado con la proteína FixL en Rizobacterias y con serina-treonina quinasas de *Saccharomyces cerevisiae*, cuya principal función es la regulación de la síntesis de proteínas, sin embargo en mamíferos la función de los dominios PAS es aún desconocida (26).

## **2.2 Similitud con otros dominios**

El dominio LOV (luz-oxígeno-voltaje) es un término que se utiliza para referirse a un tándem de dominios PAS en fototropismo en plantas. El dominio LOV está clasificado como un dominio PAS por su secuencia y estructura, sin embargo este término solo se utiliza para referirse a fotosensores que unen nucleótidos de flavina (27), (28).

Estructuralmente, el dominio GAF presenta una gran homología, ya que su estructura consta de seis plegamientos beta flanqueados por varias alfa hélices, a su vez esta formado por 110 aminoácidos (29). En algunos casos, los dominios GAF pueden presentar los 5 plegamientos beta en su estructura. Sin embargo, aún no se ha establecido si los dominios GAF emplean los mismos mecanismos de señalización que los dominios PAS (30).

## **2.3 Proteínas quiméricas**

En los dominios PAS, la activación del dominio de respuesta puede depender de la presencia del bucle enrollado, como es el caso de HPK, su actividad y regulación por la luz dependen de la naturaleza del bucle enrollado; es por eso que se han construido quimeras con dominios PAS, por ejemplo sustituyendo el dominio sensorial FixL de

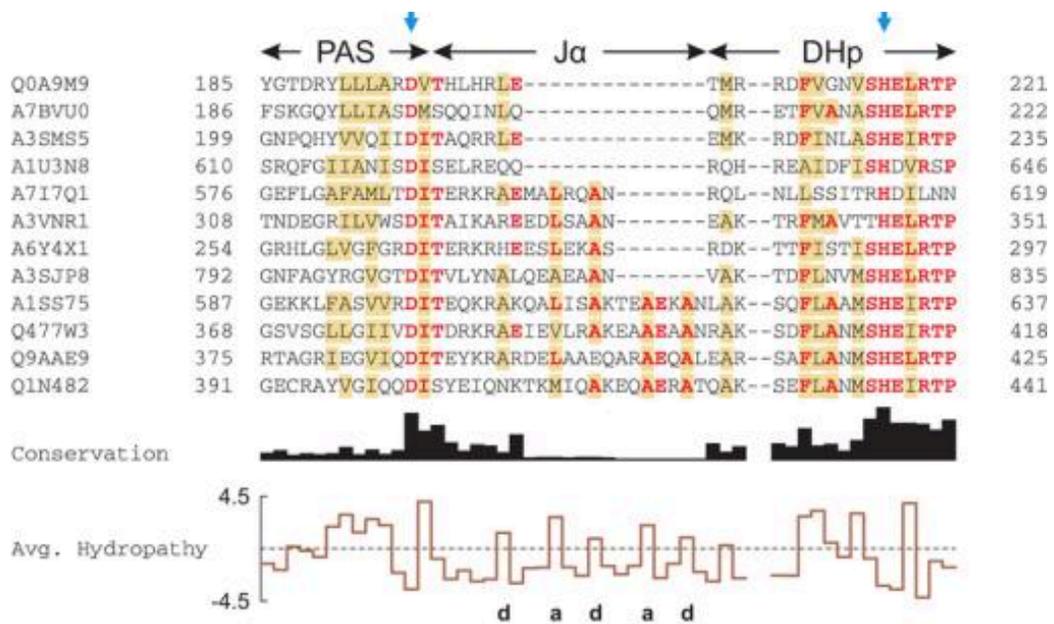
*Bradyrhizobium japonicum* por el dominio LOV de *Bacillus subtilis* (YtvA) con dominio de respuesta HPK (31).

## 2.4 Estructura del bucle enrollado

El bucle enrollado o J $\alpha$  es la secuencia de aminoácidos que une al dominio sensorial con el dominio de respuesta. Estudios demuestran que el bucle enrollado tiene un gran impacto sobre el dominio de respuesta para que éste pueda ser activado.

Recientemente se alinearon 1811 secuencias de proteínas que contienen HPK como dominio de respuesta unido al dominio PAS utilizando la base de datos SMART. Reportando ciertas características que distinguen al bucle enrollado (Figura 5), las cuales son:

- Las secuencias contienen 7n residuos entre los aminoácidos D (aspartato) y H (histidina) donde n=3, dando un total de 21 aminoácidos.
- Entre los aminoácidos D y H se conservan 5 alfa hélices
- El extremo C-terminal de PAS conserva el dominio DIT (Aspartato, Isoleucina y Treonina).
- El residuo #21 corresponde al aminoácido histidina (31), (32).

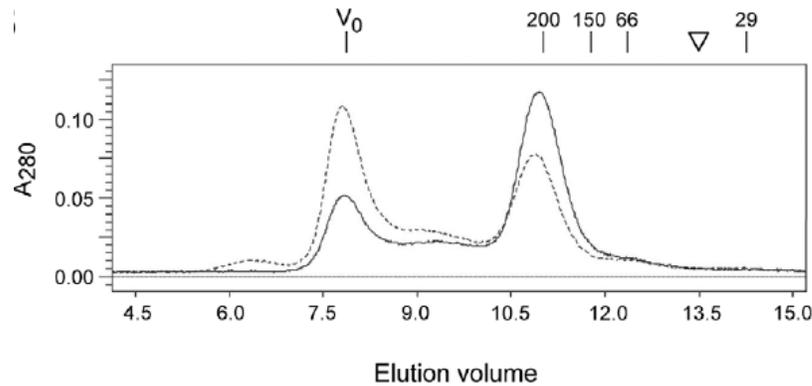


**Figura 5. Representación de la secuencia del bucle enrollado mediante alineación de proteínas. La secuencia se muestra entre las flechas azules. Möglich A, Ayers R, Moffat K (2009)**

## 2.5 Estructura Cuaternaria

La estructura cuaternaria se refiere al arreglo de subunidades que forman una proteína. Esta estructura está altamente relacionada con la función de una proteína. Las proteínas que poseen una estructura cuaternaria definida son llamadas proteínas oligoméricas, estas proteínas se encuentran relacionadas en diferentes procesos biológicos como: procesos metabólicos, procesos de transducción de señales y procesos de replicación cromosómica (33).

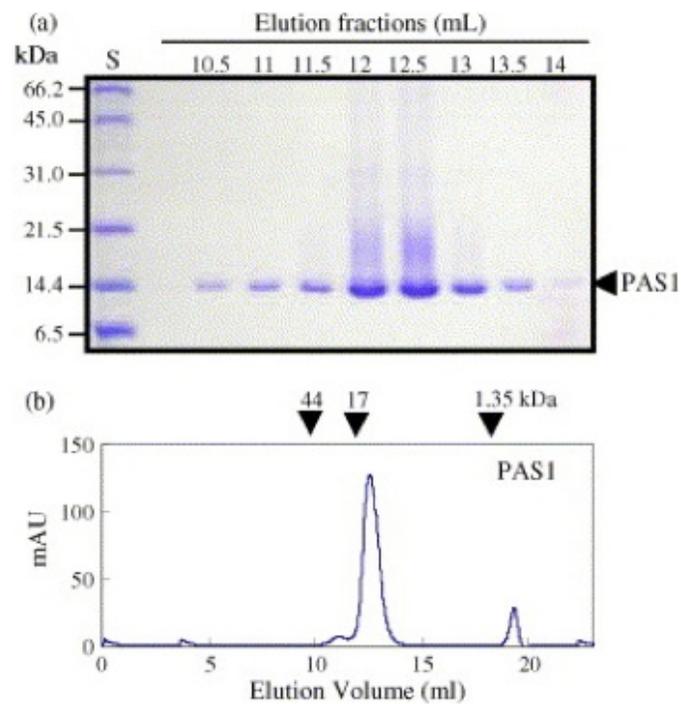
Para *B. subtilis*, la elución del oligómero RsbP His-tagged (48.325 kDa) mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 6) indicó una proteína con un peso de 200 kDa, este resultado sugiere que dicha proteína forma un tetrámero (5).



**Figura 6. Cromatograma de Exclusión por tamaño de RsbP-His-tagged. Nadezhdin E V., Brody MS, Price CW (2011)**

Los fitocromos son fotoreceptores que regulan el crecimiento y desarrollo de plantas en respuesta a la luz, su estado oligomérico puede ser como dímeros y se piensa que la dimerización es importante para la función del fitocromo (34), (35). El fitocromo A (PhyA) en el extremo C-terminal contiene un dominio PAS que consiste en un tándem de dominios PAS (PAS1 y PAS2) y un dominio de respuesta relacionado con histidina quinasa. Mediante un sistema de doble híbrido y cromatografía por exclusión se determinó cuál de los dos dominios PAS (PAS1 y PAS2) es el encargado de la dimerización del PhyA, siendo el dominio PAS2 el encargado principalmente de esta respuesta (36).

En la Figura 7 se puede observar la determinación del estado oligomérico de PAS1 de PhyA mediante cromatografía de Exclusión por tamaño. Los estándares marcados con flechas eluyeron de la siguiente manera: 44 kDa a 10.151 mL, 17 kDa a 12.424 mL, y 1.35 kDa a 18.493 mL. El peso de PAS 1 es de aproximadamente 16.3 kDa lo que sugiere que PAS1 existe como monómero (36).



**Figura 7. Determinación de la Estructura Cuaternaria de PAS1 del PhyA. a) SDS-PAGE de las fracciones de elución de PAS1. b) Cromatograma de Exclusión por tamaño de PAS 1. Kim J, Bhoo SH, Han YJ, Zarate X, Furuya M, Song PS (2006)**

## **CAPÍTULO 3**

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

El dominio Per-ARNT-Sim (PAS) de RsbP es capaz de interactuar con distintos dominios de respuesta, ya sea fosfatasa o histidina quinasa formando estructuras cuaternarias definidas.

#### **3.2 Objetivo General**

Establecer la relación estructura-función de dominios PAS bacterianos determinando interacciones específicas con distintos dominios de respuesta.

### **3.3 Objetivos Específicos**

- Diseñar y construir DNA recombinante para expresión de proteínas en *Escherichia coli*.
- Expresar y purificar las proteínas recombinantes: RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM.
- Determinar la estructura cuaternaria de estas proteínas por medio de cromatografía de exclusión.

## CAPÍTULO 4

### 4. METODOLOGÍA

#### 4.1 Materiales, reactivos y equipo

Los materiales empleados en este proyecto incluyen: tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL marca Axygen, puntillas para micropipeta de volumen variable de 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L marca Rainin, tubos falcon de 15 mL y 50 mL marca Corning, tubos de cultivo con tapón de rosca marca KIMAX, matraces de 125 mL y 250 mL marca Pyrex y matraces triptinizados de 500 mL marca KIMAX.

La cepa *Bacillus subtilis* se obtuvo del American Type Culture Collection (No. ATCC 23857). Para la extracción del DNA genómico, DNA plasmídico y la extracción a partir de gel de agarosa y cambio de buffer después de la digestión con enzimas de restricción, se utilizaron Kits de la marca QIAGEN. Los genes correspondientes a las proteínas PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM se mandaron construir en GenScript. Los

iniciadores para los genes que codifican para las proteínas, RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies. Los reactivos para PCR correspondían a las marcas Thermo Scientific y Sigma Aldrich, mientras que las enzimas de restricción fueron de las marcas Thermo Scientific y New England Biolabs. La enzima T4 DNA ligasa fue de la marca Thermo Scientific e Invitrogen. Para el crecimiento de *B. subtilis* se utilizó el Caldo Nutritivo marca MERCK y para el crecimiento de *Escherichia coli* se utilizó el Caldo Luria Bertani (LB) marca USBiological.

Para la purificación de las proteínas se utilizaron las siguientes columnas comerciales: GSTrap™ HP para Cromatografía por Afinidad, HiTrap™ Q HP para Cromatografía por Intercambio Iónico y Superdex 200 Increase 100/300 GL para Cromatografía por Exclusión de la marca GE Healthcare. Para la Cromatografía por Afinidad también se utilizó la resina Glutathione Sepharose 4B.

Los equipos que se mencionarán a continuación para el desarrollo de esta tesis se encuentran en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica y los Laboratorios 2 y 3 de Biotecnología, ubicados en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Para la amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés se utilizó el termociclador Corbett Research, modelo CG1-96. El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo utilizando una incubadora con agitación marca LabTech, modelo LSI-3016. Para la recolección de los sedimentos celulares se utilizó una microcentrífuga marca Thermo Scientific y una ultracentrífuga Sorval Lynx

de Thermo Scientific. Para la visualización de la amplificación de los genes de interés, el análisis de restricción por medio de geles de agarosa y las electroforesis en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante se llevaron a cabo utilizando una cámara de electroforesis marca BioRad. La purificación de las proteínas y el estudio de la estructura cuaternaria se realizó utilizando el equipo Äkta Primeplus, marca General Electric.

## 4.2 Metodología General



### **4.3 Crecimiento de *Bacillus subtilis***

El crecimiento de la cepa *B. subtilis* (ATCC 23857) se llevó a cabo utilizando Caldo Nutritivo como medio de cultivo. La cepa liofilizada fue reactivada en 5 mL del caldo y se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) durante 24 horas. Posteriormente este cultivo fue resembrado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo y se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una D.O<sub>600</sub> de 1.9.

### **4.4 Recolección del sedimento celular de *B. subtilis***

La recolección de las células de *B. subtilis* se realizó en alícuotas de 6 mL y 8 mL del cultivo. Se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 13,300 rpm por 2 minutos hasta completar el volumen deseado.

### **4.5 Extracción de DNA Genómico**

La extracción del DNA genómico de *B. subtilis* se llevó a cabo por medio del kit DNEASY BLOOD & TISSUE de QIAGEN utilizando los sedimentos celulares previamente recolectados. Al ser una bacteria gram positiva, las células fueron previamente tratadas con una solución amortiguadora de lisis. Posteriormente la visualización de las bandas se llevó a cabo en un gel de agarosa el 0.7% utilizando TAE 1x como solución amortiguadora.

