

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudio estructura función del activador
transcripcional SdrP de *Thermus thermophilus***

Tesis que presenta

Kevin Eder Gamboa Ramírez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., Febrero de 2015



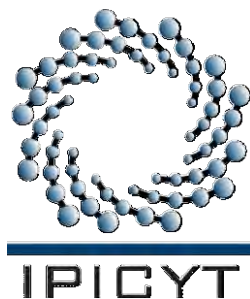
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Estudio estructura-función del activador transcripcional SdrP de *Thermus thermophilus***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Kevin Eder Gamboa Ramírez** y aprobada el **cinco de febrero del dos mil quince** 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. Braulio Gutiérrez Medina
Miembro del Comité Tutorial

Dr. José Sampedro Pérez
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 Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACyT No CB2011-168710. Parte del equipo utilizado fue adquirido con el proyecto CONACyT INFRA No 204373.



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 127 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 5 días del mes de febrero del año 2015, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. José Sampedro Pérez	Presidente	UASLP
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Secretario	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Kevin Eder Gamboa Ramírez

sobre la Tesis intitulada:

Estudio Estructura función del activador transcripcional SdrP de Thermus thermophilus

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes de febrero de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mi madre y a mi padre,
Alejandra Ramírez Rico y Gregorio Mauricio Gamboa García

A mi hermana y a mi hermano,
I-o Ichel Alexa Gamboa Ramírez y Axel Bee Gamboa Ramírez

Agradecimientos

Se le agradece al IPICYT por la beca otorgada, al Dr. Samuel Lara González por su apoyo y guía, al Dr. José Sampedro Pérez por su apoyo y ayuda en los experimentos de fluorescencia, así como al Dr. Braulio Gutiérrez Medina por su asesoría. Por último, se agradece a la Dra. Adela Rodríguez Romero, por su ayuda durante el análisis por difracción de rayos X de los cristales obtenidos en este trabajo y al Dr. Rubén Paul Gaytan Colin, por la ayuda en la síntesis del dúplex de DNA de 38 pb.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de Examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de Tablas	viii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Metodología	5
Resultados y discusión	11
Conclusión	20
Agradecimientos	21
Referencias	22
Tablas y figuras	25

Lista de Tablas

Tabla 1.	Condiciones de cristalización del complejo SdrP:DNA ₃₈	25
----------	---	----

Lista de figuras

Figura 1.	Estructura terciaria de CAP	26
Figura 2.	Interacciones intermoleculares determinantes en el cambio conformacional de CAP en presencia de cAMP	27
Figura 3.	Alineamiento estructural de los CBD, DBD e interfaz del dímero de CAP y SdrP	28
Figura 4.	Digestión y clonación del gen sintético de SdrP.	29
Figura 5.	Ensayo de expresión de la proteína SdrP recombinante	30
Figura 6.	Primera etapa de Purificación (IMAC)	31
Figura 7.	Segunda etapa de purificación (intercambio iónico)	32
Figura 8.	Tercera etapa de purificación (exclusión molecular)	33
Figura 9.	Análisis de la interacción entre SdrP y su secuencia consenso de DNA	34
Figura 10.	Desnaturalización térmica de la muestra ScCt de SdrP	35
Figura 11.	Desnaturalización térmica de la muestra SsCt de SdrP	36
Figura 12.	Análisis de la desnaturalización de SsCt en presencia de ANS	37
Figura 13.	Ensayo de cristalización del complejo SdrP:DNA	38

Abreviaturas

(Por sus siglas en inglés)

RNA	Ribonucleic acid
RNAP	Ribonucleic acid polymerase
DNA	Deoxyribonucleic acid
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
RMSD	Root mean square deviation
αCTD	α Carboxil terminal domain
αNTD	α Amino terminal domain
CAP	Catabolite activator protein
ORF	Open Reading Frame
SdrP	Stationary phase dependent regulatory protein
T_m	Melting temperature
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography

