

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Expresión, purificación y caracterización de la
enzima CGI58/ABHD5**

Tesis que presenta

Miriam Livier Llamas García

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., 04 de Julio de 2014



Constancia de aprobación de la tesis

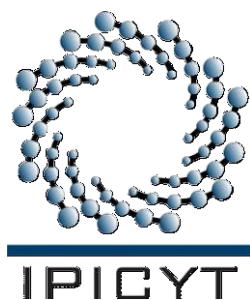
La tesis ***“Expresión, purificación y caracterización de la enzima CGI58/ABHD5”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Miriam Livier Llamas García** y aprobada el **cuatro de julio del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Samuel Lara González
Director de la tesis

Dr. Roberto Sánchez Olea
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial

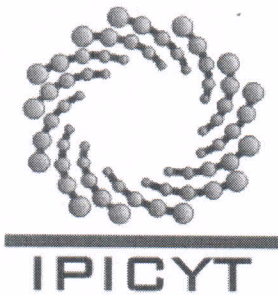
Dra. Gabriela Margarita Montero Morán
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Samuel Lara González.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 279199) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 116 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de julio del año 2014, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Roberto Sánchez Olea	Presidente	UASLP
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dra. Gabriela Margarita Montero Morán	Sinodal externo	UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Miriam Livier Llamas García

sobre la Tesis intitulada:

Expresión, purificación y caracterización de la enzima CGI58/ABHD5

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

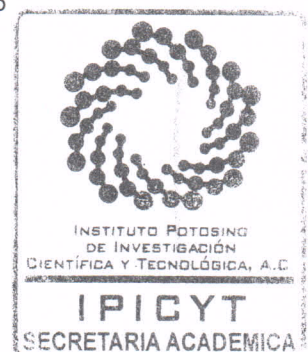
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de julio de 2014.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mis familiares y
amigos que siempre me
han apoyado

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Dr. Samuel Lara González por la dirección y apoyo en este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Ana Paulina Barba, Dra. Gabriela Montero y Dr. Roberto Sánchez, por las aportaciones en la tesis.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Resumen	02
INTRODUCCIÓN	03
MATERIALES Y MÉTODOS	06
Materiales	06
Modelado estructural de CGI58	06
Clonación del cDNA de CGI58 de humano y ratón en el vector de expresión pET28(PPS)	07
Evaluación de la expresión y solubilidad de las construcciones de CGI58 en la cepa BL21(DE3) y cepas derivadas	08
Optimización de la expresión de las proteínas recombinantes	10
Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a Níquel (IMAC), intercambio iónico y exclusión molecular	10
Ensayo de estabilidad térmica	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
Modelado por homología de CGI58 de humano	12
Análisis y optimización de las construcciones de CGI58	14
Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes de CGI58 en diferentes cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	15
Optimización de la expresión de las proteínas recombinantes de CGI58	16
Purificación de CGI58 por cromatografía de afinidad	17
Evaluación del detergente no iónico octil glucosido sobre la solubilidad de CGI58	17
Estabilidad térmica de mCGI58(His) ₁₂	19
CONCLUSIÓN	21
Agradecimientos	22
Referencias	22
Material Suplementario	37

Lista de tablas

Tabla I	Construcciones de CGI58 de humano y de ratón	34
Tabla II	Expresión y solubilidad de las construcciones de CGI58 en diferentes cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	35
Tabla III	T _m de mCGI58(His) ₁₂ en las diferentes condiciones evaluadas con el ensayo de estabilidad térmica	36

Lista de figuras

Figura 1	Modelo por homología de CGI-58 de humano	29
Figura 2	Expresión de las construcciones de CGI58 en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) codón plus-RIPL	30
Figura 3	Purificación de mCGI58(His) ₁₂ por afinidad	31
Figura 4	Ensayo de estabilidad térmica para la proteína mCGI58(His) ₁₂ en diferentes condiciones	32

Abreviaturas (por sus siglas en inglés)

ABHD	α/β Hydrolase Domain
ABHD5	α/β Hydrolase Domain-Containing Protein 5
ANS	1-Anilino-naphthalene-8-Sulfonic Acid
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
CDS	Chanarin Dorfman Syndrome
CGI58	Comparative Gene Identification 58
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonate
CV	Column Volumes
FA	Fatty Acids
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside
LD	Lipid Droplet
LPAAT	Lysophosphatidic Acid Acyltransferase
MGL	Monoacylglycerol Lipase
NLSD	Neutral Lipid Storage Disease
NLSDI	Neutral Lipid Storage Disease With Ichthyosis
OG	Octyl Glucoside
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PPS	Prescission Protease
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TG	Triacylglycerol
TM	Temperature Melting
WT	Wild Type

Resumen

“Expresión, purificación y caracterización de la enzima CGI58/ABHD5”

CGI58/ABHD5 es una enzima que participa en el metabolismo de lípidos como activador de la triglicérido lipasa del tejido adiposo (ATGL). Recientemente se ha descrito que CGI58 tiene actividad de lisofosfatidil aciltransferasa, por lo que se le ha relacionado con procesos de señalización en la producción de lípidos eicosanoides. A pesar de que CGI58 ha sido objeto de numerosos trabajos de investigación, a la fecha su estructura tridimensional no ha sido determinada. El objetivo central de este trabajo fue obtener una construcción de CGI58 que se exprese de forma soluble y a una concentración adecuada para iniciar experimentos de cristalización y así resolver su estructura tridimensional por difracción de rayos X. Aquí reportamos el modelo por homología de CGI58 de humano realizado con I-TASSER, el cual se usó para diseñar una construcción deletada de 50 residuos en el extremo N-terminal. Se generaron seis construcciones de CGI58, dos con la secuencia de ratón y cuatro con la de humano, que codifican para la enzima silvestre y una deletada. Cuatro de las seis construcciones han sido expresadas como proteínas recombinantes en *E. coli*, la purificación de las mismas ha sido estandarizada utilizando cromatografía de afinidad a níquel. Hemos determinado que el detergente octil glucosido, permite aumentar la concentración de proteína soluble aproximadamente diez veces. Finalmente, observamos que el uso de glicerol al 10%, magnesio 2mM y pH 7.5 tienen un impacto positivo en CGI58. Sin embargo, queda pendiente evaluar el uso de estos aditivos en el proceso de purificación.

PALABRAS CLAVE: CGI58, modelo por homología, purificación, proteínas, ensayo de desplazamiento térmico o Thermofluor

Abstract

“Expression, purification and characterization of CGI58/ABHD5 enzyme”

CGI58/ABHD5 is an enzyme that participates in the lipid metabolism as an activator of adipose triglyceride lipase (ATGL). Recently it has been reported that CGI58 has a lysophosphatidyl acyltransferase activity, so it has been associated with the “signaling processes” in the production of eicosanoid lipids. Although CGI58 has been the subject of several studies, the three-dimensional structure has not yet been determined. The main goal of this work was to generate a construct that expresses CGI58 in a soluble form and at suitable concentration to initiate crystallization experiments; this will allow us to solve its structure by X-ray crystallography in the near future. Here, we report a homology model of human CGI58 performed with I-TASSER, which was used to design a truncated protein of 50 residues at the N-terminus. Two constructs of mouse CGI58 were generated, comprising the wild type and the truncated enzymes. Two optimized DNA sequences for the human CGI58 were designed, for each one we have the corresponding construct that express the wild type and the truncated enzyme. So, six protein constructs were generated in this work. Four of the six constructs have been expressed as recombinant proteins in *E. coli*; all of them have been purified by nickel affinity chromatography. We found that the detergent octyl glucoside increases the soluble protein concentration about ten fold. Finally, we observed that the use of 10% glycerol, 2 mM magnesium and pH 7.5 had a positive impact on CGI58 thermal stability. However, the evaluation of these additives in the purification step has not been tested yet.

KEY WORDS: CGI58, homology model, purification, proteins, Thermal Shift Assay or Thermofluor

Expresión, purificación y caracterización de la enzima CGI58/ABHD5

Llamas-García M¹, Montero-Morán G², Lara-González S^{1*}

¹ IPICYT, Laboratorio de Biología estructural, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

² UASLP, Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

*Autor de correspondencia: Lara-González Samuel, Tel: 01(444)834200 ext 6239,
Correo electrónico: samuel.lara@ipicyt.edu.mx,

Titulo corto: Expresión y purificación de CGI58

Palabras clave: CGI58, modelo por homología, purificación, proteínas, ensayo de desplazamiento térmico o Thermofluor

Resumen

CGI58/ABHD5 es una enzima que participa en el metabolismo de lípidos como activador de la triglicérido lipasa del tejido adiposo (ATGL). Recientemente se ha descrito que CGI58 tiene actividad de lisofosfatidil aciltransferasa, por lo que se le ha relacionado con procesos de señalización en la producción de lípidos eicosanoides. A pesar de que CGI58 ha sido objeto de numerosos trabajos de investigación, a la fecha su estructura tridimensional no ha sido determinada. El objetivo central de este trabajo fue obtener una construcción de CGI58 que se exprese de forma soluble y a una concentración adecuada para iniciar experimentos de cristalización y así resolver su estructura tridimensional por difracción de rayos X. Aquí reportamos el modelo por homología de CGI58 de humano realizado con I-TASSER, el cual se usó para diseñar una construcción deletada de 50 residuos en el extremo N-terminal. Se generaron seis construcciones de CGI58, dos con la secuencia de ratón y cuatro con la de humano, que codifican para la enzima silvestre y una deletada. Cuatro de las seis construcciones han sido expresadas como proteínas recombinantes en *E. coli*, la purificación de las mismas ha sido estandarizada utilizando cromatografía de afinidad a níquel. Hemos determinado que el detergente octil glucosido, permite aumentar la concentración de proteína soluble aproximadamente diez veces. Finalmente, observamos que el uso de glicerol al 10%, magnesio 2mM y pH 7.5 tienen un impacto positivo en CGI58. Sin embargo, queda pendiente evaluar el uso de estos aditivos en el proceso de purificación.