**Tabla 2. Composición de la solución amortiguadora de lisis**

Componente	Concentración
TRIS pH 8.0	20 mM
EDTA	2 mM
Triton X-100	1.2 %
Lisozima	20 mg/mL

#### **4.6 Amplificación de Insertos**

Se diseñaron los diferentes iniciadores delanteros y reversos para cada uno de los genes a amplificar. Para RsbP-PAS y RsbP se utilizó como ADN molde el ADN genómico extraído de *B. subtilis*. En cuanto a PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM se utilizaron como molde los genes que fueron sintetizados por GeneScript. Los iniciadores fueron diseñados incluyendo el sitio de corte para EcoRI y BamHI para RsbP-PAS, EcoRI y Sall para RsbP, BamHI y XhoI para PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM. La concentración final para cada uno de los iniciadores fue de 20 pmoles/ $\mu$ L.

**Tabla 3. Iniciadores usados para la amplificación de RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM**

Iniciador	Secuencia
RsbP-PAS delantero	5' - GGA TCC ATG GAC AAA CAA TTG AAT GAT GCA C - 3'
RsbP-PAS reverso	5' - GAA TTC TTA TCG CAT TGG AAT CAG AAC ACA ATC - 3'
RsbP delantero	5' - GAA TTC CCA TGG ACA AAC AAT TGA ATG ATG CAC - 3'
RsbP reverso	5' - GTC GAC TTA TTT TAC ATC AAC AAT TAT AAA ACA TTC - 3'
PAS-HPK delantero	5' - GGA TCC ATG GAC AAA CAA CTG AAT GAC G - 3'
PAS-HPK reverso	5' - CTC GAG TTA AAC CAC CGG ACG CGG G - 3'
PAS-PASalt-PPM delantero	5' - GGA TCC ATG GAC AAA CAA CTG AAT GAT G - 3'
PAS-PASalt-PPM reverso	5' - CTC GAG TTA TTT CAC ATC GAC CAG AAT G - 3'

La reacción para la amplificación se llevó a cabo en tubos para PCR de 200 µL. Para la amplificación de RsbP-PAS y RsbP se utilizó la Taq DNA polimerasa de Thermo Scientific mientras que para PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM se utilizó la Accutaq DNA polimerasa de Sigma Aldrich.

En las siguientes tablas se muestran las cantidades de reactivos utilizados para cada reacción de PCR, junto con las condiciones de la reacción en el termociclador.

**Tabla 4. Componentes y condiciones para la amplificación de RsbP-PAS**

Reactivo	Cantidad	Condiciones
DNA Molde	10 µL	
dNTP's	1.5 µL	Desnaturalización Inicial: 95 °C por 2 minutos
Iniciador delantero	3 µL	Desnaturalización: 95 °C por 1 minuto
Iniciador reverso	3 µL	Alineamiento: 59 °C por 1 minuto
Amortiguador de reacción 10x	10 µL	Elongación: 72 °C por 1.20 minutos
ADN polimerasa	0.5 µL	30 ciclos
H <sub>2</sub> O MQ	22 µL	Elongación Final: 72 °C por 5 minutos

**Tabla 5. Componentes y condiciones para la amplificación de RsbP**

Reactivo	Cantidad	Condiciones
DNA Molde	10 µL	
dNTP's	1.5 µL	Desnaturalización Inicial: 95 °C por 2 minutos
Iniciador delantero	3 µL	Desnaturalización: 95 °C por 1 minuto
Iniciador reverso	3 µL	Alineamiento: 58 °C por 1 minuto
Amortiguador de reacción 10x	10 µL	Elongación: 72 °C por 1.30 minutos
ADN polimerasa	0.5 µL	40 ciclos
H <sub>2</sub> O MQ	22 µL	Elongación Final: 72 °C por 5 minutos

**Tabla 6. Componentes y condiciones para la amplificación de PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM**

Reactivo	Cantidad	Condiciones
DNA Molde	1 $\mu$ L	Desnaturalización inicial: 98 °C por 30 segundos
dNTP's	2.5 $\mu$ L	
Iniciador delantero	3 $\mu$ L	Desnaturalización: 94 °C por 15 segundos
Iniciador reverso	3 $\mu$ L	Alineación: 65 °C por 20 segundos
Amortiguador de reacción 5x	5 $\mu$ L	Elongación: 68 °C por 1.30 minutos
DMSO	1 $\mu$ L	30 ciclos
DNA polimerasa	0.5 $\mu$ L	Elongación final: 68 °C por 10 minutos
H <sub>2</sub> O MQ	34 $\mu$ L	

#### 4.7 Construcción de plásmidos

La construcción de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el método de clonación clásico: digestión, ligación, transformación y selección de transformantes para todas las construcciones de DNA. Se utilizó como vector el plásmido pGEX-4T2, resistente a ampicilina y el cual contiene la secuencia de la Glutation-S-Transferasa (GST) utilizada como proteína de fusión.

Previo a la digestión, el DNA amplificado fue extraído mediante la técnica de extracción en gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

#### 4.7.1 Digestión del plásmido pGEX-4T2 e Insertos

La digestión se llevó a cabo utilizando las enzimas de restricción EcoRI (Thermo Scientific) y BamHI (Thermo Scientific) para RsbP-PAS, EcoRI (Thermo Scientific) y Sall (Thermo Scientific) para RsbP, BamHI (NEB) y XhoI (NEB) para PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM.

**Tabla 7. Componentes y condiciones para la digestión del plásmido pGEX-4T2**

Componente	Cantidad	Condiciones
Plásmido (1000 ng)	4 $\mu$ L	
Solución amortiguadora 10x	2 $\mu$ L	Incubación a 37°C por 1 hora
H <sub>2</sub> O MQ	11 $\mu$ L	
Enzima 1	1 $\mu$ L	
Enzima 2	1 $\mu$ L	Incubación 37°C por 1 hora
SAP	1 $\mu$ L	Incubación 37°C por 30 minutos

**Tabla 8. Componentes y condiciones para la digestión del inserto**

Componente	Cantidad	Condiciones
Inserto	30 $\mu$ L	
Solución amortiguadora 10x	4 $\mu$ L	Incubación 37°C por 2.5 horas
Enzima 1	1 $\mu$ L	
Enzima 2	1 $\mu$ L	
H <sub>2</sub> O MQ	4 $\mu$ L	

Para las enzimas de New England Biolabs (NEB) se utilizó la solución amortiguadora 3 y 2  $\mu$ L de Albúmina de Suero Bovina (BSA) 10x, se modificó la cantidad de H<sub>2</sub>O MQ y las incubaciones se prolongaron a 2 horas entre cada adición de la enzima de restricción y 1 hora para el SAP. En el caso del inserto la incubación se prolongó a 3.5 horas.

Una vez finalizada la digestión, se realizó la purificación usando el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

#### **4.7.2 Ligación del plásmido pGEX-4T2 con los Insertos**

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando 2  $\mu$ L del plásmido pGEX-4T2, 1  $\mu$ L de solución amortiguadora de ligación 10x, 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa (Thermo

Scientific), 0-4  $\mu\text{L}$  de inserto y de 2-6  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MQ hasta completar un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Dichas reacciones fueron incubadas a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 1 hora y posteriormente fueron almacenadas a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Posteriormente la ligasa fue desactivada mediante incubación a 65  $^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Para las ligaciones que se realizaron usando la T4 DNA ligasa de Invitrogen se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de ligación 5x. Utilizando esta ligasa no fue necesario desactivar la enzima.

#### **4.7.3 Transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$**

La transformación se llevó a cabo en células rubidio-competentes de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , en un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 5  $\mu\text{L}$  del producto de ligación más 50  $\mu\text{L}$  de las células, se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se llevó a cabo el choque térmico a 44  $^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, una vez finalizada la reacción se incubó en hielo por 2 min. Después se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de caldo LB y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  con agitación (200 rpm) por 30 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 2 minutos, se retiró el exceso de medio dejando aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  del mismo en el cual las células fueron resuspendidas y sembradas en placas de LB/Ampicilina mediante la técnica de extensión por varilla, finalmente las placas se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 16 horas.

#### 4.7.4 Selección de transformantes y extracción de DNA plasmídico

De las placas con LB/Ampicilina que fueron sembradas previamente se seleccionaron varias colonias y se inocularon en 6 mL de caldo LB/Ampicilina y se cultivaron a 37 °C con agitación (200 rpm) por 16 horas. Posteriormente se recolectaron las células en tubos eppendorf de 1.5 mL mediante centrifugación a 13,300 rpm por 2 minutos. Una vez obtenido el sedimento celular se extrajo el DNA plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN.

#### 4.7.5 Análisis de Restricción

Utilizando el DNA plasmídico previamente extraído se realizó un análisis de restricción para confirmar la presencia del inserto.

**Tabla 9. Componentes para el análisis de restricción**

Componente	Cantidad
DNA plasmídico (1000 ng)	5 µL
Solución amortiguadora 10x	2 µL
Enzima 1	1 µL
Enzima 2	1 µL
H <sub>2</sub> O MQ	11 µL

Para las enzimas de New England Biolabs se utilizó la solución amortiguadora 3 y 2  $\mu\text{L}$  de BSA 10x, se modificó la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}$  MQ. La reacción se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 1 hora. Posteriormente se llevó a cabo el análisis mediante un gel de agarosa 0.7% utilizando TAE 1x como solución amortiguadora.

## **4.8 Expresión de Proteínas**

### **4.8.1 Transformación en *E. coli* BL21(DE3)**

Utilizando el DNA plasmídico positivo en el análisis de restricción se llevó a cabo la transformación en la cepa *E. coli* BL21(DE3) la cual se utiliza para la expresión de proteínas. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de células rubidio-competentes más 1  $\mu\text{L}$  (50 ng) de DNA plasmídico, se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se llevó a cabo el choque térmico a  $44^\circ\text{C}$  por 45 segundos, una vez finalizada la reacción se incubó en hielo por 2 min. Después se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de caldo LB y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a  $37^\circ\text{C}$  con agitación (200 rpm) por 30 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 2 min, se retiró el exceso de medio dejando aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  del mismo en el cual las células fueron resuspendidas y sembradas en placas de LB/Ampicilina mediante la técnica de extensión por varilla, finalmente las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 16 horas.

#### 4.8.2 Expresiones Piloto

Las expresiones piloto son una herramienta que se utiliza con el objetivo de corroborar la expresión de la proteína de interés, mediante su visualización en geles de poliacrilamida. De las placas con células transformadas, se tomaron diversas colonias las cuales fueron sembradas en un tubo con 2 mL de caldo LB/Ampicilina y se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que alcanzaran una D.O.<sub>600</sub> entre 0.4 – 0.6, cuando los inóculos alcanzaron esta D.O. se agregaron 2 µL de Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.1M alcanzando una concentración final de 0.2mM; después se incubaron a 25 °C con agitación (200 rpm) por 16 horas (37).

Para la preparación de las muestras se comenzó con la recolección del sedimento celular. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se centrifugaron las células a 13,300 rpm por 2 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 120 µL de H<sub>2</sub>O MQ después se agregaron 40 µL de solución amortiguadora, se mezcló y se llevó a hervir por 10 minutos. Finalmente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 10 minutos.

Para la visualización de la expresión de las proteínas de interés, se corrió un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (SDS-PAGE) al 12%. Una vez terminada la electroforesis, el gel de acrilamida se tiñó con Azul de Coomassie.

### **4.8.3 Escalamiento de la expresión de proteínas**

De las expresiones piloto se eligieron las colonias que mostraban mejor expresión de las proteínas de interés. La expresión se llevó a cabo en matraces triptinizados de 500 mL hasta completar un volumen de expresión final de 4 litros.

En un matraz triptinizado de 500 mL se agregaron 100 mL de caldo LB con 100  $\mu$ L de Ampicilina, los matraces fueron inoculados con un cultivo previamente crecido de la colonia seleccionada. Los matraces se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que alcanzaron una D.O.<sub>600</sub> de 0.4 – 0.6, una vez alcanzada esta D.O. se comenzó la inducción con 100  $\mu$ L de IPTG 0.1M a 30 °C con agitación (200 rpm) por 16 horas.

Posteriormente se recolectó el sedimento celular en frascos de plástico de 250 mL utilizando una centrífuga refrigerada a 4 °C, 8,000 rpm por 10 min. Finalmente los frascos con el sedimento celular se congelaron a -20 °C.

### **4.9 Purificación de Proteínas**

Para la purificación de las proteínas se utilizaron dos técnicas cromatográficas: la primera mediante Cromatografía por Afinidad a GST y la segunda por Cromatografía por Intercambio Iónico del tipo Aniónico.

#### **4.9.1 Lisis celular y obtención de clarificados**

El sedimento obtenido de la expresión de las proteínas de interés fue resuspendido en 30 mL de la solución amortiguadora de unión (PBS 1x). Las células resuspendidas en PBS 1x fueron lisadas utilizando una cámara de lisado con perlas de vidrio. El lisado obtenido fue centrifugado a 13,300 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Al finalizar la centrifugación se separó el clarificado para su purificación.

#### **4.9.2 Purificación: Cromatografía por Afinidad**

La purificación mediante cromatografía por afinidad se llevó a cabo utilizando la resina comercial Glutathione Sepharose 4B de GE Healthcare Life Experience.

Para esta cromatografía se utilizaron dos tipos de soluciones amortiguadoras: la primera que corresponde a una solución amortiguadora de unión (PBS 1x) y la segunda que es una solución amortiguadora de elución. La composición de cada una de ellas se describe en las siguientes tablas.

**Tabla 10. Composición de la solución amortiguadora de unión (PBS 1x)**

Componente	Concentración
NaCl	140 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8 mM
DTT	10 mM
pH 7.3	

**Tabla 11. Composición de la solución amortiguadora de elución**

Componente	Concentración
TRIS	50 mM
Glutation reducido	10 mM
DTT	10 mM
pH 8.0	

Una vez obtenidos los clarificados se agregaron 3 mL de la resina previamente equilibrada con 5 volúmenes de PBS 1x. La muestra se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se colocó en una columna de plástico. Cuando la muestra ya estaba en la columna se comenzó a lavar con 10 volúmenes de PBS 1x. Posteriormente se comenzó la elución de la proteína

utilizando la solución amortiguadora de elución, la resina se resuspendió en 1.5 mL de la solución amortiguadora de elución, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se comenzó la elución tomando fracciones de 1.5 mL, este proceso de elución se llevó a cabo 6 veces.