Resumen

“Estudio estructura función del activador transcripcional SdrP de *Thermus thermophilus*”

La transcripción es un proceso altamente regulado que ocurre en todos los organismos vivos. En *Thermus thermophilus*, una de las proteínas encargadas de regular este proceso es la proteína dependiente de la fase estacionaria (SdrP, por sus siglas en inglés). SdrP es miembro de la familia CRP/FNR, es homólogo estructural de la proteína activadora por catabolito (CAP) con un RMSD de 2.7 Å. CAP y SdrP reconocen secuencias de DNA prácticamente idénticas. Sin embargo, SdrP no requiere ser activada para reconocer su sitio de unión en el DNA. En el caso de SdrP, se han reportado las secuencias de DNA que reconoce, los genes que activa e incluso se ha resuelto su estructura tridimensional en ausencia de ligandos. No obstante aún no se ha descrito el mecanismo por el cual SdrP reconoce e interacciona con su sitio de unión en el DNA. En este trabajo se purificó a SdrP como proteína recombinante en *Escherichia coli*. Con la proteína pura, se analizó su capacidad de reconocer una secuencia consenso de DNA de 38 pb, utilizando un ensayo de movilidad seguido por cromatografía de exclusión molecular. Se analizó su estabilidad térmica en presencia y ausencia de trehalosa, monitoreando la fluorescencia intrínseca de la proteína y la fluorescencia de la molécula ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS). Se realizaron ensayos de cristalización del complejo SdrP:DNA₃₈, utilizando la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Con los cristales obtenidos, se realizaron experimentos preliminares de difracción de rayos X. Los resultados de estabilidad térmica, muestran que SdrP sigue un proceso de desnaturalización de tres estados. Los ensayos de movilidad seguidos por filtración en gel, demuestran que la proteína SdrP reconoce y se une al fragmento de DNA de 38 pb formando el complejo SdrP:DNA. Con este complejo, se obtuvieron cristales en 11 condiciones diferentes, de los cuales, uno de ellos difracta aproximadamente a 15 Å.

PALABRAS CLAVE. CAP, SdrP, Desnaturalización térmica, Cristalización, Factor de transcripción.

Abstract

“Structure and function characterization of SdrP protein from *Thermus thermophilus*”

Transcription is a highly regulated process that takes place in all living organisms. In the thermophilic bacteria *Thermus thermophilus*, one of the proteins that regulate this process is the Stationary Phase Dependent Regulatory Protein (SdrP). SdrP is a member of the CRP/FNR transcription factor family; SdrP has 23% of amino acid sequence identity and a RMSD of 2.7 Å with the Catabolite-Activated-Protein (CAP), which is the best-known member of the family. CAP and SdrP recognize practically the same DNA sequence, nevertheless, SdrP doesn't need to be activated to recognize its binding site on the DNA. For SdrP, it has been reported the DNA sequences that recognizes, the genes that activates and the crystal structure without ligands. However, the mechanism by which SdrP recognizes and interacts with the DNA has not been described. In this work SdrP was purified as recombinant protein in *Escherichia coli*. With the purified protein, we analyzed the ability of SdrP to bind a 38 pb consensus-DNA sequence, through a mobility shift assay, using size exclusion chromatography. The thermal stability was analyzed with and without trehalose, by monitoring the intrinsic fluorescence of the protein and the fluorescence of the molecule 8-anilin-1-naftalene sulfonic acid (ANS). The crystallization assay of the complex SdrP:DNA was setup by the sitting drop vapor diffusion technique. With the obtained crystals, preliminary X-ray diffraction experiments were performed. The thermal stability results show the denaturation process of SdrP follows a three state model. The mobility shift assay followed by gel filtration shows that SdrP protein recognizes and binds to the 38 bp DNA sequence, allowing us to get the SdrP:DNA complex. Crystals of the complex were obtained in eleven different conditions, one of them diffracted at 15 Å.