INTRODUCCIÓN

El almacenamiento de triglicéridos (TG) representa una estrategia común en las células eucariotas como fuente de combustible para la producción de energía en caso de escasez de nutrientes. Durante periodos de incremento de la demanda de energía, los TG se someten a un proceso de hidrólisis denominado lipólisis, que resulta en la liberación de ácidos grasos (FA) y glicerol como sustratos de energía¹. La lipólisis se lleva a cabo mediante una cascada de reacciones hidrolíticas consecutivas catalizadas por diferentes enzimas, como la triglicérido lipasa del tejido adiposo (ATGL), la lipasa sensible a hormona (HSL) y la monoglicérido lipasa (MGL)². En 2006, un estudio reportó que la proteína CGI58 participa en el metabolismo de lípidos al activar a ATGL, una de las tres lipasas principales de la lipólisis³. En estados basales, CGI58 se encuentra en la superficie de la gota de grasa (LD) asociada a la proteína perilipina-1. Cuando el adipocito es estimulado por catecolaminas, se inicia la señalización por la cinasa PKA cuya activación promueve la disociación de CGI58 de perilipina1, ya que esta última se fosforila en 6 sitios⁴. Una vez que CGI58 se disocia de la gota de lípidos, esta se une a ATGL incrementando su actividad para hidrolizar TG. De forma paralela, con la activación de PKA, HSL se fosforila y se transporta del citoplasma a la gota de lípido, donde hidroliza los diglicéridos producidos por ATGL/CGI58. Finalmente, la MGL completa la reacción de lipólisis al hidrolizar los monoglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres⁵.

Actualmente se ha demostrado que CGI58 estimula la actividad de ATGL hasta 5 veces en humanos y 20 veces en ratones, por lo que se le ha propuesto como un punto de regulación de la lipólisis⁶. Además, un estudio reciente demostró que en

ausencia de CGI58, ATGL hidroliza selectivamente el TG en la posición sn-2, generando de este modo un ácido graso libre y un diacilglicerol sn-1,3. Esta selectividad se extiende a la posición sn-1 por la co-activación de CGI58, lo que resulta en la formación de diacilgliceroles sn-2,3 y sn-1,3. El mecanismo por el cual CGI58 modifica la selectividad de ATGL aún queda por esclarecer. Sin embargo, este proceso tiene un importante impacto fisiológico, debido que cuando la lipólisis es activada por hormonas, CGI58 co-activa ATGL ampliando su selectividad, lo que conduce a mayores tasas de lipólisis y liberación de FA para la producción de energía⁷.

CGI58 no solamente participa en la lipólisis, sino que tiene otras funciones en el metabolismo humano^{8,9,10,11}. Esto se concluyó debido a que mutaciones en el gen 3p21, el cual contiene 7 exones y codifica para CGI58, causan una rara enfermedad autosómica denominada “síndrome de Chanarin-Dorfman (CDS)”, también conocida como “enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros con ictiosis (NLSDI)”. Los individuos con esta enfermedad presentan piel escamosa y la acumulación intracelular de gotas de triglicéridos en leucocitos, epitelio gastrointestinal, médula ósea, fibroblastos, hígado y musculo estriado. Otras características clínicas variables incluyen esteatosis hepática, hepatoesplenomegalia, miopatía esquelética y cardíaca, cataratas con visión doble, retraso del crecimiento, ataxia, pérdida de audición neurosensorial bilateral, nistagmo horizontal y/o retraso mental¹². Pacientes con mutaciones de ATGL también desarrollan la enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros (NLSD), pero los síntomas clínicos difieren de los pacientes con NLSDI. Estas diferencias incluyen la ausencia de ictiosis en los pacientes que carecen de ATGL, esteatosis

hepática más leve y una acumulación de TG más pronunciada en el músculo esquelético y cardíaco. Estas diferencias fenotípicas, también se han observado en estudios realizados con modelos de ratones deficientes de ATGL y CGI58. Los ratones “knockout” para CGI58 nacen con un grave defecto de la epidermis, similar a la ictiosis humana, presentan retardo en el crecimiento y muerte postnatal dentro de las primeras 16 horas¹³. En el caso de los ratones “knockout” para ATGL, muestran un desarrollo normal de la piel, pero son afectados por una esteatosis cardíaca masiva y miocardiopatía que conduce a la muerte aproximadamente 12 semanas después del nacimiento¹⁴. Estas diferencias sugieren una función de CGI58 independiente de ATGL en la piel y posiblemente en otros tejidos¹⁵. Una de esas funciones alternativas fue presentada recientemente en dos estudios independientes que muestran que CGI58 es una enzima con actividad de lisofosfatidil aciltransferasa (LPAAT) dependiente de acil-CoA^{9,16}. El papel de la actividad de LPAAT de CGI58 *in vivo* permanece desconocido. Sin embargo, se especula que esta actividad participa en la biosíntesis local (posiblemente asociado a la gota de lípido) de ácido fosfatídico que controla procesos de señalización. Otras teorías sugieren que la actividad LPAAT de CGI58 podría estar involucrada en la movilización de ácidos grasos libres, evitando que se acumulen e inhiban a ATGL por acumulación por producto o que CGI58 juega un papel en la producción de lípidos de señalización del tipo eicosanoides debido a su selectividad para araquidonoil-CoA^{16,17}.

Con el objetivo de conocer como CGI58 lleva a cabo sus funciones, el propósito de este proyecto fue obtener una construcción de CGI58 que se exprese de forma soluble y a una concentración adecuada para iniciar experimentos de cristalización,

para posteriormente resolver su estructura tridimensional por difracción de rayos X. En este trabajo, se realizó un modelo por homología de CGI58 de humano, se estandarizó el proceso de expresión de CGI58 de humano y ratón en el sistema de expresión de *E. coli* y su purificación por la técnica de cromatografía de afinidad. Se determinó que el uso de detergentes puede aumentar la concentración de proteína soluble y se estandarizó la técnica de Thermofluor, para optimizar el amortiguador de la proteína y así poder mantenerla de manera estable en solución, lo cual nos permitirá en un futuro obtener cristales y resolver la estructura terciaria experimental de la proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa fueron compradas a New England BioLabs (Ipswich, MA, USA), las células competentes BL21 (DE3) codon plus-R IPL son de Stratagene (La Jolla, CA, USA), los amortiguadores MOPS y MES y la lisozima son productos de USB (Cleveland, USA), los antibióticos, inhibidor de proteasas PMSF y octil-glucosido (OG) son de Gold Biotechnology Inc (St. Louis, MO, USA). Los demás reactivos son de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Modelado estructural de CGI58

La estructura tridimensional de CGI58 de humano fue generada usando el servidor I-TASSER¹⁸ utilizando la opción automática. Los templados que tomo el servidor para construir el modelo fueron las siguientes estructuras del PDB: 4opmA (lipasa putativa), 4i3fA (serina hidrolasa), 1ehyA (epóxido hidrolasa), 1c4xA (2-hidroxi-6-

oxo-6-fenil hexa-2-4-dienoato hidrolasa), 4lxiA (hidrolasa de C-C), 4ccyA (carboxil esterasa) y 2vf2A (hidrolasa de esteroides). El modelo resultante se manipulo con Chimera 1.7¹⁹.