#### 4.9.3 Cuantificación de Proteína Total

Para la cuantificación proteínica se utilizó el método Bradford utilizando como estándar de referencia la Albúmina de Suero Bovino. Se prepararon distintos estándares con las siguientes concentraciones: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Tabla 12. Composición del reactivo Bradford**

Compuesto	Concentración
Azul de Coomassie G-250	5 mg
Etanol	2.5 mL
Ácido Fosfórico	5 mL
H <sub>2</sub> O	Completar hasta 50 mL
Disolver y filtrar	

El análisis se llevó a cabo en una placa de 96 posillos, en cada posillo de colocaron 5  $\mu\text{L}$  de estándar más 250  $\mu\text{L}$  del reactivo Bradford, se incubó por 5 min y se realizó la medición a 630 nm. Las fracciones se trataron de la misma manera (5  $\mu\text{L}$  muestra + 250  $\mu\text{L}$  reactivo). Posteriormente se realizó el análisis y el cálculo para conocer la concentración proteínica de cada fracción.

#### **4.9.4 Diálisis para la remoción del exceso de Glutación**

Utilizado las fracciones previamente obtenidas se llevó a cabo una diálisis para eliminar el exceso de Glutación. Estas fracciones se colocaron en una membrana para diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y posteriormente se sumergieron en una solución amortiguadora fría de PBS 1x pH 7.3. Se hicieron 3 diálisis de 1 hora cada una.

#### **4.9.5 Remoción de la proteína de fusión**

Para separar la proteína de fusión (GST) de la proteína de interés fue necesario el uso de una proteasa (Trombina) que rompiera la secuencia de aminoácidos que existe entre GST y la proteína de interés. Esta proteasa cuya concentración era de 500 unidades (U) fue resuspendida en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X obteniendo como concentración final 1 U/ $\mu\text{L}$ .

En un tubo falcon de 15 mL se colocan 2 mL de proteína de fusión-proteína de interés (fracciones obtenidas de la cromatografía por afinidad) de concentración conocida y se agregaron las unidades de trombina necesarias para su separación. La reacción se incubó a 22 °C durante 16 horas. Se hicieron muestreos de 20 µL a la 1, 2, 4, 6 y 16 horas de incubación. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE.

Una vez que se obtuvo la correcta separación de la proteína de fusión y la proteína de interés se llevó a cabo una segunda purificación por afinidad, con el fin de separar ambas proteínas. Para ésta, se utilizó la misma resina comercial (Glutathione Sepharose 4B) previamente cargada en la columna y se hizo pasar la muestra, se recolectaron las fracciones no unidas puesto que en esas fracciones se encontraba la proteína de interés.

#### **4.9.6 Purificación: Cromatografía por Intercambio Aniónico**

Para esta cromatografía se empleó la columna HiTrap™ Q HP utilizando el equipo Äkta Primeplus. Se equilibró la columna con 5 volúmenes de la solución amortiguadora de unión (TRIS 50 mM pH 7.8) con un flujo de 0.5 mL/minuto a una presión de 0.5 MPa. Posteriormente se cargó la columna con la muestra. Para la elución de la proteína se utilizó una solución amortiguadora de elución (TRIS 50 mM, NaCl 300 mM pH 7.8) y se aplicó un gradiente de elución que iba de 0-100% de concentración de solución amortiguadora de elución en un volumen de 40 mL.

#### 4.10 Determinación de la Estructura Cuaternaria

Para la determinación de la estructura cuaternaria se empleó la columna Superdex 200 Increase 100/300 GL utilizando el equipo Äkta Primeplus. La columna se equilibró con 2 volúmenes de columna utilizando una solución amortiguadora de 50 mM TRIS, 100 mM KCl, pH 7.5. A través de esta se hicieron pasar una serie de marcadores de peso molecular conocido, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 13. Marcadores de Peso Molecular para Cromatografía de Exclusión por tamaño**

Marcador	Peso Molecular aproximado
Citocromo C de corazón equino	12.4 kDa
Anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos	29 kDa
Albúmina de suero bovino	66 kDa
Alcohol deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i>	150 kDa
$\beta$ -amilasa de batata	200 kDa

Al pasar los marcadores a través de la columna se utilizaron las siguientes condiciones: presión de 1.10 MPa y un flujo de 0.3 mL/minuto. Una vez que se

obtuvieron los cromatogramas de elución de los marcadores, se hizo pasar la muestra por la columna, se obtuvo el cromatograma de elución de cada proteína a analizar.

Para la determinación del estado oligomérico se hizo una comparación de los cromatogramas de elución de los marcadores contra el cromatograma de elución de la proteína, tomando en cuenta los mL en los que cada proteína eluyó mostrando un pico de elución (38).

## **CAPÍTULO 5**

### **5. RESULTADOS**

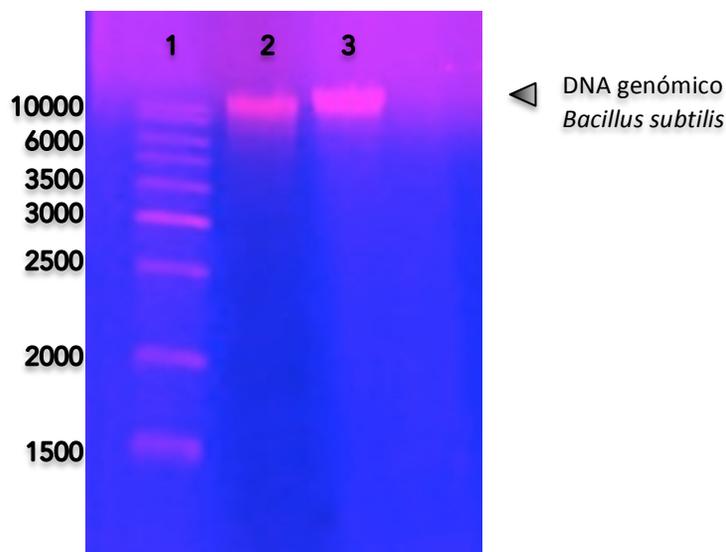
#### **5.1 Crecimiento de *B. subtilis***

La cepa liofilizada mostró un excelente crecimiento en el caldo nutritivo a las 24 horas de incubación permitiendo el escalamiento a 50 mL del medio de cultivo. El sedimento celular recolectado se utilizó para la extracción del DNA Genómico.

#### **5.2 Extracción de DNA genómico**

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo utilizando dos colecciones de sedimento de la cepa, el primero de 6 mL y el segundo de 8 mL. Debido a que es una bacteria gram positiva, presenta una gruesa capa de peptidoglicano en su pared celular es por eso que previamente a la extracción, los sedimentos fueron tratados con una solución de lisis la cual contenía lisozima, enzima encargada de romper la

pared celular. Una vez que finalizó este tratamiento se continuó con el protocolo de extracción. En la Figura 8 se observa el DNA genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular 1Kb; en el carril 2 la banda correspondiente al DNA genómico extraído de 6 mL de sedimento celular y en el carril 3 el DNA genómico extraído de 8 mL del mismo cultivo.

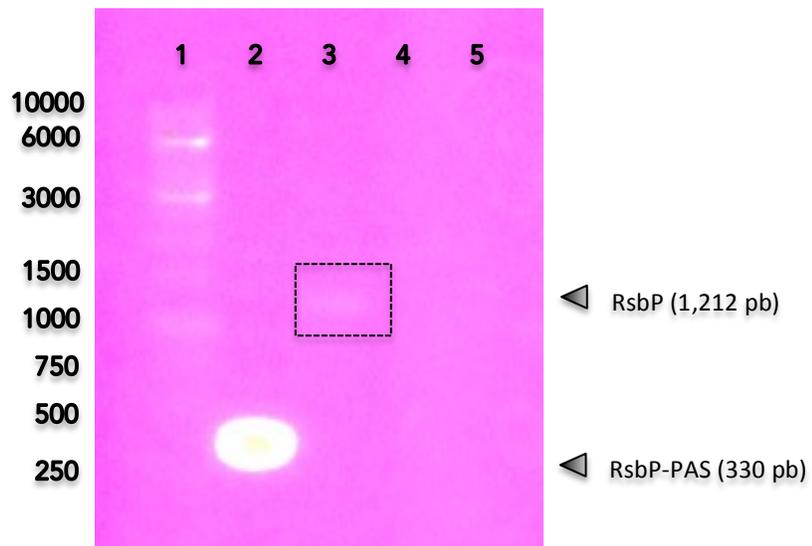


**Figura 8.** Extracción de DNA Genómico de *B. subtilis* en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido del DNA genómico extraído a partir de 6 mL de sedimento celular en el carril 2, y el carril 3 muestra el DNA genómico extraído a partir de 8 mL de sedimento celular.

Como se puede apreciar en la Figura10, el DNA genómico obtenido del sedimento celular de 8 mL mostró una banda mucho más gruesa, lo que indica la presencia de una mayor cantidad de DNA genómico con respecto a la banda de 6 mL de sedimento. Por lo tanto los siguientes experimentos se realizaron utilizando el DNA genómico obtenido del sedimento celular de 8 mL de cultivo.

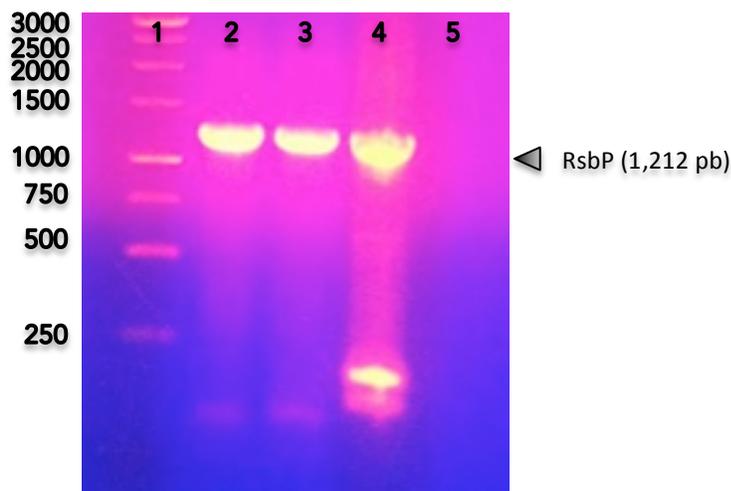
### 5.3 Amplificación de Insertos

A continuación se muestran las amplificaciones de RsbP-PAS y RsbP a partir del DNA genómico extraído de *B. subtilis* (Figura 9). Mediante el gel de agarosa se logra observar la aparición de las bandas correspondientes a cada uno de los genes amplificados. Para RsbP-PAS (Carril 2) se observa una banda ancha mostrando una excelente amplificación que coincide con el peso correcto (330 pb), sin embargo, en el caso de RsbP (carril 3), la banda fue muy delgada y tenue, por lo que se decidió repetir la amplificación. En los carriles 4 y 5 se colocaron controles negativos, el primero sin polimerasa y el segundo sin DNA molde.



**Figura 9. Amplificación de RsbP-PAS y RsbP en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se encuentra la amplificación de RsbP-PAS, en el carril 3 la amplificación de RsbP, y en los carriles 4 y 5 se encuentran los controles negativos, sin enzima y sin DNA molde respectivamente.**

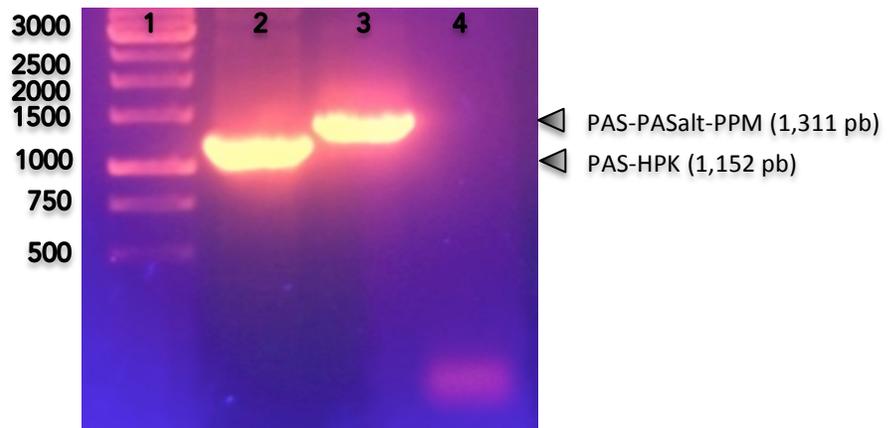
Para la nueva amplificación de RsbP se aumentó la concentración de  $Mg^{++}$ , el número de ciclos de la reacción de PCR y se utilizó como DNA molde el DNA genómico extraído previamente y la primera amplificación del gen. Dichas amplificaciones se pueden observar en la Figura 10. En el carril 1 se aprecia el marcador de peso molecular; en el carril dos, la amplificación de RsbP con 6  $\mu L$  de  $Mg^{++}$ ; en el carril 3, la amplificación de RsbP con 8  $\mu L$  de  $Mg^{++}$  para estas dos amplificaciones se utilizó el DNA genómico de 8 mL como DNA molde, finalmente en el carril 4 se observa la amplificación de RsbP con 6  $\mu L$  de  $Mg^{++}$  y utilizando como DNA molde la primera amplificación del gen.



**Figura 10. Amplificación de RsbP en gel de agarosa al 0.7% modificando la cantidad de  $Mg^{++}$  y el número de ciclos en la PCR utilizando como DNA molde el amplificado de RsbP. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, seguido de la amplificación de RsbP con 6 y 8  $\mu L$  de  $Mg^{++}$  respectivamente (carriles 2 y 3), y en el carril 4 la amplificación de RsbP con 6  $\mu L$  de  $Mg^{++}$  y utilizando como DNA molde la primera amplificación del gen.**

Como se muestra en la figura anterior se observa una banda gruesa por lo tanto se logró mejorar la amplificación de RsbP, además las tres bandas coinciden con el peso correcto (1212 pb). Para los experimentos posteriores se utilizó la amplificación de RsbP con 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}^{++}$ .