KEY WORDS. CAP, SdrP, Crystallization, Thermal denaturation.

Introducción

La transcripción es un proceso fundamental en la expresión génica en los seres vivos y es un proceso altamente regulado. En bacterias, se conocen alrededor de 2,000 promotores a los que la RNAP se une con mayor o menor frecuencia. Esta interacción depende de la secuencia de nucleótidos de estas regiones. Este tipo de regulación es estática y para abordar esta situación las bacterias utilizan elementos en *trans*. A este elemento se le denomina factor de transcripción (FT). Los factores de transcripción, son proteínas que reconocen secuencias específicas de DNA, tienen la capacidad de regular la expresión de más de un gen y pueden actuar bajo el influjo de estímulos físicos o químicos (Lee y col., 2012).

El control de la expresión génica por factores de transcripción, ocurre cuando el FT reconoce y se une a una secuencia de DNA. En este sentido, los FT se pueden dividir en “reguladores positivos”, cuando activan la transcripción al reclutar la maquinaria transcripcional una vez unidos a su secuencia promotora y en “reguladores negativos”, que por el contrario, impiden la unión de la maquinaria transcripcional al unirse a una secuencia de DNA específica. Dentro de los factores que regulan la interacción entre el DNA y el FT se puede mencionar la identidad de la secuencia de DNA, la concentración del FT y la unión de ligandos a los FT permitiendo su interacción con el DNA (Lee y col., 2012).

En bacterias se han identificado diversas familias de factores de transcripción, algunas de estas son LacI, AraC, LysR, OmpR y CRP/FNR (Browning y col., 2004). La familia CRP/FNR comprende alrededor de 369 proteínas, que en su mayoría actúan como activadores transcripcionales en presencia de un catabolito. De forma general, estos FT regulan genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, virulencia, germinación y desarrollo morfológico. Estructuralmente, la principal característica de esta familia, es la presencia de un dominio N-terminal de unión a catabolito (CBD) y un dominio C-terminal de unión a DNA (DBD). El cAMP, el NO, el 2-oxoglutarato, el cGMP, el $[4Fe-4S]^{2+}$ y el CO han sido reportados como catabolitos afines al CBD de la familia CRP/FNR (Akyol y col., 2009, Lee y col., 2012).

La proteína activadora por catabolito (CAP) de *Escherichia coli*, también conocida como proteína represora por catabolito (CRP) es probablemente el representante mejor caracterizado de esta familia. CAP actúa en función de los niveles de glucosa en el medio, cuando los niveles de glucosa disminuyen, la concentración de cAMP aumenta, interaccionando específicamente con el dominio de unión a catabolito de CAP. El cAMP es el regulador alostérico de CAP que promueve la transición de un estado “off” (inactivo) a un estado “on” (activado) (Popovych y col., 2009).

Este FT se aisló por primera vez en 1970 por Emmer y col., quienes estimaron que la constante de disociación (K_D) de CAP por cAMP esta en el rango de 1-10 μM . Se han identificado dos especies predominantes de CAP en el medio intracelular, estas son apo-CAP y CAP-(cAMP)₂. La especie apo-CAP es incapaz de unirse al DNA de manera específica, mientras que la especie CAP-(cAMP)₂ presenta una alta afinidad por secuencias específicas de DNA (Bostford y col., 1992). Al comparar la estructura tridimensional de la forma apo-CAP contra las estructuras tridimensionales de CAP-(cAMP)₂ y CAP-(cAMP)₂-DNA, se observa que en apo-CAP la hélice-F gira 60° y presenta una translación aproximada de 7 Å con respecto a su posición en las estructuras CAP-(cAMP)₂ y CAP-(cAMP)₂-DNA. Este cambio conformacional evita que apo-CAP pueda interaccionar y reconocer su sitio en el DNA (Popovych y col., 2009, Figura 1A y 1B). La posición de la hélice-F que se observa en las estructuras CAP-(cAMP)₂ y CAP-(cAMP)₂-DNA es estabilizada por interacciones en las que participan los residuos Val126-Phe136. Estos residuos presentan una transición “coil-to-helix” desencadenada por la unión de cAMP. De esta forma, los residuos Val126-Phe136 forman parte de la hélice-C (residuos 110-136) en las estructuras CAP-(cAMP)₂ y CAP-(cAMP)₂-DNA, mientras que en la estructura de apo-CAP los residuos Val126-Phe136 no presentan estructura secundaria, observándose una hélice-C más corta (residuos 110-125) (Figura 2A-C, Popovych y col., 2009).