Clonación del cDNA de CGI58 de humano y ratón en el vector de expresión pET28(PPS)

Clonación del cDNA de CGI58 de humano (Homo sapiens) y construcción de la enzima truncada hCGI58_Δ50. La secuencia de cDNA de CGI58 de humano (hCGI58_WT), optimizado y clonado en el vector pGOv4 (pGOv4_hCGI58_WT), fue sintetizado por la empresa GeneOracle. El vector de expresión que se seleccionó para subclonar y expresar al gen de CGI58 es un pET28 modificado [pET28(PPS)], en el cual el sitio de corte correspondiente a la trombina, fue sustituido por el correspondiente para la proteasa PreScission. pGOv4_hCGI58_WT fue digerido con las enzimas *HindIII* y *NdeI* y subclonada en el vector pET28(PPS) usando la T4 DNA ligase, obteniendo la construcción pET28(PPS)_hCGI58_WT. La construcción de la enzima truncada (hCGI58_Δ50) se realizó a partir de la construcción pET28(PPS)_hCGI58_WT, amplificando el segmento que codifica para los residuos 51-349 con los siguientes oligonucleótidos: Forward 5' GTAATTCCATATGAAAAAAGAACCAGTTCGGATTT C y Reverse 5' CGCGGATCC AAGCTTTCAATCGACAG utilizando la Platinum Pfx DNA Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Este procedimiento permitió generar una delección de 150 nucleótidos que corresponden a los primeros 50 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína. El producto de PCR fue purificado, digerido con las enzimas *HindIII* y *NdeI* y subclonado en el

vector de expresión pET28(PPS) utilizando la T4 DNA ligase, con lo que generamos nuestro vector de expresión pET28(PPS)_hCGI58_Δ50.

Clonación del cDNA de CGI58 de ratón (Mus musculus) y construcción de la enzima silvestre mCGI58_WT. El cDNA de CGI58 de ratón se obtuvo a partir de la construcción utilizada en trabajos anteriores¹⁶, denominada pET28_mCGI58(His)₁₂ la cual codifica para una proteína de 348 residuos de aminoácidos, la cual carece de los tres primeros residuos del extremo N-Terminal (Met, Lys y Ala). A partir de la construcción pET28_mCGI58(His)₁₂ se hizo la construcción de la proteína silvestre mCGI58_WT por PCR, amplificando con la Platinum Pfx DNA Polimerasa y se usaron los oligos Forward 5' AAACATATGAAAGCGATGGCGGC GGAGGA y Reverse 5' TTTGGATCCAAGCTTTCAGTCTACTGTGTGG. Este procedimiento nos permitió obtener la proteína silvestre de 351 residuos de aminoácidos. El producto de PCR se purificó, digirió con *Hind*III y *Nde*I y se subclonó en el vector de expresión pET28(PPS) utilizando la T4 DNA ligase, a esta construcción se le nombró como pET28(PPS)_mCGI58_WT. Todas las construcciones fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando los oligos externos T7. Las construcciones utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla I.

Evaluación de la expresión y solubilidad de las construcciones de CGI58 en la cepa BL21(DE3) y cepas derivadas

Diferentes cepas de expresión fueron probadas con las construcciones enlistadas en la Tabla I. Las cepas evaluadas fueron: BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) Star con

GroEL/GroES, Rosetta II Star (DE3), Rosetta gami (DE3) y BL21 (DE3) codón plus-RIPL. Las cepas fueron transformadas con las diferentes construcciones por choque térmico y plaqueadas en medio LB con Kanamicina (50 µg/mL) más los antibióticos a los que son resistentes cada cepa (Tabla II). Se seleccionaron colonias individuales para crecer un preinoculo de 10 mL en medio LB líquido con antibióticos y se incubó a 37 °C por 12 h a 190 rpm. El preinoculo se utilizó para inocular medio LB fresco (100 mL) haciendo una dilución 1:50 y se incubó hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0.6-0.8. Una vez alcanzada la DO_{600} se indujo la producción de proteína con IPTG 1 mM y se incubó a 37 °C durante 4 h a 190 rpm. El cultivo celular se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para evaluar la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes, el pellet celular se resuspendió en amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, PMSF 1 mM, lisozima 50 µg/mL, pH 8.0) y las bacterias se lisaron por sonicación (5 ciclos 15s ON/45s OFF a 30, 35, 40 y 45% amp). Se tomaron dos alícuotas de 50 µL para evaluar la expresión y concentración de proteína total mediante geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y el método de Bradford. La solubilidad se evaluó centrifugando el lisado celular a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se guardaron fracciones del sobrenadante y del pellet para ser analizados por electroforesis SDS-PAGE y se evaluó su concentración por el método de Bradford. Las muestras para electroforesis fueron mezcladas con amortiguador de muestra (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 23%, mercaptoetanol 0.64 M y azul de bromofenol 0.022%), se calentaron

a 95 °C por 10 min y se corrieron en geles SDS-PAGE al 12%, los cuales se tiñeron con coomassie R-250.

Optimización de la expresión de las proteínas recombinantes

Para optimizar la expresión de las proteínas recombinantes, se exploraron condiciones como: temperatura, concentración de IPTG y tiempo de incubación. Las células BL21 (DE3) codón plus-RIPL fueron transformadas con las construcciones que se enlistan en la Tabla I por choque térmico. Los cultivos se prepararon como se describió en la sección anterior, con la diferencia que al momento de alcanzar la DO_{600nm} de 0.6-0.8 se evaluaron diferentes concentraciones de IPTG (0.2, 0.5 y 1 mM), temperatura (18, 28 y 37 °C) y tiempo de incubación (4, 5, 6 y 8 h). Los cultivos celulares fueron centrifugados a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C, se resuspendieron en amortiguador de lisis y se tomaron 50 μ L de muestra para la cuantificación de proteína total con el método de Bradford y 50 μ L para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE.

Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a Níquel (IMAC), intercambio iónico y exclusión molecular

El pellet celular obtenido a partir de 500 mL de cultivo de células BL21 (DE3) codón plus-RIPL, transformadas con las diferentes construcciones de la Tabla I, fue resuspendido en 50 mL de “amortiguador de lisis”, sonicado durante 5 ciclos a diferentes amplitudes (15s ON/45s OFF a 30, 35, 40 y 45% amp) y centrifugado a 12,000 rpm/10 min/4 °C. El sobrenadante del extracto celular (aproximadamente

50 mL) se transfirió a la columna de agarosa Ni-NTA de Qiagen para purificar las proteínas por afinidad a níquel. El lavado de la inyección se hizo con 3 volúmenes de columna (CV) del amortiguador de unión (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM de imidazol, pH 8.0), la elución se realizó con un gradiente escalonado de imidazol de 50, 100, 250 y 500 mM preparado en el amortiguador de unión. Las fracciones eluidas fueron colectadas, se les midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford y se verificaron por SDS-PAGE. Las fracciones donde eluyó la proteína recombinante fueron concentradas por microfiltración en un amicon Ultra-15 con membrana de retención de 10 kDa (Millipore) y desaladas por filtración en gel con una columna PD-10 (GE HealthCare) para dejarla en el amortiguador I que contiene 20 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl. Este proceso de purificación por afinidad a Níquel también se realizó en presencia del detergente Octil glucosido a una concentración de 1% en el amortiguador de lisis y 0.1% en el amortiguador de unión.

Ensayo de estabilidad térmica

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron con la técnica “ensayo de desplazamiento térmico” (Thermal Shift Assay) también conocida como Thermofluor. El experimento se realizó en una placa de PCR de 96 pozos y se utilizó una máquina de RT-PCR 7500 Fast (Applied Biosystems)²⁰. En un volumen final de 40 μ L la proteína a una concentración final de 0.05 mg/mL fue incubada en presencia de SYPRO ORANGE (Invitrogen) a una concentración final de 5X y con las condiciones a evaluar. El control del tiempo/temperatura de la máquina de PCR fue programado en 70 ciclos, con un incremento de 1 $^{\circ}$ C en un rango de 25 a

95 °C y 30 s de incubación por ciclo. La fluorescencia emitida fue capturada en cada ciclo y fue graficada en Excel. Para obtener la T_m , los datos de la curva fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann²¹ con el complemento Solver de Excel. Las condiciones evaluadas fueron diferentes amortiguadores, pH y aditivos que se muestran en la Tabla III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelado por homología de CGI58 de humano

La proteína CGI58 de humano y ratón, comparten un 95% de identidad en secuencia y consisten de 349 y 351 residuos de aminoácidos, respectivamente. A la fecha, no existe información estructural experimental para CGI58, únicamente se han hecho modelos por homología de CGI58 de ratón^{17,22,23}.

Estos modelos sugieren que CGI58 de ratón es una proteína que pertenece a la familia de las alfa beta hidrolasas, la cual se caracteriza por tener un plegamiento canónico de 8 hebras- β paralelas (con la segunda hoja que inicia de forma antiparalela) rodeadas por hélices α y *loops* que conectan las hojas^{24,25}. Nuestro modelo de CGI58 de humano generado por homología (Figura 1) sugiere que CGI58 de humano también contiene el dominio α/β hidrolasa (ABHD) entre los aminoácidos 53 y 347. La superfamilia con el plegamiento α/β hidrolasa incluye proteasas, lipasas, esterases, dehalogenasas, peroxidasas, epóxido hidrolasas, entre otras. CGI58 pertenece a la subfamilia esterasa/tioesterasa/lipasa (por lo que también se le conoce como ABHD5). Estas enzimas tienen una triada catalítica de Asp, His y Ser con el motivo canónico conservado GXSXG. Sin

embargo, en las ABHD5 el aminoácido Serina se encuentra sustituido por Asparagina (Figura 1), lo que resulta en la pérdida de la actividad hidrolítica intrínseca y elimina la posibilidad de que funcione como lipasa²³.