La amplificación del DNA que codifica para las quimeras (PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM) se llevó a cabo utilizando como DNA molde el DNA plasmídico del vector pUC57 que contenía cada uno de los genes por separado. Las amplificaciones se muestran en la Figura 11, en la cual la amplificación PAS-HPK se encuentra en el carril 2 y la amplificación de PAS-PASalt-PPM en el carril 3, en el carril 4 se encuentra el control negativo sin enzima.

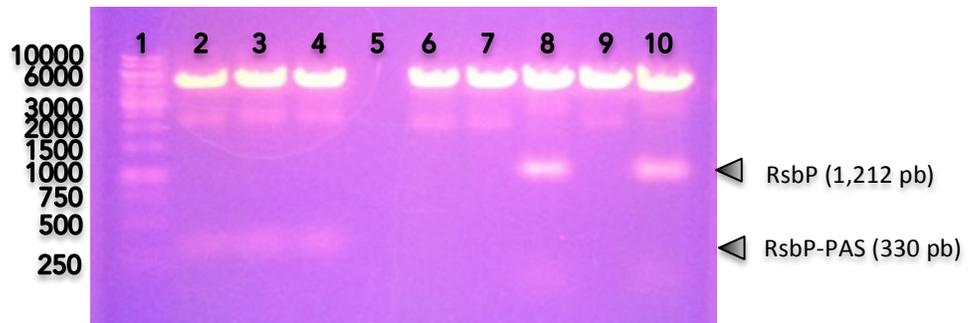


**Figura 11. Amplificación de PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 la amplificación de PAS-HPK, y en el carril 2 la amplificación de PAS-PASalt-PPM.**

De acuerdo con la figura anterior se logra observar una excelente amplificación de PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM y que además coinciden con los pesos correctos que son 1152 pb y 1311 pb respectivamente.

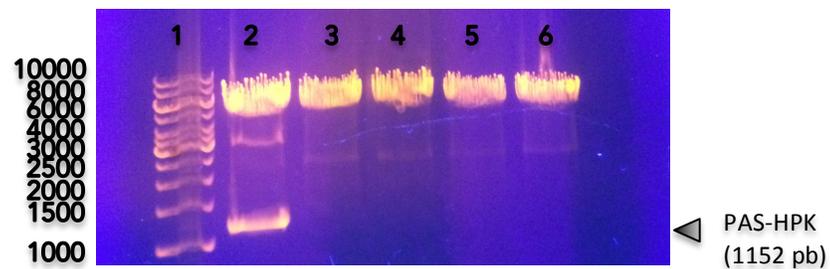
#### 5.4 Análisis de Restricción

En la Figura 12 se muestra el análisis de restricción realizado con las enzimas BamHI y EcoRI para RsbP-PAS y Sall y EcoRI para RsbP, los carriles 2-4 corresponden a PAS y los carriles 6-10 para RsbP. Se puede observar que en el caso de PAS todos los carriles son positivos ya que se observa el inserto de 330 pb entre las bandas de 500 pb y 250 pb, sin embargo, para RsbP solo los carriles 8 y 10 son positivos pues solo éstos muestran el inserto de 1212 pb.



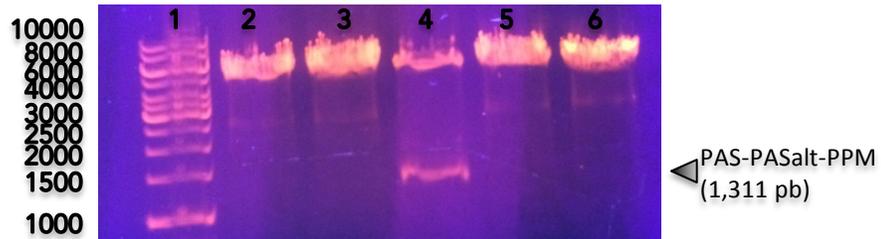
**Figura 12. Análisis de Restricción para RsbP-PAS y RsbP en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, los carriles 2 – 4 corresponden al análisis del DNA plasmídico con el inserto de RsbP-PAS, y los carriles 6 – 10 muestran el análisis del DNA plasmídico con el inserto de RsbP.**

La Figura 13 muestra en análisis de restricción realizado con las enzimas BamHI y XhoI para PAS-HPK. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular y claramente se observa que solo la muestra del carril 2 es positiva pues muestra el inserto de 1152 pb



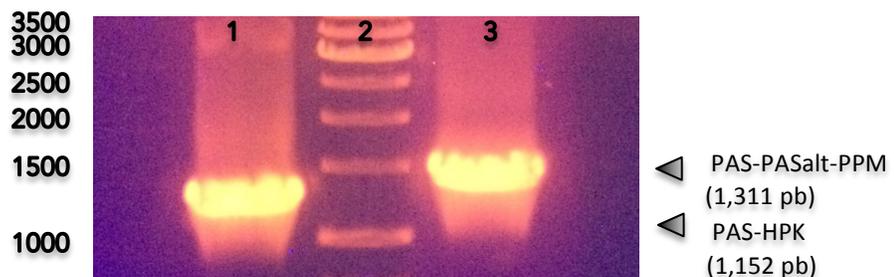
**Figura 13. Análisis de Restricción para PAS-HPK en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, los carriles 2- 6 muestran el análisis del DNA plasmídico con el inserto de PAS-HPK.**

En la Figura 14 se muestra el análisis de restricción realizado con las enzimas BamHI y XhoI para PAS-PASalt-PPM. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, los carriles 2 – 6 muestran las diferentes muestras analizadas se observa que solo la muestra del carril 4 es positiva pues muestra el inserto de 1311 pb.



**Figura 14. Análisis de Restricción para PAS-PASalt-PPM en gel de agarosa al 0.7%. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en los carriles 2 – 6 muestran el análisis del DNA plasmídico con el inserto de PAS-PASalt-PPM.**

Otra manera para comprobar la presencia de los insertos de las quimeras dentro del plásmido fue mediante PCR, utilizando el DNA plasmídico positivo para las quimeras, DNA 1 para PAS-HPK y DNA 3 para PAS-PASalt-PPM respectivamente. En el carril 1 de la Figura 15 se puede observar la correcta amplificación para PAS-HPK (1152 pb), en el segundo carril se encuentra el marcador de peso molecular y en el carril 3 se observa la amplificación de PAS-PASalt-PPM (1311 pb).



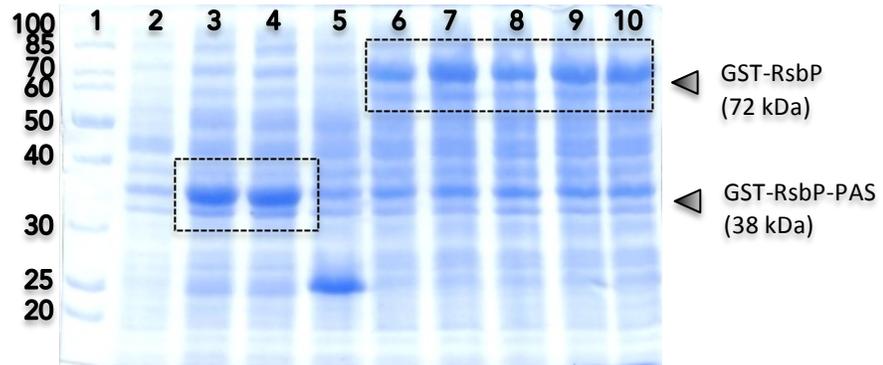
**Figura 15. PCR para la comprobación de los insertos de PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra la amplificación de PAS-HPK, seguido del marcador del peso molecular en el carril 2, y la amplificación de PAS-PASalt-PPM en el carril 3.**

## 5.5 Expresión de Proteínas

### 5.5.1 Expresión piloto de: RsbP-PAS y RsbP

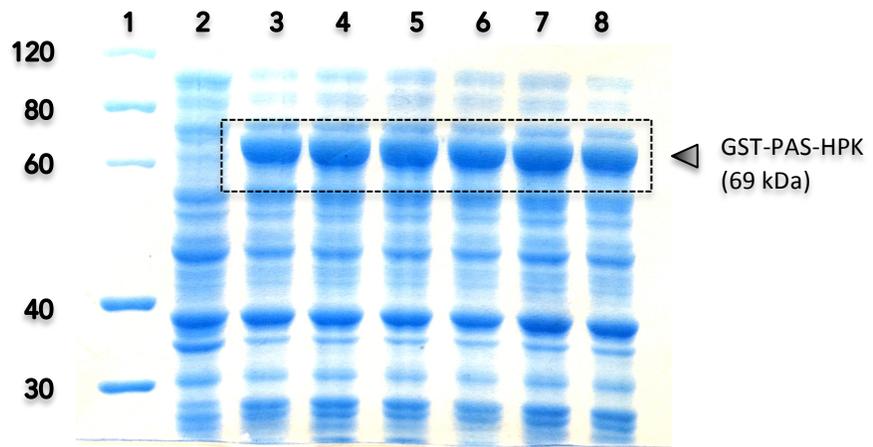
Las expresiones piloto se realizaron para seleccionar la colonia que expresaba mayor cantidad de proteína, para a partir de ella comenzar la expresión a gran escala.

La Figura 16 representa las expresiones piloto para RsbP-PAS y RsbP. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2, la cepa *E. coli* BL21(DE3), los carriles 3, 4 y 5 corresponden a RsbP-PAS y los carriles 6 – 10 para RsbP. En el caso de RsbP-PAS claramente se puede observar la aparición de nuevas bandas de proteína en comparación con las que comúnmente expresa la cepa BL21(DE3). Se logra visualizar que los carriles 3 y 4 son positivos para RsbP-PAS, mostrando la aparición de una nueva banda entre 30 kDa y 40 kDa, lo que coincide con el peso de la proteína que es de aproximadamente 38 kDa. Por otro lado, para RsbP todos los carriles son positivos, mostrando la aparición de una banda entre 70 kDa y 80 kDa la cual coincide con el peso de la proteína RsbP el cual aproximadamente es de 72 kDa.



**Figura 16. Expresiones piloto para RsbP-PAS y RsbP mediante SDS-PAGE al 12%. En el carril 2 se observa el control negativo *E. coli* BL21(DE3), los carriles 2-5 contienen clones con RsbP-PAS, y los carriles 6 -10 contienen clones con RsbP.**

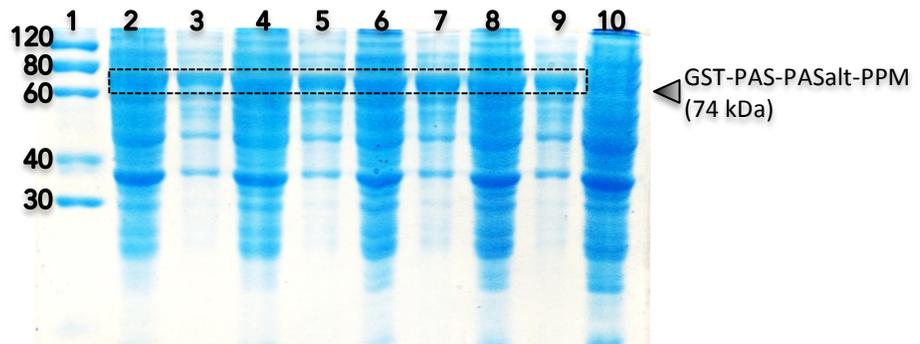
La Figura 17 representa las expresiones piloto para PAS-HPK. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2, la cepa *E. coli* BL21(DE3), los carriles 3 – 8 corresponden a las colonias analizadas de PAS-HPK. Claramente se puede observar la aparición de nuevas bandas de proteína en comparación con las que comúnmente expresa la cepa BL21(DE3). Se logra visualizar que los carriles 3 – 8 son positivos mostrando la aparición de una nueva banda entre 80 kDa y 60 kDa, lo que coincide con el peso de la proteína que es de aproximadamente 69 kDa.



**Figura 17. Expresiones piloto para PAS-HPK mediante SDS-PAGE al 10%. El carril 2 muestra las proteínas expresadas por *E. coli* BL21(DE3) que es el control negativo. Los carriles 3 – 8 muestran las aparición de nuevas bandas que corresponden a PAS-HPK.**

En la Figura 18 se muestran las expresiones piloto para PAS-PASalt-PPM. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en los carriles 2 - 9 se colocó la fracción soluble e insoluble para cada una de las colonias analizadas, finalmente en el carril 10 se colocó el control BL21(DE3).

Claramente se puede observar la aparición de nuevas bandas de proteína tanto en la fracción soluble como en la insoluble en comparación con las que comúnmente expresa la cepa BL21(DE3), se logra visualizar la aparición de una nueva banda entre 80 kDa y 60 kDa que muestra casi el mismo grosor en ambas fracciones analizadas, dicha banda coincide con el peso de la proteína que es de aproximadamente 74 kDa.



**Figura 18. Expresión Piloto para PAS-PASalt-PPM por SDS-PAGE al 10%. Los carriles 2, 4, 6 y 8 contienen la fracción soluble de diferentes clonas y los carriles 3, 5, 7 y 9 muestran la fracción insoluble de las mismas clonas seleccionadas. En el carril 10 se observa el control negativo *E. coli* BL21(DE3).**

Finalmente se seleccionó la colonia de carril 3 para RsbP-PAS, la colonia del carril 8 para RsbP, para PAS-HPK la colonia del carril 4 y para PAS-PASalt-PPM la colonia del carril 4. Dichas colonias se cultivaron en caldo LB/Ampicilina a 37°C hasta alcanzar una DO. De 0.6, finalmente se agregó IPTG como inductor en una concentración de 0.1M.