En 1989, Ebright y col. analizaron todas las secuencias reportadas a las que se une CAP. A partir de este análisis se diseñó una secuencia consenso de 22 pb: 5`-AAATGTGATCTAGATCACATTT-3`. Así mismo, se determinó que la K_D de CAP

por esta secuencia es de 4.2×10^{-10} M, observándose que CAP es 450 veces más afín por la secuencia consenso que por la secuencia del promotor *lac*. En otros trabajos se ha descrito que la interacción de CAP con el DNA ocurre mediante dos mecanismos que se conocen como “lectura directa” y “lectura indirecta”. La formación del complejo CAP:DNA promueve que el DNA se pliegue sobre CAP formando un ángulo de 80-90° (Lawson y col., 2004, Passner y col., 2000, Napoli y col., 2006).

En la bacteria termofílica *Thermus thermophilus*, se han descrito cuatro marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para proteínas pertenecientes a la familia CRP/FNR: TTHA1359, TTHA1437, TTHB099, TTHA1567. La proteína que codifica el gen TTHA1437, es conocida como CRP y es homóloga estructural y funcional de CAP, mientras que el gen TTHA1359 codifica la proteína conocida como “Proteína Reguladora Dependiente de la Fase Estacionaria”(SdrP) (Oshima e Imahori 1974, Agari y col., 2008). SdrP, regula genes involucrados en el metabolismo de nutrientes, control del estado redox, poliadenilación del mRNA y reparación de DNA. Este FT se expresa durante la fase estacionaria de crecimiento a 70°C y bajo condiciones de estrés oxidativo. Bacterias de *T. thermophilus* carentes del gen TTHA1359 presentan crecimiento deficiente y son más susceptibles al estrés oxidativo (Agari y col., 2008, Agari y col., 2010).

SdrP es un homodímero de subunidades idénticas de 202 residuos de aminoácidos cada una. El dominio CBD comprende los residuos 1-82 y está formado por ocho hojas- β con topología “jelly roll” y una α -hélice posicionada entre las láminas β_6 y β_7 . El dominio DBD se localiza en la región C-terminal, comprende los residuos 83-202 y está formado por cuatro α -hélices y cuatro hojas- β . El motivo “hélice-giro-hélice” de unión a DNA está formado por la hélice- α_d y la hélice- α_e . La hélice- α_b conecta a los dominios N y C-terminal y forma la interfaz de dimerización de SdrP (Figura 3A, Agari y col., 2008).

La característica más importante de SdrP con respecto a la familia CRP/FNR, es que ha sido descrita como un factor de transcripción que no requiere de un modulador alostérico, encontrándose de forma permanente en una conformación “activada”. Esto se confirmó mediante el análisis de la estructura cristalográfica de

la forma apo-SdrP, en la que se observan dos características particulares. Una de ellas es que SdrP en la posición equivalente al sitio de unión a cAMP observado en CAP se encuentran residuos de cadena lateral grande como Arg50, Glu60, Glu61, Tyr70 y Tyr170, por lo que la cavidad observada en CAP no existe en SdrP. La otra evidencia cristalográfica, es con relación a la posición de la hélice-E de SdrP. La hélice equivalente a la hélice-E en CAP es la hélice-F, la hélice-E de SdrP se encuentra en la misma posición que la hélice-F en la estructura del complejo CAP:DNA, por lo que se concluye que SdrP se encuentra permanentemente en el estado “activado”. Esto concuerda con la capacidad que tiene SdrP de activar la transcripción en ausencia de cAMP o de 2-oxoglutarato (Figura 3B-D, Agari y col., 2008).