El modelo por homología de CGI58 de ratón²², muestra que el núcleo de la proteína que comprende el dominio ABHD comienza en la Val⁴⁸ y termina en la Val³⁵⁰. Esta región de 303 aminoácidos, tiene un 96% de identidad con la secuencia humana y en el modelo por homología de CGI58 de humano generado por I-TASSER, se observa que el sándwich comienza en la Val⁴⁶ y termina en la Val³⁴⁸. También generamos un modelo por homología para CGI58 de ratón bajo las mismas condiciones descritas en la metodología. Con la herramienta de MatchMaker de Chimera 1.7, se comparó el modelo de ratón con el modelo de humano, donde el alineamiento estructural dio una desviación media cuadrática conocida como RMSD de 0.488 Å, lo que nos indica que hay gran similitud entre los dos modelos.

En la Figura 1 podemos observar que la región del extremo N-terminal hasta la Thr³⁰ no presentan una estructura secundaria definida y aparenta ser una sección móvil de la proteína. Esta región contiene tres Trp (19, 23 y 27) al igual que la proteína de ratón, los cuales se han demostrado juegan un papel importante en la unión de proteínas a membranas debido a que pueden formar enlaces de hidrógeno con la cabeza del grupo lipídico, mientras su anillo hidrofóbico está inmerso en la parte hidrofóbica de la cadena lipídica²². Mutaciones en los triptófanos del extremo N-terminal de CGI58 de ratón, señalan que son importantes para la localización de la proteína en las gotas lipídicas así como para

la activación de ATGL, pero no afectan la actividad de aciltransferasa de CGI58^{17,22,26}.

A partir del modelo por homología de CGI58 de humano se diseñó una proteína truncada que carece de 50 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal (residuos del 1-50), la cual como se discutió anteriormente, es probable que no tenga una estructura secundaria definida. En la Figura 1, se señala la región deletada donde se observa que esta construcción no altera elementos de estructura secundaria como hélices alfa ni hojas beta y de acuerdo con trabajos previos, se ha reportado que la región deletada no interfiere con su actividad enzimática, sin embargo si afecta la unión a la gota lipídica, la interacción con perilipina y la activación de ATGL^{17,22,26}.

Análisis y optimización de las construcciones de CGI58

La expresión de CGI58 ya ha sido reportada en trabajos anteriores. En el caso de CGI58 de humano, se ha optimizado su secuencia para expresarla en la cepa BL21⁹. Para CGI58 de ratón que ha sido la más estudiada, algunos autores la han expresado en *E. coli* BL21 (DE3)¹⁶ y *S. cerevisiae* BY4742³. En nuestro caso, las secuencias codificantes fueron analizadas con el servidor RaCC, que es un servidor que analiza la presencia de codones poco frecuentes para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>). Ambas secuencias codificantes presentan los codones de baja frecuencia AGA, AGG, CGA, ATA, CCC y CTA, lo que disminuye la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* (Tabla S1)²⁷. La estrategia que seguimos para expresar a CGI58 como enzima recombinante fue la siguiente: dado que la construcción de

ratón es la misma que se ha expresado anteriormente en *E. coli*, esta secuencia fue usada sin ser modificada. En el caso de CGI58 de humano, la secuencia se adquirió optimizada para su expresión en *E. coli* por la compañía GeneOracle [pET28(PPS)_hCGI58_WT]. Sin embargo, las primeras pruebas de expresión de CGI58 de humano mostraron resultados negativos en las cepas BL21, por lo que decidimos optimizar manualmente el cDNA de la proteína de humano cambiando los codones de baja frecuencia (Tabla S1) por los codones más utilizados por *E. coli*, de acuerdo a tablas de uso de codones²⁷. La nueva secuencia fue adquirida como gen sintético de la empresa GeneOracle y está en proceso de subclonación en el vector de expresión pET28(PPS).

Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes de CGI58 en diferentes cepas de *E. coli* BL21 (DE3)

En la Tabla II se muestran los resultados de la expresión y solubilidad de las diferentes construcciones de CGI58 en diversas cepas de expresión de *E. coli*. Nosotros encontramos que los niveles de expresión de las proteínas recombinantes de CGI58 son muy bajos en cepas convencionales de *E. coli* BL21(DE3). Esto muy probablemente se debe a que CGI58 es una proteína de origen eucarionte y contiene en su secuencia de cDNA una serie de codones de uso poco frecuente por *E. coli* (Tabla S1). Sin embargo, mCGI58(His)₁₂ se logró expresar soluble en la cepa BL21 Star, aunque en baja concentración. La proteína hCGI58_Δ50, que tiene menor número de codones de baja frecuencia, presentó una buena expresión en la cepa BL21 Star, sin embargo esta proteína no es soluble. Una estrategia que utilizamos para solucionar este problema, fue usar una

cepa que expresa a las chaperonas GroEL/GroES. De esta forma, se pudo obtener una fracción soluble de hCGI58_Δ50, no obstante, experimentos de purificación posteriores demostraron que hCGI58_Δ50 tiene una fuerte interacción con la chaperona GroEL, purificándose como complejo por lo que decidimos no utilizar esta cepa. Finalmente, los mejores resultados de expresión de las proteínas recombinantes se lograron con la cepa BL21 (DE3) codón-Plus-RIPL que contiene dos plásmidos con los genes de los tRNA para argU (AGA, AGG), ileY (AUA) , proL (CCC), leuW (CUA). En la Figura 2 se muestra en gel de expresión con las células transformadas con las cuatro construcciones, donde podemos observar que las proteínas recombinantes de CGI58 se expresan aun cuando no están optimizadas.

Optimización de la expresión de las proteínas recombinantes de CGI58

En la optimización de la expresión de CGI58 utilizando la cepa BL21 (DE3) codón plus-RIPL, se observó que las proteínas de recombinantes se expresan desde la concentración de 0.2 mM de IPTG, con una mayor expresión a la temperatura de 37 °C. Al evaluar el tiempo de incubación, se pudo observar que la expresión de la proteína de interés se mantiene constante a las 4, 5, 6 y 8 h de incubación a 37 °C. Con base en estos resultados, seleccionamos como condiciones de expresión para las proteínas recombinantes mCGI58(His)₁₂, mCGI58_WT, hCGI58_WT y hCGI58_Δ50 en la cepa BL21 (DE3) codón plus-RIPL, 0.2 mM de IPTG y 4 h de incubación a 37 °C.

Purificación de CGI58 por cromatografía de afinidad

En la purificación de las proteínas recombinantes de CGI58, se utilizó la cromatografía de afinidad a Ni. Los resultados observados para la proteína mCGI58(His)₁₂, muestran que esta proteína empieza a eluir a concentraciones de 100 mM de imidazol, sin embargo, en la primera fracción de la elución con 250 mM de imidazol es donde se obtiene la mayor concentración de proteína. De acuerdo a los ensayos de determinación de proteína con el método de Bradford, la concentración de proteína en la fracción 1 de 250 mM de imidazol es de 0.05 mg/mL. Sin embargo, esta concentración de proteína es insuficiente para los ensayos de cristalización, además, al concentrar por microfiltración la proteína comienza a agregarse. Esto posiblemente se deba a las características del extremo N-terminal de la proteína, que tiene residuos de aminoácidos hidrofóbicos que le permiten unirse a la gota de lípidos, por lo que decidimos evaluar dos estrategias, la primera es utilizar detergentes y la segunda es explorar diversas condiciones que nos permitan estabilizar la proteína mediante Thermofluor.

Evaluación del detergente no iónico octil glucosido sobre la solubilidad de CGI58

Se ha demostrado que los detergentes pueden tener un papel importante en los procesos de solubilidad, purificación y cristalización de proteínas²⁸. Para elegir el detergente adecuado y determinar cuáles eran los detergentes más usados en la cristalización de proteínas, hicimos una búsqueda en la base de datos de estructuras cristalográficas de proteínas (RCSB Protein Data Bank). En la Tabla S2 se enlistan los detergentes más comunes con sus frecuencias en el pdb y

algunas de sus características. Los detergentes OG y CHAPS tienen mayor número de entradas en el pdb, así como la ventaja de que son detergentes dializables que no interfieren en la etapa de purificación, ni tampoco en la determinación de proteína por el método de Bradford. Por lo tanto se decidió adquirir estos detergentes y probar primero el OG en el proceso de purificación descrito, ya que es el más usado en cristalización de proteínas.

De acuerdo con trabajos previos, la concentración de OG que se usó para el amortiguador de lisis fue del 1%, esa misma concentración se usó para unir la proteína mCGI58(His)₁₂ a la resina de Níquel, mientras que para la elución se usó una concentración de 0.1%²⁹. La concentración total de proteína observada en el sobrenadante del extracto celular posterior al sonicado, usando células BL21 (DE3) codón plus-RIPL con 1% de OG, fue de 85.3 mg/L que es mayor a los 62 mg/L obtenidos sin el detergente. La proteína mCGI58(His)₁₂ comenzó a eluir en la fracción de 100 mM de imidazol (Figura 3), pero se obtuvo la mayor concentración en la primera fracción de 250 mM de imidazol con 0.302 mg/mL que es seis veces más que la obtenida sin el detergente (0.05 mg/mL).