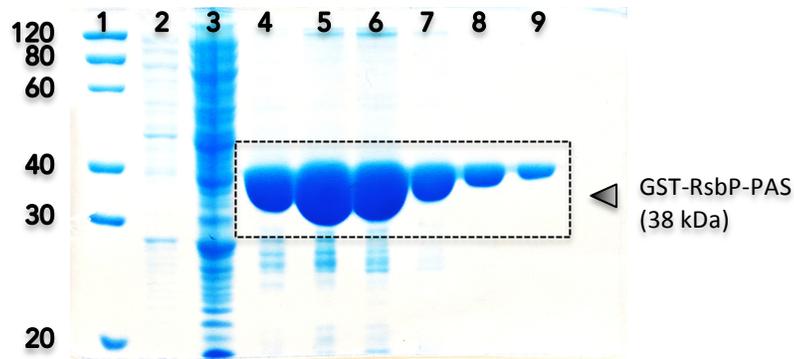
Posteriormente se expresaron 4 litros de cultivo para cada proteína, se recolectaron las células, se realizaron los lisados con PBS 1x y finalmente se obtuvieron los clarificados, los cuales fueron utilizados para la purificación.

## 5.6 Purificación de Proteínas

### 5.6.1 Purificación por Cromatografía por Afinidad

#### 5.6.1.1 Cromatografía por Afinidad: RsbP-PAS

Se purificaron 30 mL del clarificado de proteína (RsbP-PAS) utilizando 3 mL de la resina Glutathione Sepharose 4B. Una vez que la muestra se unió a la resina de la columna, ésta fue lavada con 10 volúmenes con PBS 1x, posteriormente se realizó la elución de la proteína en fracciones de 1500  $\mu$ L cada una. Se obtuvieron 6 fracciones de esta proteína. El análisis de las fracciones de elución se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Análisis de fracciones de RsbP-PAS por SDS-PAGE al 12%. El carril 2 muestra la fracción de lavado, en el carril 3 se observa la fracción no unida, y los carriles 4-9 las fracciones de elución de la proteína.

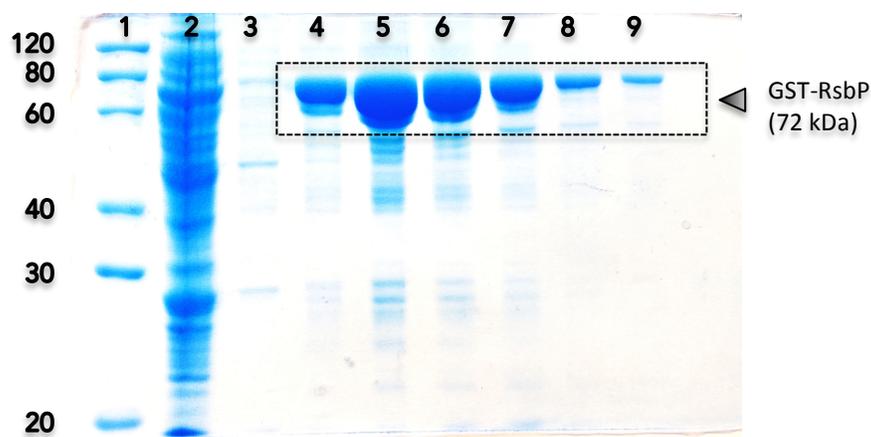
De acuerdo con la figura anterior en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido de la fracción de lavado en el carril 2, la fracción no unida en el carril 3 y los carriles 4 – 9 representan las fracciones de elución

obtenidas de la purificación. Como se puede observar la mayor cantidad de proteína purificada se encuentra en las primeras fracciones de elución y disminuye en las últimas fracciones. Además, las bandas coinciden con el peso molecular esperado que es de 38 kDa aproximadamente. Es importante mencionar que las bandas corresponden a la unión proteína de fusión – proteína de interés, en este caso GST-RsbP-PAS.

#### **5.6.1.2 Cromatografía por Afinidad: RsbP**

Para esta proteína también se purificaron 30 mL de clarificado con 3 mL de resina. Al igual que para RsbP-PAS, se obtuvieron 6 fracciones de elución de 1.5 mL cada una.

La Figura 20 muestra el SDS-PAGE de la purificación de RsbP. En el carril uno se encuentra el marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde a la fracción no unida, en el carril 3 se encuentra la fracción de lavado y los carriles 4 – 9 contienen las fracciones eluidas de RsbP, además estas bandas corresponden con el peso molecular deseado que es de 72 kDa aproximadamente. Se puede apreciar que las fracciones 2 y 3 contienen la mayor cantidad de proteína.

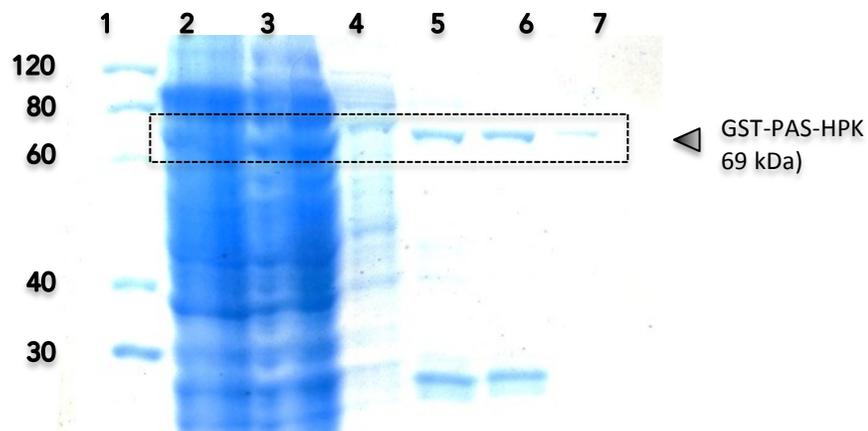


**Figura 20.** Análisis de fracciones de RsbP por SDS-PAGE al 12%. El carril 2 muestra la fracción no unida, en el carril 3 se observa la fracción de lavado, y los carriles 4-9 las fracciones de elución de la proteína.

#### 5.6.1.1 Cromatografía por Afinidad: PAS-HPK

Se purificaron 30 mL de clarificado con 3 mL de resina y se obtuvieron 3 fracciones de elución de 1.5 mL cada una.

La Figura 21 muestra el SDS-PAGE al 10% de la purificación de PAS-HPK. En el carril uno se encuentra el marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al lisado, en el carril 3 la fracción no unida, seguida de la fracción de lavado (Carril 4) y los carriles 5 – 7 contienen las fracciones eluidas de PAS-HPK.



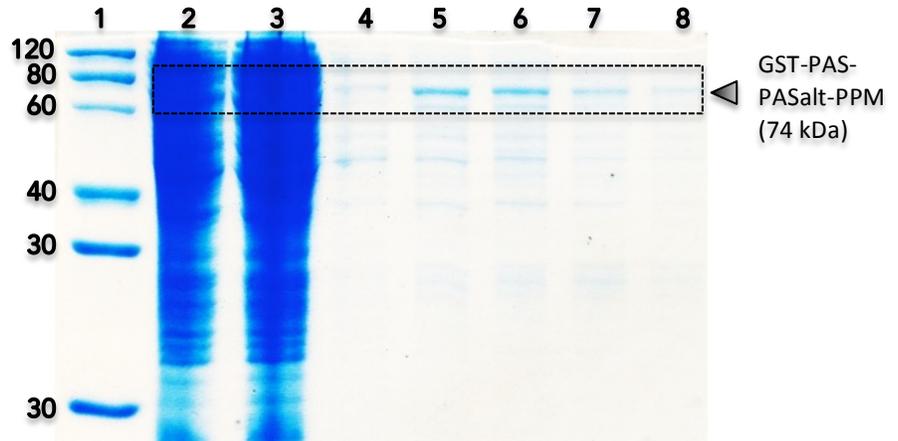
**Figura 21.** Análisis de las fracciones de elución de PAS-HPK por SDS-PAGE al 10%. El carril 2 muestra el lisado de proteínas de *E. coli*, el carril 3 muestra la fracción no unida, en el carril tres se observa la fracción de lavado, y los carriles 5-7 las fracciones de elución de la proteína.

Se logra observar que en las fracciones de elución se obtiene muy poca proteína puesto que aparecen bandas muy delgadas. Además se observa la presencia de la proteína en la fracción no unida (Carril 3).

#### 5.6.1.2 Cromatografía por Afinidad: PAS-PASalt-PPM

Para la proteína PAS-PASalt-PPM igualmente se purificaron 30 mL de clarificado con 3 mL de resina. La Figura 22 muestra el SDS-PAGE al 12% de esta purificación. En el carril uno se encuentra el marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al lisado, en el carril 3 la fracción no unida, seguida de la

fracción de lavado (Carril 3) y los carriles 4 – 8 contienen las fracciones eluidas de PAS-PASalt-PPM.

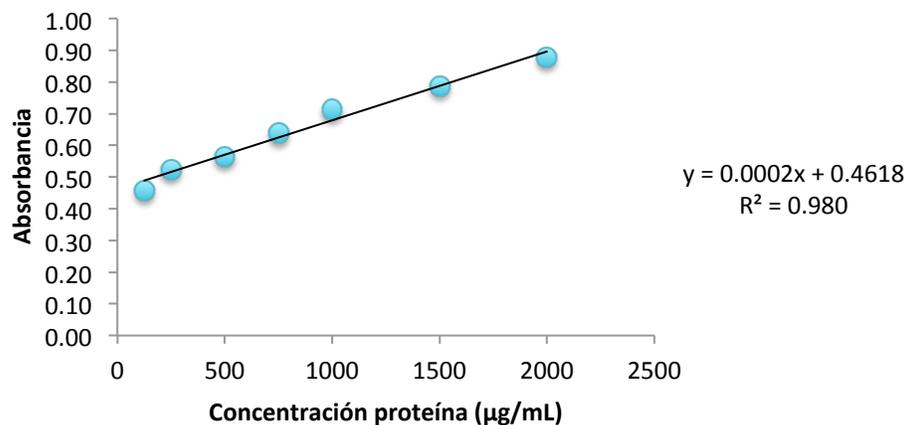


**Figura 22.** Análisis de las fracciones de elución de PAS-PASalt-PPM por SDS-PAGE al 12%. El carril 2 muestra el lisado de proteínas de *E. coli*, el carril 3 muestra la fracción no unida, en el carril 4 se observa la fracción de lavado, y los carriles 5-8 las fracciones de elución de la proteína.

Al igual que PAS-HPK se observa la presencia de la proteína en la fracción no unida (Carril 3), al mismo tiempo se logra apreciar que en las fracciones de elución se obtiene muy poca proteína puesto que aparecen bandas muy delgadas.

### 5.6.2 Cuantificación de Proteína Total

Utilizando el método de Bradford se realizó la cuantificación de proteína total utilizando como estándar la albúmina de suero bovino (39). Obteniendo la siguiente curva de calibración representada en la Figura 23.



**Figura 23. Curva de calibración para la cuantificación de proteína total utilizando el método Bradford**

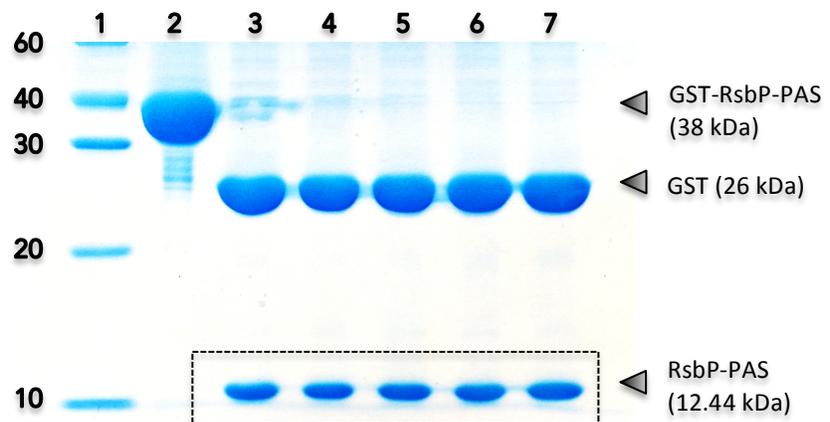
Una vez que se obtuvo la curva de calibración y la ecuación de la recta, se calculó la cantidad en µg/mL de proteína obtenida. Obteniendo los datos presentados en la Tabla 14.

**Tabla 14. Cantidad en µg/mL de proteína obtenida mediante cuantificación por el método Bradford. Ernst (2010).**

Proteína	Volumen	Concentración
RsbP-PAS	9 mL	78,240 µg/mL
RsbP	9 mL	13,168 µg/mL
PAS-HPK	3.5 mL	No cuantificable
PAS-PASalt-PPM2	5 mL	No cuantificable

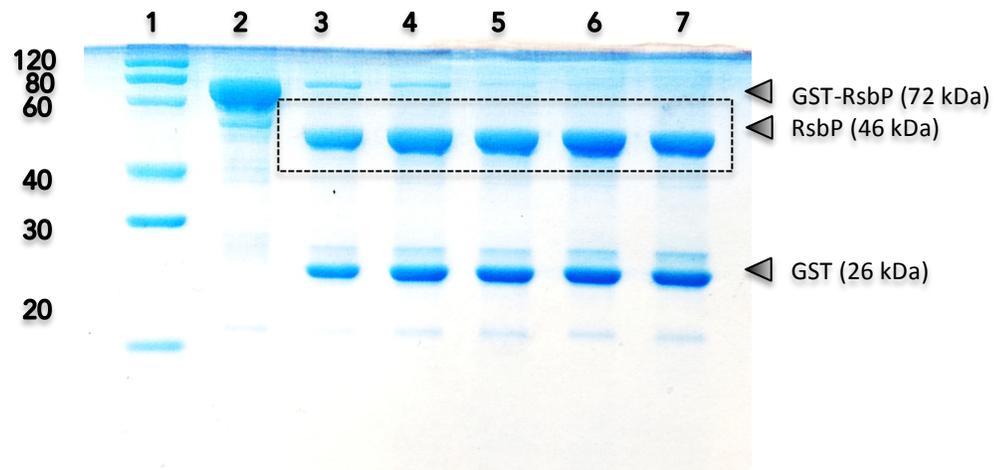
### 5.6.3 Remoción de la Proteína de Fusión

Previo a la separación de la proteína de fusión y la proteína de interés se llevó a cabo una diálisis para remover el exceso de glutatión. Posteriormente, las fracciones se trataron con trombina para separar la GST de la proteína de interés, en este caso, RsbP-PAS. La Figura 24 muestra el SDS-PAGE al 15% de esta separación. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra la proteína sin digerir y los carriles 3 – 7 contienen los muestreos de la separación a la 1, 2, 4, 6 y 16 horas de reacción. RsbP-PAS se encuentra señalada dentro del recuadro y sobre la marca de 10 kDa que concuerda con la altura esperada que es de 12.44 kDa. Se puede observar que la reacción se lleva a cabo completamente a las 6 horas de incubación, separando totalmente la proteína de interés de la proteína de fusión.