El interés de nuestro laboratorio consiste en describir el mecanismo de interacción molecular entre SdrP y el DNA durante la formación del complejo SdrP:DNA, determinando la estructura tridimensional del complejo por cristalografía de proteínas. Para ello, el objetivo principal de este trabajo fue el de iniciar las pruebas de cristalización del complejo SdrP:DNA, obtener cristales del complejo y realizar una caracterización preliminar por difracción de rayos-X. Adicionalmente, se realizaron experimentos de desnaturalización térmica de SdrP, monitoreados por fluorescencia intrínseca de tirosinas o utilizando un fluoróforo exógeno, el ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS).

Metodología

Clonación de SdrP en el vector de expresión pET28-PPS

El gen sintético de SdrP optimizado para su expresión en *E. coli* se adquirió clonado en el vector pGOV4 a la empresa Gene Oracle Inc. Para subclonar el gen en el vector de expresión pET28-PPS, se utilizaron las endonucleasas de restricción *HindIII* y *NdeI* (New England Biolabs). 0.3 µg de la construcción pGov4-SdrP se trataron con 10 unidades de enzima *HindIII* en 17 µl de amortiguador NEB2 1X (NaCl 50 mM, TrisHCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM) con H₂O libre de nucleasas (H₂O_{DEPC}). La reacción de digestión se llevó a cabo durante 3 horas a una temperatura de 37°C. Terminado el tiempo, se adicionaron 4 unidades de la enzima *NdeI* y se ajustó el volumen a 20 µl, la muestra se incubó a la misma temperatura por 12 horas adicionales, posteriormente se inactivo la reacción por choque térmico a 65 °C por 10 minutos. El inserto de 700 pb, se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando el kit "QIAquick gel extraction". El producto de la digestión purificado, se ligó en el vector de expresión pET28-PPS utilizando la enzima T4 DNA ligasa, usando una relación molar 1:3 vector/inserto. 0.05 µg de vector, 0.15 µg de inserto, 1 µl de T4 DNA ligasa, en un volumen final de 10 µl de amortiguador de ligación 1X, se incubaron 2 horas a 37 °C seguidos de 12 horas a 16 °C, la reacción se inactivó incubando a 65 °C por 20 min.

Se utilizaron 2 µl de la reacción de ligación para transformar células de *E. Coli* DH5-alfa competentes preparadas por el método de cloruro de calcio mediante choque térmico. 50 µl de células competentes se descongelaron durante 5 min en hielo, se añadieron 2 µl o menos de 0.01 µg de DNA y se incubaron por 20 min en hielo, posteriormente se sometió a choque térmico en un baño seco a 42 °C durante 45 segundos y se incubaron 2 min en hielo. Se añadieron 500 µl de medio líquido Luria-Bertani (LB) y se incubaron 45 minutos a 37 °C. Al finalizar el tiempo, se centrifugó la muestra a 2000 rpm, el pellet se resuspendió en 100 µl de medio Luria-Bertani con Kanamicina a una concentración de 50 µg/ml (LB_{kan}) y se sembraron en agar LB_{kan}. Las colonias transformantes se analizaron mediante PCR de colonia utilizando la polimerasa HsTaq DNA_{pol} y los oligos T7 Fwd: 5'-

TAATACGACTCACTATAGGG-3' y T7 Rev: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3'. Para las colonias positivas, se aisló el DNA plasmídico según el protocolo del kit de purificación de DNA Miniprep de Qiagen. La identidad del inserto se determinó por secuenciación en el laboratorio nacional de biotecnología ambiental y médica (LANBAMA). Todas las muestras de DNA se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Expresión de la proteína SdrP recombinante