Las fracciones resultantes de IMAC donde eluyó la proteína mCGI58(His)₁₂, fueron concentradas en un amicon Ultra-15 con membrana de retención de 10 kDa (Millipore) hasta una concentración de 0.431 mg/mL, una concentración aproximadamente 10 veces mayor a los resultados obtenidos en ausencia del OG. Sin embargo, esta concentración es insuficiente para realizar experimentos de cristalización, por lo que decidimos explorar el uso de aditivos, pH, iones y diferentes amortiguadores para evaluar su efecto sobre la estabilidad térmica de la proteína, como se detalla a continuación.

Estabilidad térmica de mCGI58(His)₁₂

La espectrometría de fluorescencia es un método altamente sensible que puede utilizarse para el análisis de agregación de proteínas. Uno de los reactivos fluorescentes extrínsecos más usados es el ácido 8-anilino-Naftaleno Sulfónico (ANS)³⁰, que se une a las zonas hidrofóbicas de la proteína y conforme esta se despliega por efecto de la temperatura, la fluorescencia del ANS incrementa³¹. Sin embargo la longitud de excitación del ANS es de 350 nm y su longitud de emisión es de 492 nm³²). En cambio el reactivo SYPRO ORANGE, que tiene el mismo comportamiento descrito para el ANS, tiene una longitud de excitación cercana a 500 nm y una de emisión de 610 nm, por lo que se puede emplear un equipo de PCR de tiempo real convencional. Debido a esta cualidad, en los últimos años el SYPRO ORANGE ha sido ampliamente usado para los ensayos de estabilidad térmica.

Para este experimento, también conocido como Thermofluor, no se requiere ningún conocimiento previo de las propiedades de la proteína de interés³³, este ensayo nos permite conocer la temperatura de desnaturalización en el punto medio de la transición térmica (T_m) de la proteína en diferentes condiciones de pH, concentración de sal, iones, aditivos, etc. En nuestro caso, primero estandarizamos la concentración de SYPRO ORANGE con respecto a la concentración de proteína en un experimento control. Los resultados mostraron que para una concentración de proteína de 0.05 mg/mL la mejor concentración de SYPRO ORANGE es 5X, lo cual concuerda con datos publicados por otros grupos³⁴, por lo que esta concentración fue la empleada para los ensayos posteriores.

Con el objetivo de optimizar el amortiguador que utilizamos durante la purificación y caracterización de la proteína mCGI58(His)₁₂ se evaluaron diferentes condiciones y aditivos como se muestra en la Tabla III por Thermofluor. La primera condición evaluada fue el pH, en la que utilizamos diferentes amortiguadores en un rango de 5.5 a 9.0. La proteína mCGI58(His)₁₂ es menos estable a pH de 5.5 (Figura 4A) al tener el valor de Tm menor de 51.01 (Tabla III), en cambio con el amortiguador HEPES pH 7.5 la Tm de la proteína aumenta a 56.5.

Se ha mostrado que los iones metales juegan un papel importante en la estabilización de proteínas por unirse a sitios específicos³⁵. Los resultados para la condición de metales nos sugieren que la proteína requiere de la presencia de iones metales para estabilizarse, debido a que en la presencia de EDTA (Figura 4B), el cual es un agente quelante, la Tm de mCGI58(His)₁₂ disminuye a 44.82 y cuando esta en presencia del ion Mg⁺ esta aumenta a 49.34, sin embargo, en presencia de MgCl₂ la Tm es menor (Tabla III). No existen evidencias bibliográficas en las que se demuestre que las proteínas alfa/beta hidrolasas requieren metales para su actividad³⁶. No obstante, un estudio reciente en la actividad lactonasa de la proteína AidH, reportó que el Mn₂ induce un cambio conformacional que influye la actividad enzimática, inclusive aunque los programas bioinformáticos no revelaron ningún sitio potencial de unión a metales³⁷. Finalmente, el glicerol ha sido empleado como un agente estabilizador para la cristalización de proteínas, incluso proteínas de membrana³⁸. En el experimento de Thermofluor se evaluaron 3 concentraciones de glicerol (Figura 4C), dando como resultado que la proteína mCGI58(His)₁₂ en presencia de glicerol al 10% aumenta su estabilidad hasta en 5°C. Este cambio en la estabilidad es mayor

comparado con las otras dos concentraciones que se evaluaron. Pretendemos extender este análisis para incluir otras condiciones como agentes reductores, concentración de sal, concentración de detergentes, entre otros, para obtener el amortiguador óptimo que permita estabilizar nuestra proteína de manera soluble y a mayor concentración. Hasta el momento, con los resultados de Thermofluor sabemos que la composición de nuestro amortiguador durante la purificación, debe incluir HEPES a pH 7.5, glicerol al 10% y metales como Mg^{+} .

CONCLUSIONES

En conclusión, generamos un modelo por homología de CGI58 de humano, en el que se observa que esta proteína tiene una similitud estructural elevada con la de ratón, basándose en el RMSD de la superposición de los modelos que fue de 0.488 Å. A partir de este modelo, diseñamos la proteína truncada con la delección de los primeros 50 aminoácidos del extremo N-terminal. Además, hemos diseñado seis construcciones de CGI58, de las cuales cuatro han sido transformadas en cepas de *E. coli* y pueden ser expresadas por las células BL21 (DE3) codón plus-RIPL con una concentración de 0.2 mM de IPTG a 37°C por 4 h. También estandarizamos el proceso de purificación por cromatografía de afinidad a níquel, donde CGI58 eluye de la columna con una concentración de 250 mM de Imidazol. Se evaluó el efecto del detergente OG en el rendimiento de la purificación donde se logró obtener un rendimiento total de 6.657 mg/L de la proteína mCGI58(His)₁₂ y una concentración en solución diez veces mayor que la obtenida sin el detergente. Asimismo, se evaluó el efecto de diferentes condiciones y aditivos en la estabilidad térmica de CGI58 con el ensayo Thermofluor, en el que se observa

que el glicerol, iones magnesio y el pH tienen un impacto positivo en la estabilidad térmica de la proteína, sin embargo aún queda pendiente evaluar su efecto durante la purificación de CGI58.

Agradecimientos

Queremos agradecer al laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular del IPICYT por el apoyo técnico. A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa (IPICYT) y al Dr. Roberto Sánchez Olea (UASLP) por revisar el manuscrito de la tesis.

Referencias

1. Yamagushi T. Crucial Role of CGI-58/ α/β Hydrolase Domain-Containing Protein 5 in Lipid Metabolism. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2010;33(3) 342-345
2. Cornaciu I, Boeszoermenyi A, Lindermuth H, Nagy HM, Cerk IK, Ebner C, Salzburger B, Gruber A, Schweiger M, Zechner R, Lass A, Zimmermann R y Oberer M. 2011. The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and G0S2, respectively. *Plos One* 2011;6(19):E26349
3. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G y Zechner R. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism* 2006;3:309-319

4. Miyoshi H, Souza SC, Zhang H, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco AC, Obin MS y Greenberg AS. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and –independent mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281(23):15837-1844
5. Greenberg AS, Kraemer FB, Soni KG, Jedrychowski MP, Yan QW, Graham CE, Bowman TA y Mansur A. Lipid droplet meets a mitochondrial protein to regulate adipocyte lipolysis. *The EMBO Journal* 2011;30:4337-4339
6. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R y Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research* 2009;50:3-21
7. Eichmann TO, Kumari M, Haas JT, Farese RV, Zimmermann R, Lass A y Zechner R. Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry* 2012;287(49):41446-41457
8. Akiyama M, Sawamura D, Nomura Y, Sugawara M y Shimizu H. Truncation of CGI-58 protein causes malformation of lamellar granules resulting in Ichthyosis in Dorfman-Chanarin Syndrome. *The Journal of Investigative Dermatology* 2003;121(5):1029-1034
9. Gosh AK, Ramakrishnan G, Chandramohan C y Rajasekharan R. CGI-58, the causative gene for Chanarin-Dorfman Syndrome, mediates acylation of lysophosphatidic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 2008;283(36):24525-24533

10. Brown JM, Betters JL, Lord C, Ma Y, Han X, Yang K, Alger HM, Melchior J, Sawyer J, Shah R, Wilson MD, Liu X, Graham MJ, Lee R, Crooke R, Shulman GI, Xue B, Shi H y Yu L. CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance. *Journal Lipid Research* 2010;51:3306-3315
11. Lord CC, Betters JL, Ivanova PT, Milne SB, Myers DS, Madenspacher J, Thomas G, Chung S y col. CGI-58/ABHD5-Derived signaling lipids regulate systemic inflammation and insulin action. *Diabetes* 2012;61:355-363
12. Lefèvre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, Heilig R, Lakhdar H, Wollenber A, Verret JC, Weissenbach J, Özgüc M, Lathrop M, Prud'homme JF y Fischer J. Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 2001;69:1002-1012
13. Radner FPW, Streith IE, Schoiswohl G, Schweiger M, Kumari M, Eichmann TO, Rechberger G, Koefeler HC, Eder S, Schauer S, Theussl HC, Preiss-Landl K, Lass A, Zimmermann R, Hoefler G, Zechner R y Haemmerle G. Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking Comparative Gene Identification-58 (CGI-58). *The Journal of Biological Chemistry* 2010;285(10):7300-7311
14. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 2006;312:734–737.