**Figura 24. Separación de GST y RsbP-PAS por SDS-PAGE al 15% utilizando la proteasa trombina. En el carril 2 se muestra la proteína sin digerir (GST-RsbP-PAS), los carriles 3-7 muestran la separación de la proteína de fusión y la proteína de interés a diferentes horas de la reacción**

Para RsbP se llevó a cabo la misma reacción de separación obteniendo lo siguiente (Figura 25): en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se encuentra la proteína sin digerir los carriles 3 – 7 contienen los muestreos de la separación a la 1, 2, 4, 6 y 16 horas de reacción. RsbP se encuentra señalada dentro del recuadro entre los marcadores de 40 y 60 kDa, que corresponde con la altura esperada, pues su peso es de 46.03 kDa. Al igual que en la reacción para RsbP-PAS se puede observar que la separación se lleva a cabo completamente a las 5 horas de reacción.



**Figura 25. Separación de GST y RsbP por SDS-PAGE al 12% utilizando la proteasa trombina. En el carril 2 se muestra la proteína sin digerir (GST-RsbP), los carriles 3-7 muestran la separación de la proteína de fusión y la proteína de interés a diferentes horas de la reacción.**

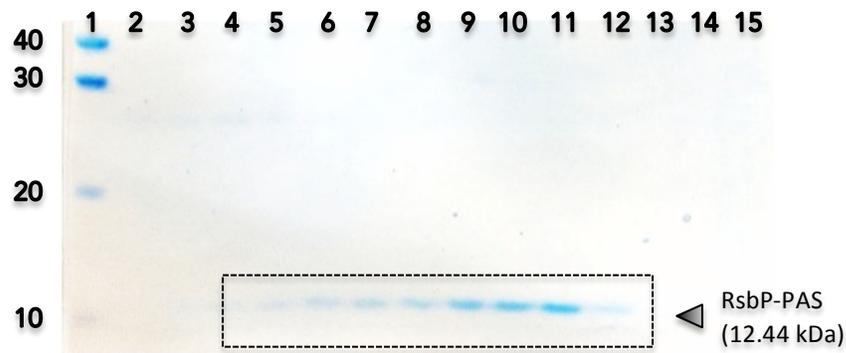
Una vez que se separaron ambas proteínas (proteína de fusión y proteína de interés) se llevó a cabo una segunda purificación por afinidad para obtener solo la proteína de interés. Se utilizó la misma resina (Glutathione

Sepharose 4B) sin embargo ahora se recolectaron las fracciones de lavado, puesto que a la resina solo se unió la proteína de fusión.

#### 5.6.4 Purificación por Cromatografía por Intercambio Aniónico

##### 5.6.4.1 Cromatografía por Intercambio Aniónico: RsbP-PAS

Para esta purificación se utilizaron las fracciones de lavado que se obtuvieron de la segunda purificación por afinidad. Posterior a la purificación se llevó a cabo un análisis de las fracciones recolectadas por medio de SDS-PAGE al 15%, obteniendo lo siguiente:

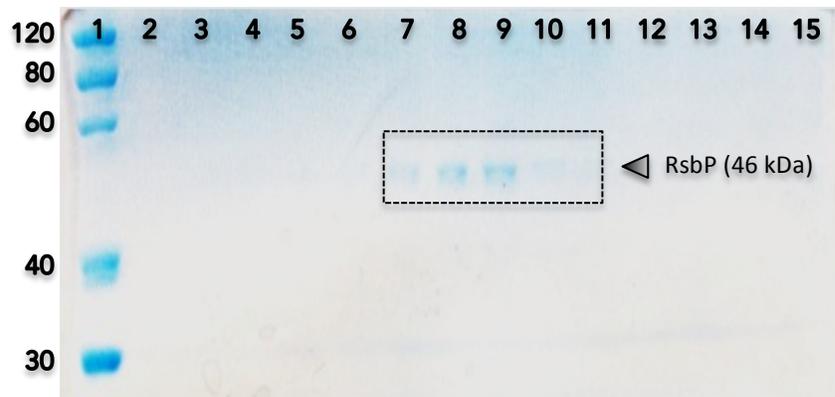


**Figura 26. Análisis de fracciones de RsbP-PAS por SDS-PAGE al 15%. Los carriles 5-12 corresponden a las fracciones de elución de la proteína RsbP-PAS.**

Como se puede observar en la Figura 26 las fracciones 5 – 12 mostraron la presencia de una banda mayor a los 10 kDa, que coincide con el peso de RsbP-PAS (12.44 kDa). En este análisis se puede apreciar la pureza de la proteína, puesto que es la única banda que aparece en el gel de poliacrilamida.

#### 5.6.4.2 Cromatografía por Intercambio Aniónico: RsbP

Al igual que para RsbP-PAS se utilizaron las fracciones de lavado que se obtuvieron de la segunda purificación por afinidad. Al finalizar la purificación se llevó a cabo un análisis de las fracciones recolectadas por medio de SDS-PAGE al 12%, obteniendo lo siguiente:



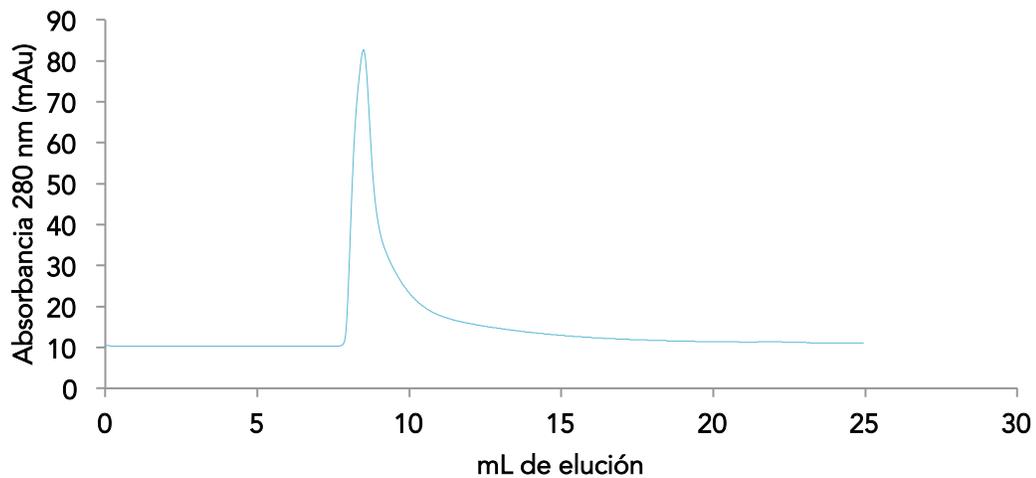
**Figura 27. Análisis de las fracciones de RsbP por SDS-PAGE al 12%. Los carriles 7-10 corresponden a las fracciones de elución de la proteína RsbP.**

Como se puede observar en la Figura 27 las fracciones 7 – 10 mostraron la presencia de una banda entre los 40 – 60 kDa, que coincide con el peso de RsbP que es de 46 kDa aproximadamente. En este análisis se puede apreciar la pureza de la proteína, puesto que es la única banda que aparece en el gel de poliacrilamida.

## 5.7 Determinación de la Estructura Cuaternaria

Para la determinación de la estructura cuaternaria se evaluaron los volúmenes de elución para cada uno de los estándares utilizados. Los cuales se mostrarán a continuación.

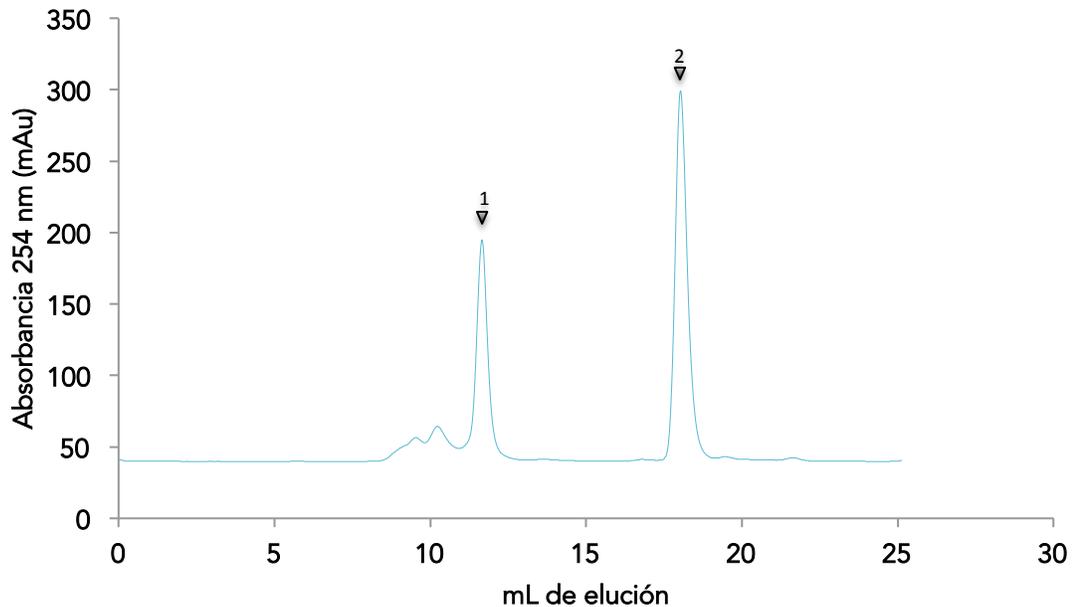
La Figura 28 muestra el cromatograma de elución del azul dextrano, mostrando un máximo pico de absorbancia de 82.697 mAu al 8.494 mL. Éste volumen de elución permitió determinar el volumen muerto de la columna ( $V_0$ ).



**Figura 28. Cromatograma de elución del Azul Dextrano para la determinación del volumen muerto ( $V_0$ ) mediante cromatografía de exclusión por tamaño.**

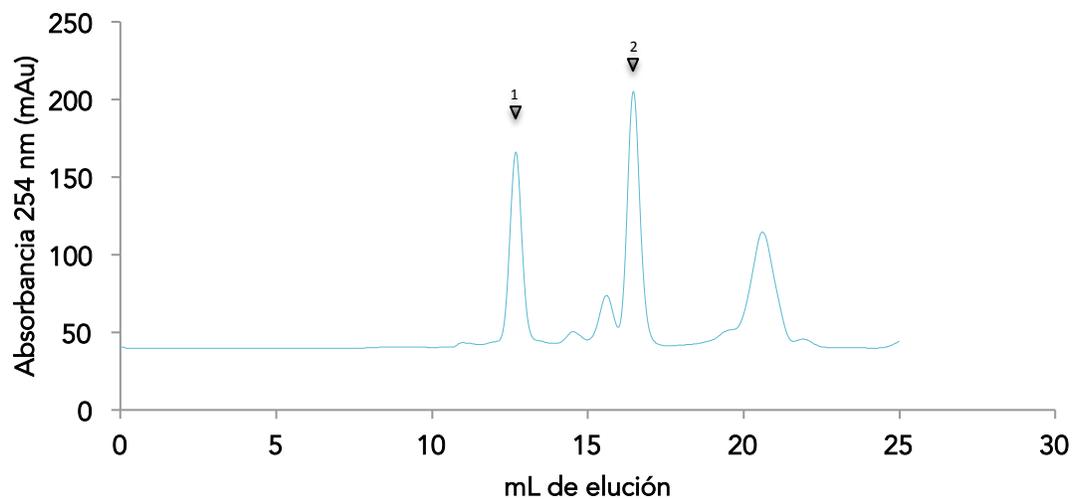
En la Figura 29 se muestra el cromatograma de elución del Citocromo C y la  $\beta$ -amilasa. El primer pico de elución que corresponde a la proteína de mayor peso molecular ( $\beta$ -amilasa, 200 kDa) el cual mostró una absorbancia máxima de

194.937 mAu al 11.655 mL de elución. El segundo pico de elución corresponde a la proteína más pequeña (Citocromo C, 12.4 kDa) el cual mostró una absorbancia máxima de 299.275 mAu al 18.033 mL de elución.

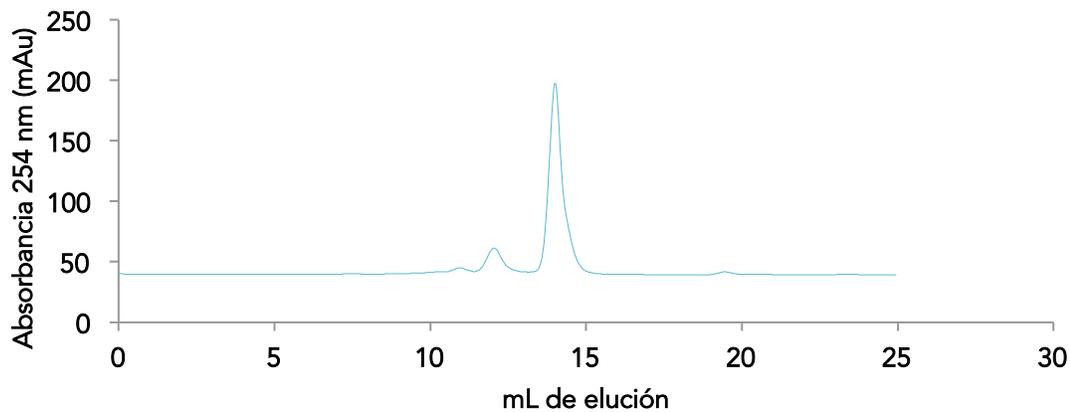


**Figura 29. Cromatograma de elución de los estándares  $\beta$ -amilasa (pico 1) y Citocromo C (pico 2) mediante cromatografía de exclusión por tamaño.**

El siguiente cromatograma (Figura 30) muestra la elución de la Alcohol deshidrogenasa y la Anhidrasa carbónica. El primer pico de elución que corresponde a la Alcohol deshidrogenasa el cual mostró una absorbancia máxima de 166.178 mAu al 12.685 mL de elución. El segundo pico de elución corresponde a la Anhidrasa carbónica el cual mostró una absorbancia máxima de 205.288 mAu al 16.464 mL de elución.