Se transformaron células de *E.coli* BI21-star competentes con 1-2 μ l de la construcción pET28-PPS-SdrP mediante choque térmico, de acuerdo al protocolo descrito en la sección precedente. A partir de una colonia, se creció un pre-inoculo de 50 ml en medio líquido LB_{kan} a 37°C por 12-16 h a 190 rpm. El pre-inoculo se utilizó para inocular 1L de medio LB_{kan} fresco haciendo una dilución 1:50, el cual se incubó a 37 °C y 190 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.6-0.7. La inducción de la expresión de la proteína se realizó con isopropil β -D-1-thiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM. La expresión de SdrP se realizó a dos temperaturas, a 37 °C durante 4 h y a 18 °C por 18 h. El cultivo celular se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el botón de células o "pellet" se almacenó a -20 °C hasta su uso. La expresión de la proteína se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15 % al tiempo cero de la inducción y al tiempo final del cultivo (4 y 16 h).

Purificación de la proteína SdrP

El pellet de células de un litro de cultivo se resuspendió en 30 ml de amortiguador de lisis (AL: NaCl 300 mM, Tris HCl pH: 8 50mM, Imidazol 10 mM). La biomasa resuspendida, se sonicó usando cuatro amplitudes: 30%, 35%, 40% y 45%, por 9 ciclos de 30 s de sonicado y 35 s de descanso en hielo. El producto del sonicado se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y se recupero el sobrenadante.

Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC). El sobrenadante se inyectó a una columna de Ni-NTA; cromatografía de afinidad a níquel, previamente equilibrada con 5 volúmenes de columna (CV) de AL. Se recolectó el frente y se lavó con 3 CV de AL. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 5 CV del amortiguador

de lavado Ala (NaCl 300mM, Tris HCl pH8 50mM) suplementado con concentraciones crecientes de imidazol, Ala1 imidazol 10 mM, Ala2 imidazol 20 mM y Ala3 imidazol 50 mM. La elución se realizó con un gradiente escalonado usando 5 CV del amortiguador de elución 1 (AE1, NaCl 300 mM, Tris HCl pH: 8 50 mM, Imidazol 100 mM) y el amortiguador de elución 2 (AE 2: NaCl 300 mM, Tris HCl pH: 8 50 mM, Imidazol 200 mM). Las muestras de cada paso se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Las fracciones donde se encontró una banda de \approx 24 kDa correspondiente a SdrP se colectaron, se juntaron y se desalaron con una columna PD10 (GE Healthcare) en el amortiguador AD (EDTA 2 mM, Tris-HCl pH:8 20 mM).

Cromatografía de intercambio iónico. Se inyectaron 20-30 ml de proteína filtrada (0.22 μ m) y desalada en amortiguador AD, a una concentración de 1.2 mg/ml a una columna HiTrap Q HP de cromatografía de intercambio iónico, previamente equilibrada con amortiguador AD. La muestra se recuperó, con un gradiente lineal de 0 a 50% de amortiguador AB en 20 CV totales (AB, NaCl 1 M, Tris-HCl pH:8 20mM, EDTA 2mM), se recolectaron fracciones de 3 ml con un flujo constante de 2 ml/min. Cada pico de elución detectado por absorbancia a 280 nm se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y se concentraron por ultrafiltración a 2 ml (Vivaspin Turbo 10 kDa, Sartorius). La cromatografía de intercambio iónico y la de exclusión molecular se realizaron en un equipo AKTA-FPLC (GE Healthcare). La concentración de proteína se cuantificó utilizando el método de Bradford (Bradford M. Marion, 1976).