15. Zierler KA, Zechner R y Haemmerle G. Comparative gene identification-58/ α/β hydrolase domain 5: more than just an adipose triglyceride lipase activator?. *Current Opinion in Lipidology* 2014;25(2):102-109
16. Montero-Moran G, Caviglia JM, McMahon D, Rothenber A, Subramanian V, Xu Z, Lara-Gonzalez S, Storch J, Carman GM y Brasaemle DL. CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Journal of Lipid Research* 2010;51:709-719
17. Oberer M, Boeszoermyeni A, Nagy HM y Zechner R. Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58. *Current Opinion in Lipidology* 2011;22:149-158
18. Yang Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 2008;9:40-48
19. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004;25(13):1605-1612.
20. Malawski GA, Hillig RC, Monteclaro F, Eberspaecher U, Schmitz AAP, Crusius K, Huber M, Egner U, Donner P y Müller-Tiemann B. Identifying protein construct variants with increased crystallization propensity. A case study. *Protein Science* 2006;15:2718-2728
21. Ericsson UB, Hallberg BM, DeTitta GT, Dekker N y Nordlund P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry* 2006;357:289-298

22. Gruber A, Cornaciu I, Lass A, Schweiger M, Poeschl M, Eder C, Kumari M, Schoiswohl G, Wolinski H, Kohlwein SD, Zechner R, Zimmermann R y Oberer M. The N-terminal region of Comparative Gene Identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase. *The Journal of Biological Chemistry* 2010;285(16):12289-12298
23. Lass A, Zimmermann R, Oberer M y Zechner R. Lipolysis-A highly multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research* 2011;50:14-27
24. Nardini M y Dijkstra BW. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* 1999;9:732-737
25. Lord CC, Thomas Gwynneth y Brown JM. Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1831:792-802
26. Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S y Osumi T. CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279(29):30490-30497
27. Assadi-Porter FM, Patry S y Markley JL. Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in *E. coli*. *Protein, Expression y Purification* 2008;58:263-268
28. Moraes I, Evans G, Sanchez-Weatherby J, Newstead S y Stewart PDS. Membrane protein structure determination. The next generation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014;1838:78-87

29. Kumar A, Böhler S, Selisko B, Davidson A, Mulder K, Canard B, Miller S y Bartenschlager R. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling. *Journal of Virology* 2013;87(8):4545-4557
30. Hawe A, Sutter M y Jiskoot W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical Research* 2008;25(7):1487-1499
31. Phillips K y Hernandez de la Peña A. The combined use of the thermofluor assay and thermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. *Current Protocols in Molecular Biology* 2011:10.28.1-10.28.15
32. Niesen FH, Berglund H y Vedadi M. The use of differential scanning fluorometry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2007;2(9):2212-2221
33. Reinhard L, Mayerhofer H, Geerlof A, Mueller-Dieckmann J y Weiss MS. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Crystallographica* 2013;F69:209-214
34. Boivin S, Kozak S y Meijers R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expression and Purification* 2013;91:192-206
35. Pantoliano MW, Whitlow M, Wood JF, Rollence ML, Finzel BC, Gilliland GL, Poulos TL y Bryan PN. The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. *Biochemistry* 1988;27:8311-8317
36. Holmquist M. Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and

- mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2000;1:209–235
37. Mei GY, Yan XX, Turak A, Lou ZQ y Zhang LQ. AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. Strain, is a novel N-Acylhomoserine lactonase. *Applied and Environmental Microbiology* 2010;76(15):4933-4942
38. Sousa R. Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallographica* 1995;D51:271-277

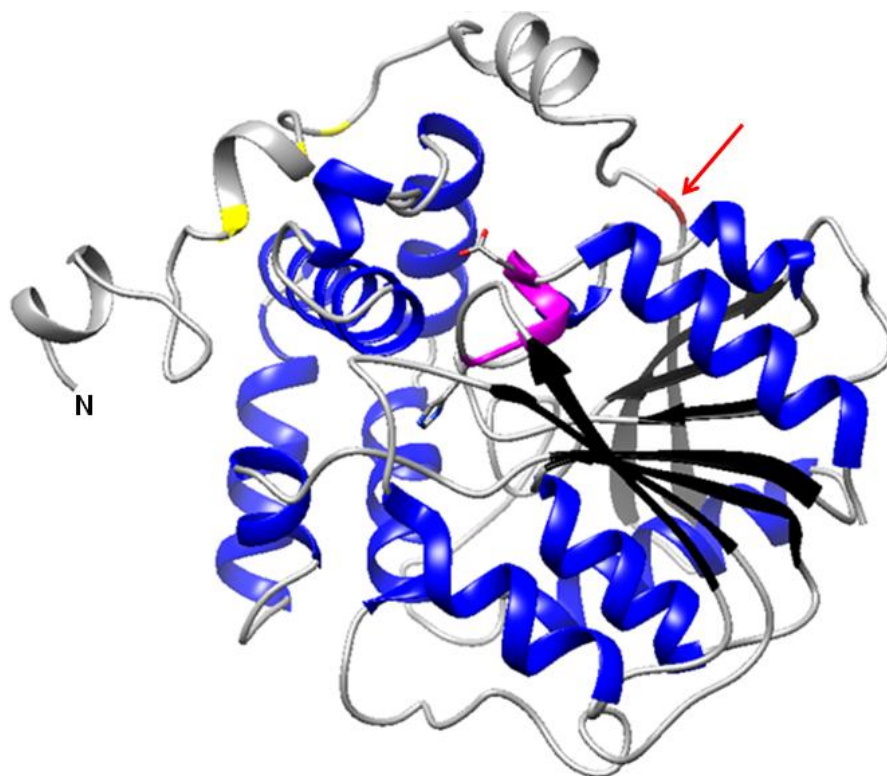


Fig. 1. Modelo por homología de CGI-58 de humano

Modelo 3D de hCGI-58 construido con I-TASSER. Se tomaron como “templado” las siguientes estructuras descritas en el pdb: 4opmA, 4i3fA, 1ehyA, 1c4xA, 4lxiA, 4ccyA y 2vf2. El dominio α/β hidrolasa está representado en colores negro y azul. La flecha roja indica el inicio de la proteína truncada hCGI-58 Δ 50, los triptófanos de unión a lípidos en el amino terminal se muestran de color amarillo y el motivo HX4D que le confiere actividad enzimática se muestra en color magenta.

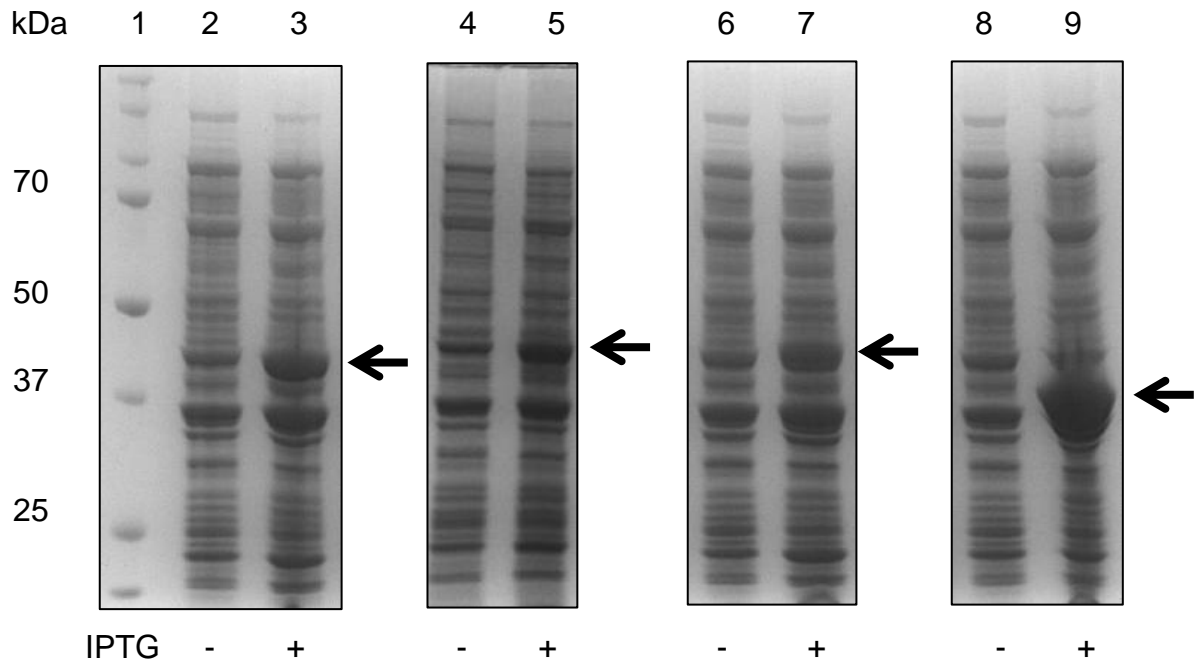


Fig. 2. Expresión de las construcciones de CGI58 en *E. coli* BL21 (DE3)

codón plus-RIPL

Gel SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. Células BL21 (DE3) codón plus-RIPL transformadas con las construcciones de CGI58. El signo (-) indica el tiempo sin inducir y el signo (+) el tiempo inducido con IPTG. Carril 1: Marcador de peso molecular BioRad Precision Plus. Carril 2 y 3: mCGI58_WT. Carril 4 y 5: mCGI58(His)₁₂. Carril 6 y 7: hCGI58_WT. Carril 8 y 9: hCGI58_Δ50. La flecha señala la banda correspondiente a expresión de las proteínas recombinantes.