**Figura 30. Cromatograma de elución de los estándares Alcohol deshidrogenasa (pico 1) y Anhidrasa carbónica (pico 2) mediante cromatografía de exclusión por tamaño.**



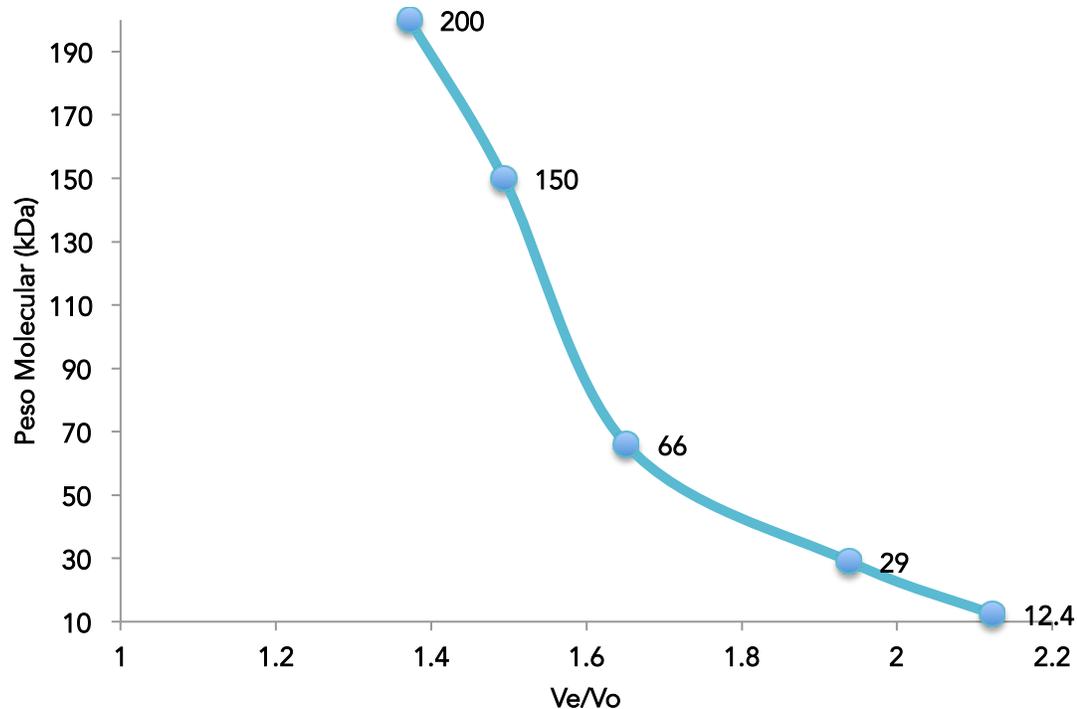
**Figura 31. Cromatograma de elución del estándar de Albúmina de Suero Bovino mediante cromatografía de exclusión por tamaño.**

Finalmente en la Figura 31 se muestra el cromatograma de elución de la Albúmina de suero bovino la cual mostró una absorbancia máxima de 197.563 mAu al 14.024 mL de elución. Todos los valores obtenidos se resumen en la Tabla 15.

**Tabla 15. Valores de Absorbancia y mL de elución de estándares para determinación de estructura cuaternaria**

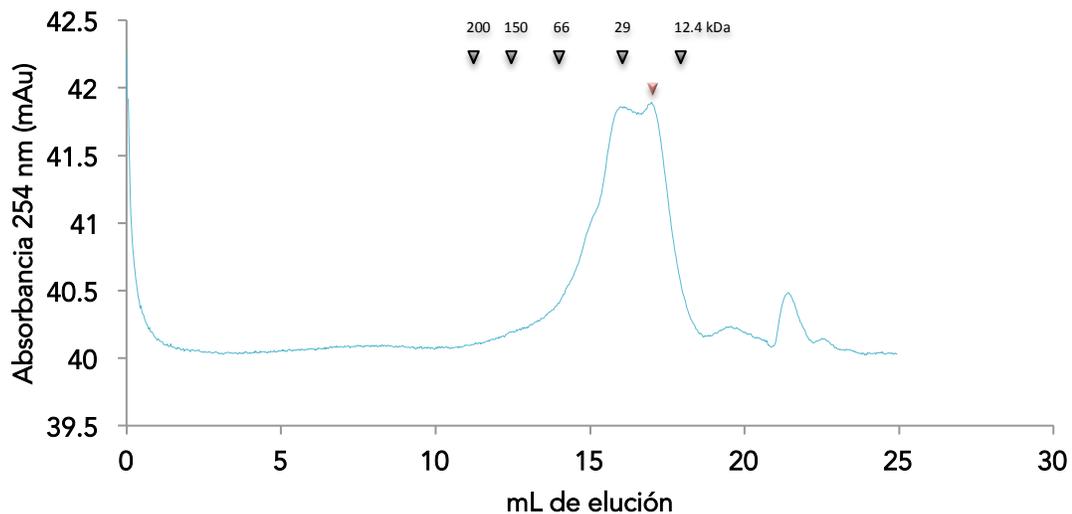
Estándar	Absorbancia (mAu)	Volumen de elución (V <sub>e</sub> )
Azul Dextran	82.697	8.494
Citocromo C	299.275	18.033
Anhidrasa carbónica	205.288	16.464
Albúmina	197.563	14.024
Alcohol deshidrogenasa	166.178	12.685
β-amilasa	194.937	11.655

A continuación (Figura 32) se muestra la curva de calibración de los estándares. Para esta gráfica se utilizó la relación  $V_e/V_0$  en donde:  $V_e$  corresponde al volumen de elución de cada estándar entre el volumen muerto ( $V_0$ ) determinado por el  $V_e$  del azul dextran.



**Figura 32. Curva de calibración de estándares de peso molecular conocido. B-amilasa 200 kDa, Alcohol deshidrogenasa 150 kDa, Albúmina de suero bovino 66 kDa, Anhidrasa carbónica 29 kDa y Citocromo C 12.4 kDa.**

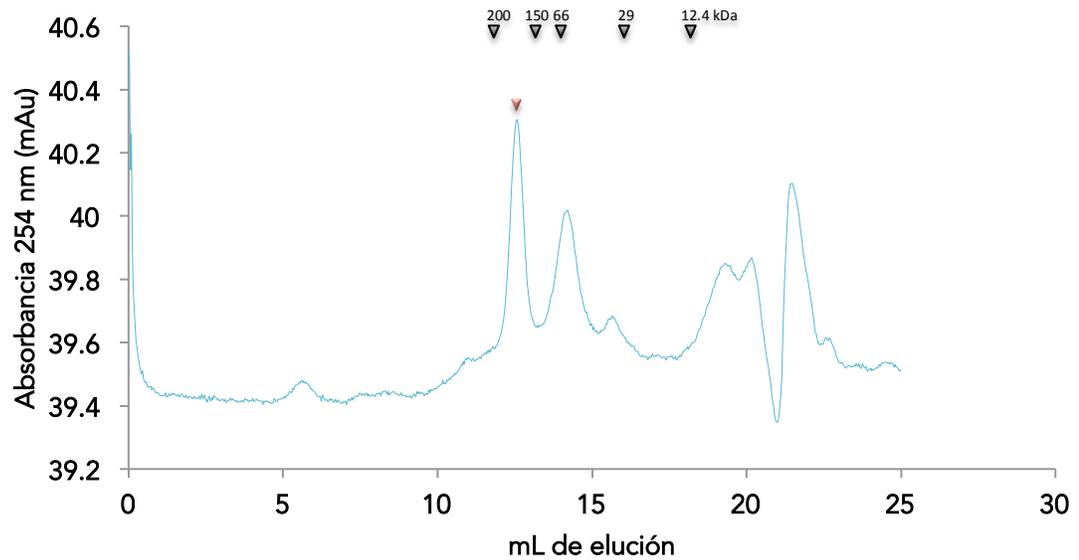
El siguiente cromatograma (Figura 33) representa la elución de la proteína RsbP-PAS, el cual mostró una absorbancia máxima de 40.98 mAu al 17.622 mL de elución.



**Figura 33. Cromatograma de exclusión por tamaño de RsbP-PAS. Los símbolos de color negro indican el volumen de elución de los estándares de referencia, el símbolo rojo indica el volumen de elución del máximo pico de absorción de la proteína.**

Al comparar el volumen de elución de RsbP-PAS contra los volúmenes de elución de los estándares de peso molecular conocido, se puede observar que el pico de elución se encuentra muy cerca del estándar de 12.4 kDa; el peso de RsbP-PAS es de 12.44 kDa lo que indica que el estado oligomérico de este dominio sensorial es monómero.

La Figura 34 muestra el cromatograma de elución de RsbP, ésta proteína mostró una absorbancia máxima de 40.305 mAu al 12.447 mL de elución.



**Figura 34. Cromatograma de exclusión por tamaño de RsbP. Los símbolos de color negro indican el volumen de elución de los estándares de referencia, el símbolo rojo indica el volumen de elución del máximo pico de absorción de la proteína.**

Al comparar el volumen de elución de RsbP contra los volúmenes de elución de los estándares de peso molecular conocido, se puede observar que el pico de elución se encuentra entre las proteínas de 200 y 150 kDa; el peso del monómero de RsbP-PAS es de 46 kDa lo que indica que el estado oligomérico de esta proteína se encuentra como tetrámero.

## CAPÍTULO 6

### 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este proyecto se llevó a cabo la expresión, purificación y caracterización de proteínas quiméricas a RsbP-PAS con el objetivo de establecer la relación estructura-función de dominios Per-ARNT-Sim bacterianos.

Utilizando diferentes herramientas para la alineación de proteínas, se llevó a cabo la alineación de todas las proteínas homólogas a RsbP-PAS, lo que permitió constatar el tamaño que este dominio presenta, los 110 aminoácidos que cuentan con 5 plegamientos  $\beta$  antiparalelos y las presencia de varias  $\alpha$  hélices (2). Para el análisis y construcción de las secuencias de las proteínas quiméricas se tomaron en cuenta las proteínas recién mencionadas (5). Con el uso de herramientas de alineación de proteínas se determinó la secuencia del bucle enrollado y la secuencia de diferentes dominios de respuesta, en este caso fosfatasa (PPM) e histidina quinasa (HPK).

El análisis de la secuencia del bucle enrollado permitió la verificación de las características que esta secuencia de aminoácidos presenta, entre las cuales se encuentran que las secuencias contienen  $7n$  residuos entre los aminoácidos aspartato e histidina donde  $n$  es igual a 3 dando un total de 21 aminoácidos, en esta secuencia se conservan 5 alfa hélices, el extremo C-terminal de PAS conserva el dominio DIT y el aminoácido #21 corresponde a una histidina, dichas características reportadas el año 2009 por Möglich y colaboradores permitieron la identificación del bucle enrollado. Estos datos fueron muy importantes, ya que conociendo la secuencia de este bucle, fue posible diseñar una proteína quimérica (PAS-PASalt-PPM), puesto que en esta proteína se sustituyó la secuencia del bucle enrollado por la secuencia del dominio PAS1 del fitocromo A. Por lo anterior la proteína quimérica PAS-PASalt-PPM, estuvo formada de la siguiente manera, como dominio sensorial se utilizó la secuencia de RsbP-PAS, seguido de la secuencia del dominio PAS1 del fitocromo A la cual actuaría como el bucle enrollado y finalmente como dominio de respuesta la secuencia de la fosfatasa (PPM) de RsbP de *B. subtilis*. El dominio PAS1 del fitocromo A fue seleccionado debido a que éste es un monómero y no interfiere con la transducción de señales del fotoreceptor, como ya se había reportado en el año 2006 por Kim y colaboradores (36).

La secuencia de la segunda proteína quimérica, PAS-HPK está formada por la secuencia del dominio RsbP-PAS, seguida de la secuencia del bucle enrollado y con

dominio de respuesta histidina quinasa de *Pseudomonas syringae*. Se seleccionó la secuencia del bucle enrollado de *P. syringae* debido a que se ha reportado que el bucle enrollado juega un papel importante en la activación del dominio de respuesta HPK (31) y por lo tanto la modificación del estado oligomérico de la proteína (40). Las secuencias de las proteínas se encuentran descritas en el Capítulo 1, Tabla 1.

Para la construcción de los plásmidos se utilizó el plásmido pGEX-4T2 como vector, el cual contiene la secuencia de la proteína de fusión Glutación S-transferasa. Recientemente se ha propuesto el uso de estas proteínas ya que facilitan la purificación de proteínas de interés mediante cromatografía por afinidad, además se ha reportado que GST promueve la producción de proteína soluble en *E. coli* sin embargo, dependiendo de la proteína de interés, puede llegar a formar cuerpos de inclusión (41).

En las Figuras 16 - 18 se observan las expresiones piloto de las proteínas RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM, estos geles de poliacrilamida muestran que es posible obtener mucha proteína soluble utilizando GST como proteína de fusión. Estos altos niveles de expresión se pueden comprobar en la Figura 19 donde se observa la purificación de RsbP-PAS, mostrando un alto rendimiento en la purificación, así mismo, esto se puede comprobar nuevamente en la purificación de RsbP (Figura 20). Sin embargo, la desventaja del uso de esta proteína de fusión se

presentó durante la expresión de la quimera PAS-PASalt-PPM (Figura 18) ya que mostró una alta producción de cuerpos de inclusión, los cuales representan proteína mal plegada e insoluble. Esto se puede resolver con sistemas de expresión que favorezcan aún más la solubilidad de la proteína, por ejemplo utilizando MBP (Proteína de Unión a la Maltosa) como proteína de fusión o el dominio de unión a la quitina (42), (43), (44). O mejorando las condiciones de expresión de la proteína, por ejemplo modificando la temperatura de inducción y la concentración del inductor (45).