Cromatografía de exclusión molecular. Se inyectaron 0.5 ml de muestra filtrada (0.22 μ m) a una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), equilibrada en el amortiguador AC (AC, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Tris HCl pH: 8 20 mM). Se colectaron fracciones de 1 ml a un flujo de 0.8 ml/min en modo isocrático con el amortiguador AC, el volumen de la corrida fue de 1.5 CV. Las fracciones se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, aquellas que contenían a la proteína se juntaron y se concentraron por ultrafiltración (Vivaspin Turbo 10 kDa, Sartorius) hasta alcanzar una concentración

de 10-20 mg/ml. La proteína se guardó en alícuotas de 500 μ l a 4 °C. El rendimiento de proteína purificada por el litro de cultivo fue de 20-30 mg. la concentración de proteína se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar teórico de SdrP ($8940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Preparación de DNA duplex de 38 pb para ensayos de cristalización y movilidad.

Se diseñaron y adquirieron los siguientes oligonucleótidos, uno de 17 bases o 17mer con la secuencia 5'- ATTTTCGAAAATTGTGAT y otro de 21 bases o 21mer con la secuencia 5'- CTAGATCACAATTTTCGAAAT. El ensamble de estos dos oligonucleótidos permite obtener la siguiente secuencia palindrómica de doble cadena:

5'-ATTTTCGAAAATTGTGAT|CTAG ATCACAATTTTCGAAAT-3'

3'-TAAAGCTTTTAACTA GATC|TAGTGTTAAAAGCTTTA-5'

La reacción de ensamble o "annealing" del DNA de 38 pares de bases (DNA₃₈) se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad. Se utilizó un gradiente de temperatura de 90 a 20 °C, variando la temperatura cada 2 °C e incubando 2 min en cada punto. La concentración final del DNA₃₈ fue de 0.2 mM.

Ensayo de movilidad del complejo SdrP:DNA₃₈

El ensayo de movilidad se realizó en el cromatógrafo de alta presión AKTA, utilizando una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Se realizaron tres corridas independientes que correspondieron a:

- 1) 0.5 ml de proteína SdrP a una concentración de 0.02 mM
- 2) 0.5 ml del DNA₃₈ a una concentración de 0.02 mM
- 3) 0.5 ml del complejo SdrP:DNA₃₈ a una concentración de 0.02 mM. El complejo SdrP:DNA₃₈ se formó mezclando 0.25 ml de DNA₃₈ 0.04 mM con 0.25 ml de SdrP 0.04 mM e incubando por 30 minutos a temperatura ambiente.

Las condiciones de corrida fueron las mismas para todas las muestras, flujo de 0.8 ml/min, con fracciones de 1ml. Estas últimas se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 4% para la muestra de DNA₃₈ y de gel de poliacrilamida al 15% para las muestras de SdrP y el complejo SdrP:DNA₃₈.

Desnaturalización térmica de SdrP seguida por fluorescencia intrínseca

Un mililitro 1 μM de SdrP pura en amortiguador AC, se desnaturalizó con un gradiente de temperatura de 5 a 80 $^{\circ}\text{C}$ en intervalos de 2 $^{\circ}\text{C}$, la muestra se incubó por 10 min en cada punto. Se midió la fluorescencia intrínseca por triplicado con un espectrofluorómetro Shimadzu RT-5301, se registraron espectros de 281 a 500 nm utilizando una longitud de excitación de 276 nm. De los datos obtenidos se seleccionó la intensidad de fluorescencia máxima (~ 304 nm) y se graficó el incremento de fluorescencia con respecto al blanco en función de la temperatura. Los datos obtenidos se ajustaron con la ecuación doble de Boltzmann utilizando el programa Origin Lab. La desnaturalización térmica se realizó en ausencia y presencia de trehalosa 0.8M.

Análisis de la estabilidad térmica de SdrP utilizando ANS

El análisis con ANS se realizó en un espectrofluorómetro Shimadzu RT-1503. 1 ml 1 μM de SdrP en el amortiguador AC, se tituló con una solución stock de ANS 10 μM en alícuotas de 2 μl hasta alcanzar la saturación a 5, 34 y 70 $^{\circ}\text{C}$. La muestra se incubó 10 minutos a cada temperatura, se homogenizó por inversión y se volvió a incubar 1 min antes de medir la fluorescencia. La longitud de excitación fue de 370 nm, se registró la emisión de fluorescencia de 400 nm a 600 nm. De los datos obtenidos, se seleccionó la intensidad máxima (512 nm), se restó el blanco y los datos se graficaron en función de la concentración de ANS.