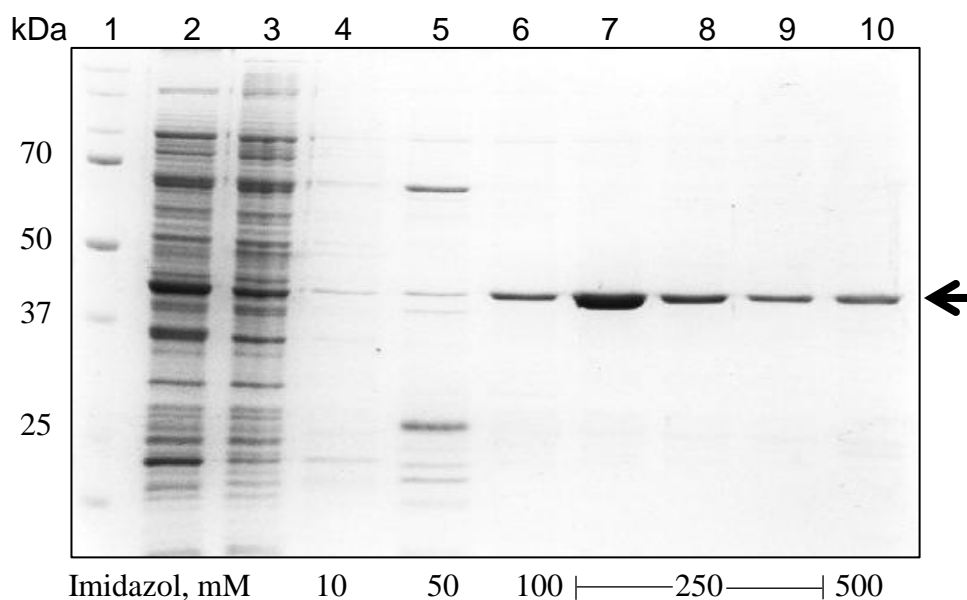
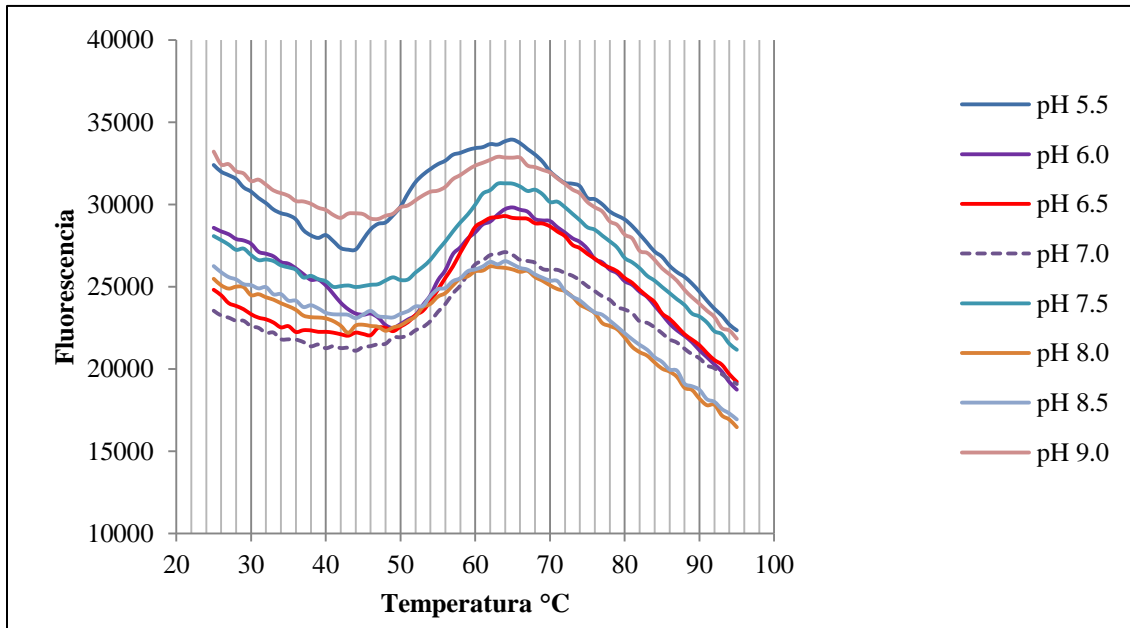


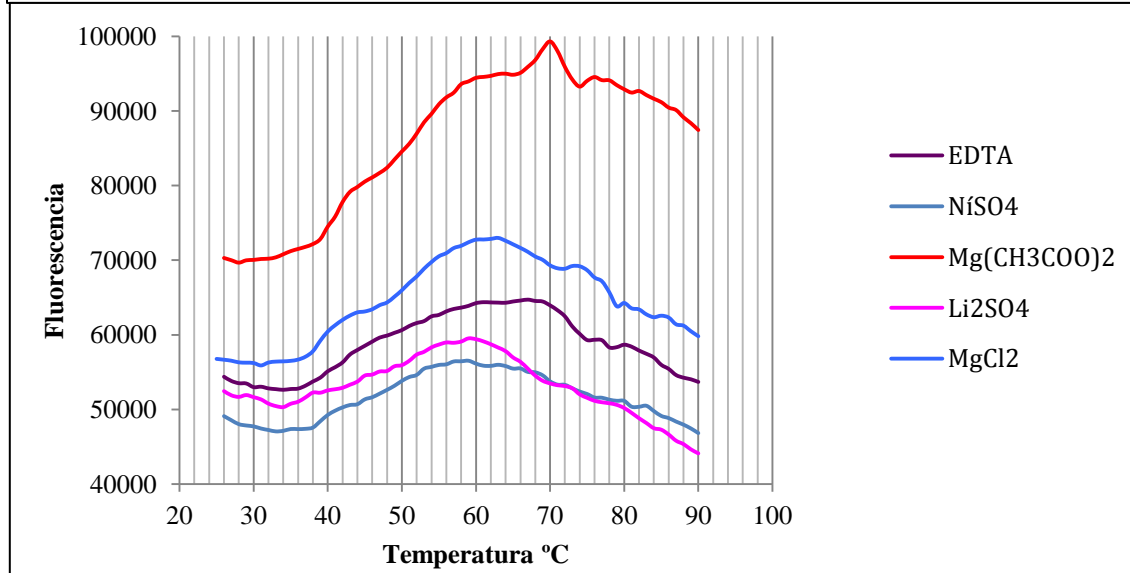
Figura 3. Purificación de mCGI58(His)₁₂ por afinidad

Purificación de mCGI-58(His)₁₂ por cromatografía de afinidad a Ni usando el detergente OG. Las proteínas fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. Carril 1: Marcador de peso molecular BioRad Precision Plus. Carril 2: Sobrenadante del sonicado de las células BL21 (DE3) codón plus-RIPL transformadas con pET28/mCGI-58(His)₁₂. Carril 3: Frente del lavado de la muestra inyectada a la columna. Carril 4, 5, 6 y 7: Elución de CGI58 con 10, 50, 100 y 250 mM de Imidazol, respectivamente. Carril 8: Fracción 2 con 250 mM de Imidazol. Carril 9: Fracción 3 con 250 mM de Imidazol. Carril 10: Fracción 1 del lavado con el amortiguador de elución con 500 mM de Imidazol. La flecha señala la proteína recombinante mCGI58 (His)₁₂

A.



B.



C.