Un inconveniente que se presentó fue la deficiencia en la unión de las proteínas a la resina. Durante la purificación mediante cromatografía por afinidad, las proteínas quiméricas PAS-HPK (Figura 21) y PAS-PASalt-PPM (Figura 22) presentaron este problema, puesto que se puede observar la presencia de la proteína en la fracción no unida, lo que indica que la proteína de fusión no se está uniendo correctamente a la resina. Esto pudo deberse a diferentes factores tales como una alta concentración de proteína en el lisado, lisis celular severa, formación de canales entre la resina lo cual permite que la proteína no se adhiera, disminución de la capacidad de unión de la resina y/o altos flujos de lavado (46).

Para mejorar los rendimientos de purificación de estas proteínas quiméricas se ha reportado el uso de diferentes proteínas de fusión como SmbP (Small Metal Binding Protein). Ya que se ha demostrado que produce una alta cantidad de

proteína soluble, pocos cuerpos de inclusión, facilita la purificación por IMAC (Cromatografía de Iones Metálicos Inmovilizados), y al ser una proteína de bajo peso molecular se obtienen mayores rendimientos de la proteína de interés (47).

La expresión, purificación y caracterización del dominio PAS de RsbP (RsbP-PAS), se llevó a cabo con el objetivo de conocer la estructura definida que éste forma para poder comparar la variación en la estructura cuaternaria de una proteína completa (RsbP) y la estructura cuaternaria en proteínas quiméricas. El estudio de la estructura cuaternaria determinó el estado oligomérico del dominio RsbP-PAS, siendo un monómero de 12.44 kDa, como se ha observado en estudios previos los cuales muestran que los dominios PAS se encuentran en forma de monómero; por ejemplo Reinelt y colaboradores en el 2003 estudiaron el dominio PAS del sensor CytA de *Klebsiella pneumoniae* y determinaron que el dominio PAS se encuentra como un monómero de 15.3 kDa (48); otro trabajo con el que se puede comparar este resultado, es el realizado en el año 2013 por Purohit y colaboradores quienes estudiaron la subunidad  $\alpha 1$  del dominio PAS de sGC (Guanilil ciclasa soluble) determinando que este dominio PAS también se encuentra como monómero (49). Estos resultados indican que en general los dominios PAS se pueden encontrar como monómeros. Además es importante mencionar que todas estas determinaciones se hicieron utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño, lo que indica que es una técnica efectiva para la determinación del estado oligomérico de una proteína.

RsbP de *Bacillus subtilis* cuyo monómero tiene un peso molecular de 46.03 kDa presenta el estado oligomérico de un tetrámero. Este resultado concuerda con el reportado en el 2011 por Nadezhdin, Brody y Price donde se establece que el monómero RsbP-His-tagged de 48 kDa se encuentra como tetrámero. La oligomerización de RsbP, le permitirá presentar un estado activo, esto significa que el cambio en la estructura cuaternaria es un componente necesario para la función de la proteína, como ya se ha reportado para histidina quinasa, que se dimeriza para alcanzar la fosfolización en *trans* en *E. coli* (50) y en *Saccharomyces cerevisiae* (51).

Estos resultados indican que RsbP-PAS es un dominio sensorial flexible, ya que tiene la capacidad de modificar su estructura cuaternaria confiriéndole la capacidad de formar homodímeros y heterodímeros (49). Como ya se ha reportado, la presencia de una señal puede alterar un dominio de respuesta mediante un cambio en la estructura terciaria o el cambio de la estructura cuaternaria en una proteína (2), (40). Por lo anterior, el cambio en la estructura cuaternaria de estas proteínas podría desempeñar un papel importante en la transducción de señales.

## CAPÍTULO 7

### 7. CONCLUSIONES

- Por medio de PCR se logró la correcta amplificación de los genes que codifican para las proteínas RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM.
- Se logró diseñar y construir DNA recombinante para la expresión de proteínas en *Escherichia coli* utilizando pGEX-4T2 como vector.
- Se determinó la secuencia del bucle enrollado mediante la alineación de proteínas, comprobando las características que éste presenta. Además se logró predecir la secuencia de dos dominios de respuesta, histidina quinasa (HPK) y fosfatasa (PPM), logrando así el diseño de las secuencias para las quimeras.

- Se obtuvo la correcta expresión en *E. coli* de las proteínas RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM, puesto que se observa la aparición de nuevas bandas que corresponden al peso molecular deseado.
- Se logró la purificación de las proteínas RsbP-PAS, RsbP, PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM mediante cromatografía por afinidad, obteniendo una considerable cantidad de proteína purificada para el caso de RsbP-PAS y RsbP. En el caso de las quimeras (PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM) se obtuvo muy poco producto, impidiendo la cuantificación de las mismas y su posterior análisis.
- Se purificaron las proteínas RsbP-PAS y RsbP mediante cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño, permitiendo la obtención de proteínas altamente puras.
- Es posible determinar la estructura cuaternaria o estado oligomérico de una proteína mediante técnicas tradicionales de cromatografía, en este caso mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
- RsbP-PAS de *Bacillus subtilis* presenta un estado oligomérico en forma de monómero, mientras que RsbP se encuentra como tetrámero.

- Es difícil establecer la relación estructura-función de dominios PAS bacterianos debido a que no se logró la purificación y caracterización de las proteínas quiméricas propuestas en este proyecto.

## CAPÍTULO 8

### 8. PERSPECTIVAS

Optimizar las condiciones de purificación de las quimeras PAS-HPK y PAS-PASalt-PPM, para determinar su estructura cuaternaria y establecer la relación estructura-función de los dominios PAS en bacterias. Así mismo, continuar con el diseño de proteínas quiméricas con dominos Per-ARNT-Sim y diferentes dominios de respuesta, modificando la unión entre ellos.

Optimizar el proceso de purificación por afinidad a GST o utilizar una diferente proteína de fusión que disminuya la formación de cuerpos de inclusión y con esto mejorar la expresión y purificación de dichas proteínas quiméricas, por ejemplo CuSF o SmbP.

Realizar ensayos de interacción entre proteínas, por ejemplo, ensayos entre proteínas quiméricas de RsbP-PAS con RsbQ, mediante un sistema doble híbrido, o ensayos con anticuerpos dirigidos a RsbQ y hacer el análisis por Western Blot.

## CAPÍTULO 9

### 9. SEGURIDAD EN EL TRABAJO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de los residuos generados durante el presente proyecto fueron gestionados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en el programa de Manejo Integral de Residuos. Dichos residuos se dispusieron como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 16. Disposición de residuos generados**

<b>Residuo Generado</b>	<b>Colector</b>
Colector A (Soluciones salinas de pH 6 – 8, sales, ácidos y bases orgánicas)	Buffer TAE (TRIS, ácido acético, EDTA) Buffer TGS (TRIS, Glicina, SDS) Reactivo Bradford
Colector G (Combinaciones orgánicas sólidas)	Agarosa Poliacrilamida
Colorantes y Lugol	Azul de Coomassie

## REFERENCIAS

1. Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*. 2003;300(5618):445–542.
2. Möglich A, Ayers R a., Moffat K. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure*. 2009;17(10):1,282–1,294.
3. Mougél C, Zhulin IB. CHASE: An extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences*. 2001;26(10):582–584.
4. Taylor BL. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen , Redox Potential , and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999;63(2):479–506.
5. Nadezhdin E V., Brody MS, Price CW. An  $\alpha/\beta$  hydrolase and associated Per-ARNT-Sim domain comprise a bipartite sensing module coupled with diverse output domains. *PLoS One*. 2011;6(9):1–12.
6. Vreede J, Van der Horst M, Hellingwerf KJ, Crielaard W, Van Aalten DMF. PAS domains. Common structure and common flexibility. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(20):18,434–18,439.
7. McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annual Review of Physiology*. 2010;72:625–45.
8. Slavny P, Little R, Salinas P, Clarke T, Dixon R. Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. *Molecular Microbiology*. 2010;75(1):61–75.
9. Adaixo R, Harley C, Castro-Rodrigues AF, Morais-Cabral JH. Structural Properties of PAS Domains from the KCNH Potassium Channels. *PLoS One*. 2013;8(3)1–9.
10. Henry JT, Crosson S. Ligand-Binding PAS Domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology*. 2011;65(1):261–86.
11. Ayers RA, Moffat K. Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains. *Biochemistry*. 2011;18:12,078–12,086.
12. Glekas GD, Foster RM, Cates JR, Estrella J, Wawrzyniak MJ, Rao C V., et al. A PAS Domain binds asparagine in the chemotaxis receptor McpB in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(3):1,870–1,878.

13. Altschul SF, Madden TL, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(17):3,389–3,402.
14. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, Deweese-Scott C, Fong JH, et al. CDD: Specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(1):205–210.
15. A. Repik, A. Rebbapragada, M. Johnson, J. Haznedar, I. Zhulin and BT. PAS Domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 2000;36(4):806–816.
16. Little R, Slavny P, Dixon R. Influence of PAS Domain flanking regions on oligomerisation and redox signalling by NifL. *PLoS One*. 2012;7(10)1–8.
17. Key J, Hefti M, Purcell EB, Moffat K. Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism. *Biochemistry*. 2007;46(12):3,614–3,623.
18. Little R, Salinas P, Slavny P, Clarke T, Dixon R. Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission. *Molecular Microbiology*. 2011;82(1):222–235.
19. Schmitz R, Klopprogge K, Grabbe R. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2002;4(3):235–242.
20. Hill S, Austin S, Eydmann T, Jones T, Dixon R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(5):2,143–2,148.
21. Vijay K, Brody MS, Fredlund E, Price CW. A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the  $\sigma^B$  transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 2000;35(1):180–188.
22. Brody MS, Vijay K, Price CW. Catalytic function of an  $\alpha/\beta$  hydrolase is required for energy stress activation of the  $\sigma^B$  transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(21):6,422–6,428.
23. Kim T-J, Gaidenko TA, Price CW. A multicomponent protein complex mediates environmental stress signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 2004;341(1):135–150.

24. Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, Auchtung JM, Driscoll ME, Gardner TS, et al. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews: Microbiology*. 2008;6(8):592–603.
25. Amezcua C, Harper SM, Rutter J, Gardner KH. Structure and interactions of PAS Kinase N-terminal PAS domain: Model for intramolecular kinase regulation. *Structure*. 2002;10(10):1349–61.
26. Da Silva Xavier G, Rutter J, Rutter G. Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(22):8,319–8,324.
27. Crosson S, Rajagopal S, Moffat K. The LOV domain family: Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*. 2003;42(1):2–10.
28. Möglich A, Moffat K. Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV Domain of the photosensor YtvA. *Journal of Molecular Biology*. 2007;373(1):112–126.
29. Martinez SE, Beavo J a, Hol WGJ. GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Molecular Interventions*. 2002;2(5):317–323.
30. Podust L, Loanoviciu A, Montellano PRO De. Å x-ray structure of the heme-bound GAF Domain of sensory histidine kinase DosT of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. 2008;47(47):12,523–12,531.
31. Möglich A, Ayers R, Moffat K. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *Journal of Molecular Biology*. 2009;385(5):1,433–1,444.
32. Halavaty AS, Moffat K. Coiled-coil dimerization of the LOV2 domain of the blue-light photoreceptor phototropin 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 2013;69(12):1,316–1,321.
33. Yu X, Wang C, Li Y. Classification of protein quaternary structure by functional domain composition. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:187–192.
34. Nathan C. Rockwell, Yi-Shin Su and JCL. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 2009;57(26):837–858.

35. Chen M, Chory J. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology*. 2011;21(11):664–671.
36. Kim J II, Bhoo SH, Han YJ, Zarate X, Furuya M, Song PS. The PAS2 domain is required for dimerization of phytochrome A. *Journal of Photochemical and Photobiology A: Chemistry*. 2006;178:115–121.
37. Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*. 2012;7(5):620–634.
38. Hong P, Koza S, Bouvier ESP. Size-Exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologys*. 2012;35:2,923–2,950.
39. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2010;(38):1–6.
40. Heintz U, Meinhart A, Winkler A. Multi-PAS domain-mediated protein oligomerization of PpsR from *Rhodobacter sphaeroides*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2014;70(3):863–876.
41. Smyth D, Mrozkiewicz M. Crystal structures of fusion proteins with large affinity tags. *Protein Science*. 2003;12:1,313–1,322.
42. Kapust RB, Waugh DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*. 1999;8(8):1,668–1,674.
43. Zhao X, Li G, Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2013;581093
44. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification*. 2005;41(1):98–105.
45. Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*. 2006;17(4):353–358.
46. Speicher SH and DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods in Molecular Biology*. 2011;681:259–280.
47. Barney BM, Lobrutto R, Francisco WA. Characterization of a Small Metal Binding Protein from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry*. 2004;43:11,206–11,213.

48. Reinelt S, Hofmann E, Gerharz T, Bott M, Madden DR. The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular pas domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(40):39,189–39,196.
49. Purohit R, Weichsel A, Montfort WR. Crystal structure of the Alpha subunit PAS domain from soluble guanylyl cyclase. *Protein Science*. 2013;22(10):1,439–1,444.
50. Yang Y, Inouye M. Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(24):11,057–11,061.
51. Grose JH, Rutter J. The role of PAS kinase in PASSing the glucose signal. *Sensors*. 2010;10(6):5,668–5,682.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jessica Judith Gómez Lugo

Candidato para el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

**Tesis:** EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE RsbP CON EL DOMINIO SENSORIAL Per-ARNT-Sim Y DOMINIOS DE RESPUESTA HISTIDINA QUINASA Y FOSFATASA

**Edad:** 25 años

**Campo de estudio:** Ingeniería Genética

### **Biografía:**

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 19 de abril de 1990, hija de Francisco Javier Gómez Vega y Juana Lugo Torres.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en el 2012 .

Experiencia profesional: Profesor en la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.