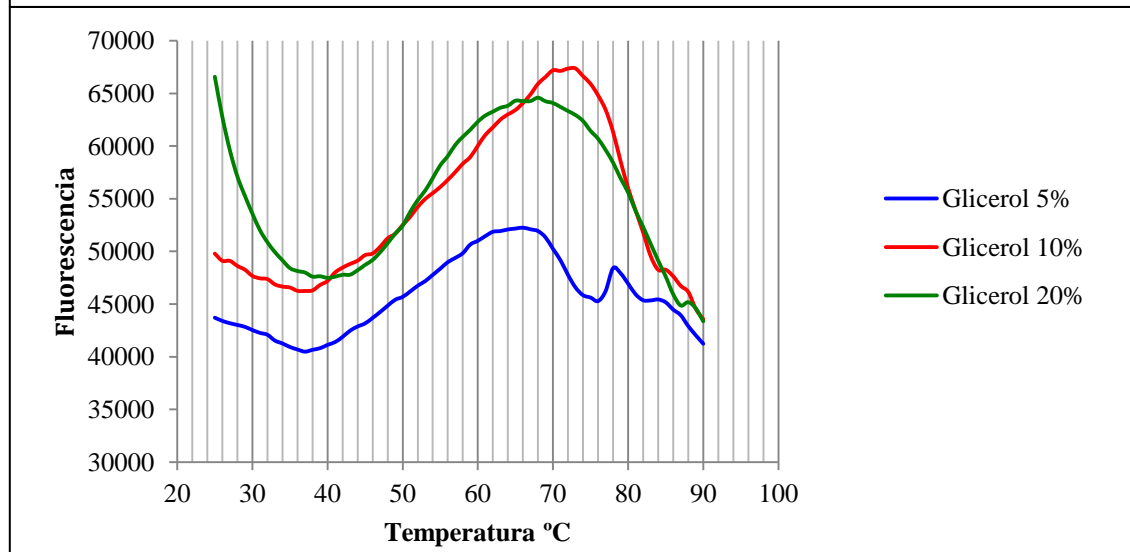


Fig. 4. Ensayo de estabilidad térmica para la proteína mCGI58(His)₁₂ en diferentes condiciones

(A). Evaluación de la estabilidad térmica de mCGI-58(His)₁₂ en un rango de pH de 5.5 a 9.0. Los amortiguadores utilizados fueron: MOPS pH 5.5 y 6.0, MES pH 6.5 y 7.0, HEPES pH 7.5, Tris-HCl pH 8.0 y 8.5 y Glicina pH 9.0. Las condiciones de cada reacción fueron: 0.05 mg/mL de proteína, 50 mM de amortiguador, 150 mM NaCl y 5X de SYPRO ORANGE.

(B). Evaluación de la estabilidad térmica de mCGI58(His)₁₂ con diferentes metales. Los iones metálicos analizados fueron: Li₂SO₄, Mg(CH₃COO)₂, MgCl₂ y NiSO₄. Las condiciones de cada reacción fueron: 0.09 mg/mL de proteína, 50 mM de amortiguador MOPS pH 6.5, 150 mM NaCl, 5X de SYPRO ORANGE, 1 mM EDTA y 2 mM del metal, en un volumen final de 40 µL.

(C). Evaluación de la estabilidad térmica de mCGI58(His)₁₂ con diferentes concentraciones de glicerol. Las concentraciones analizadas fueron de 5, 10 y 20% de glicerol. Las condiciones de cada reacción fueron: 0.09 mg/mL de proteína, 50 mM de amortiguador MOPS pH 6.5, 150 mM NaCl, 5X de SYPRO ORANGE y las diferentes concentraciones de glicerol, en un volumen final de 40 µL.

Tabla I. Construcciones de CGI58 de humano y de ratón

Nombre	Organismo	No. de nucleótidos	No. de aminoácidos	Etiqueta de Histidina	Resistencia a antibiótico	Referencia
pET28(PPS)_hCGI58_WT ¹	Humano	1050	1-349	6His	Kanamicina	Este trabajo
pET28(PPS)_hCGI58_Δ50 ¹	Humano	903	50-349	6His	Kanamicina	Este trabajo
pET28(PPS)_hCGI58_WT ²	Humano	1050	1-349	6His	Kanamicina	En proceso
pET28(PPS)_hCGI58_Δ50 ²	Humano	903	50-349	6His	Kanamicina	En proceso
pET28_mCGI58(His) ₁₂	Ratón	1047	4-351	12His	Kanamicina	¹⁶
pET28(PPS)_mCGI58_WT	Ratón	1056	1-351	6His	Kanamicina	Este trabajo

¹ cDNA optimizado por GeneOracle

² cDNA optimizado manualmente utilizando tablas de uso de codones de *E. coli*

Tabla II. Expresión y solubilidad de las construcciones de CGI58 en diferentes cepas de *E. coli* BL21 (DE3)

	BL21 Star		BL21 Star GroEL/GroES* (Cam ^r)		Rosetta 2 Star (Cam ^r)		Rosetta gami (Cam ^r)		BL21 codon plus** (Cam ^r y Strep ^r)	
	<i>Expresión</i>	<i>Solubilidad</i>	<i>Expresión</i>	<i>Solubilidad</i>	<i>Expresión</i>	<i>Solubilidad</i>	<i>Expresión</i>	<i>Solubilidad</i>	<i>Expresión</i>	<i>Solubilidad</i>
pET28(PPS)_ hCGI58_WT	negativo	ND	negativo	ND	negativo	ND	negativo	ND	positivo	positivo
pET28(PPS)_ hCGI58_Δ50	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	ND	ND	positivo	positivo
pET28_ mCGI58 (His) ₁₂	positivo	positivo	ND	ND	negativo	ND	negativo	ND	positivo	positivo
pET28(PPS)_ mCGI58_WT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	negativo	ND	positivo	positivo

ND: No determinado, Cam^r: resistencia a cloranfenicol, Strep^r: resistencia a estreptomicina, * BL21 Star con el plásmido que codifica las chaperonas GroEL/GroES, **Células con dos plásmidos que contienen los genes de los tRNA argU (AGA, AGG), ileY (AUA), proL (CCC), leuW (CUA).

Tabla III. T_m de mCGI58(His)₁₂ en las diferentes condiciones evaluadas con el ensayo de estabilidad térmica

Condición	Compuesto	Concentración*	pH	T _m , °C	Error matemático
pH¹	MES	50 mM	5.5	51.0	0.001
	MES	50 mM	6.0	56.3	0.005
	MOPS	50 mM	6.5	56.0	0.001
	MOPS	50 mM	7.0	55.9	0.001
	HEPES	50 mM	7.5	56.5	0.001
	Tris-HCl	50 mM	8.0	54.5	0.001
	Tris-HCL	50 mM	8.5	55.4	0.001
	Glicina	50 mM	9.0	55.0	0.001
Estabilizador²	Glicerol	5%	6.5	51.0	0.063
		10%	6.5	55.6	0.026
		20%	6.5	53.2	0.022
Metal²	EDTA	1 mM	6.5	44.8	0.018
	EDTA, Li ₂ SO ₄	1 mM, 2 mM	6.5	46.5	0.209
	EDTA, Mg(CH ₃ COO) ₂	1 mM, 2 mM	6.5	47.6	0.083
	EDTA, MgCl ₂	1 mM, 2 mM	6.5	49.3	0.135
	EDTA, NiSO ₄	1 mM, 2 mM	6.5	45.5	0.064

*Las concentraciones dadas son las concentraciones finales usadas durante el experimento.

¹Experimento realizado con CGI58 en amortiguador Tris-HCl pH 8.0.

²Experimento realizado con CGI58 en amortiguador MOPS pH 6.5

Material Suplementario

Tabla S1. Codones de bajo uso por *E. coli* dentro de las secuencias de cDNA de las construcciones de CGI58

Aminoácido	Codón	Frecuencia en <i>E. coli</i>	hCGI58_WT	hCGI58_Δ50	mCGI58(His) ₁₂	mCGI58_WT
Arginina	CGT	0.643	8	8	1	1
	CGC	0.330	4	4	1	1
	CGA	0.011	0	0	3	3
	CGG	0.008	5	5	3	3
	AGA*	0.006	2	1	5	5
	AGG*	0.003	0	0	7	7
	Isoleucina	ATT	0.335	6	5	8
	ATC	0.659	9	9	7	7
	ATA*	0.006	5	5	4	4
Prolina	CCT	0.112	6	6	9	9
	CCC*	0.016	5	3	4	4
	CCA	0.153	6	5	10	10
	CCG	0.719	7	7	1	1
Leucina	TTA	0.055	6	5	3	3
	TTG	0.034	2	2	8	8
	CTT	0.056	11	10	9	9
	CTC	0.080	5	5	5	5
	CTA*	0.008	0	0	4	4
	CTG	0.767	10	9	6	6

*La cepa BL21 (DE3) codón plus-RIPL tiene dos plásmidos que incluyen los genes para esos tRNA

Tabla S2. Propiedades de detergentes usados más frecuentemente en el PDB

Detergente	Tipo	Dializable	Hits PDB
Tritón X-100	No iónico	No	48
Tritón X-114	No iónico	No	0
NP-40	No iónico	No	0
Tween 20	No iónico	No	12
Tween 80	No iónico	No	1
Octil glucosido (OG)	No iónico	Si	181
Octil thioglucosido	No iónico	Si	19
SDS	Aniónico	No	79
CHAPS	Zwitteriónico	Si	98
CHAPSO	Zwitteriónico	Si	38