Cristalización del complejo SdrP-DNA₃₈

El complejo SdrP:DNA₃₈ preparado en una proporción 1:1.2 se concentró hasta 0.3-0.4 mM. Con este complejo se montaron gotas 1:1 complejo:precipitante usando la técnica de difusión de vapor en gota sentada con placas de 24 pozos Intelli-Plates (ArtRobbins Instruments). El volumen de la gota de cristalización fue de 2 μl , mientras que el volumen en el pozo del precipitante fue de 300 μl . se exploraron 98 condiciones de cristalización, las cuales corresponden a los kits de cristalización Crystal Screen y Crystal Screen 2 de Hampton Research. Adicionalmente, se prepararon y probaron doce condiciones diseñadas a partir de

soluciones reportadas en las que cristaliza el complejo CAP-DNA (Tabla S1). Las placas se incubaron a una temperatura de 16 °C y se observaron periódicamente con un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168). Aquellas condiciones en las que se formaron cristales se volvieron a montar, variando la relación complejo:precipitante a 1:1, 2:1 y 1:2.

Caracterización preliminar de los cristales del complejo SdrP:DNA₃₈ por difracción de rayos-X.

Los cristales utilizados en los experimentos de difracción fueron incubados por 10-15 segundos en una solución crio-protectora que contenía 30% de PEG400 preparada con la solución precipitante donde creció el cristal. Posteriormente, los cristales se montaron en asas o “loops” de nylon de 0.1-0.2 mm y se colocaron directamente en el generador de rayos-X bajo el flujo continuo de nitrógeno líquido a 100 K. El método utilizado para la caracterización preliminar de los cristales fue el método de rotación. Para cada cristal se tomaron dos oscilaciones a 0° y 90° con 1° de rotación. El tiempo de exposición fue de 5 min para cada una. La distancia entre el detector y el cristal se fijó a 100 mm y se utilizó una longitud de onda de 1.542 Å. Las imágenes se analizaron con el programa d*TREK (Rigaku) utilizando el modo manual, se seleccionó el grupo espacial con mayor simetría y menor penalización. Estos experimentos se realizaron con un generador de rayos X de ánodo rotatorio MicroMax 007 y un detector de área R-AXIS IV++ (Rigaku), en el Instituto de Química de la UNAM.

Resultados y discusión

Clonación del gen sintético de SdrP y expresión de la proteína SdrP recombinante.

El gen sintético de SdrP, contenido en el vector de clonación pGOV4, estaba flanqueado por los sitios de corte para las enzimas *NdeI* y *HindIII*. La presencia de estos sitios, permitió aislar el fragmento de 700 pb correspondientes a SdrP (Fig. 4A). El gen se subclonó en el vector pET28-PPS y se utilizó para transformar células DH5-alfa. Se seleccionaron de 20 a 30 colonias capaces de crecer en medio de cultivo con antibiótico y se analizaron mediante PCR de colonia. En la figura 4B, se observa el gel de agarosa que muestra las bandas correspondientes a las colonias positivas, todas las bandas se encuentran en un peso aproximado de 700 pb. Una vez que habíamos identificado clonas con el inserto que correspondía al tamaño esperado para el gen de SdrP, se seleccionaron dos muestras que fueron secuenciadas en el laboratorio nacional LANBAMA. La secuencia que se obtuvo confirmó la presencia del gen que codifica para SdrP en el marco de lectura correcto, el vector se guardó como pET28-PPS_SdrP.

En la figura 5 se observa una imagen del análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida de la expresión de SdrP a 37 y 18 °C. Los carriles 2 y 4 corresponden a la muestra tomada al tiempo cero para 37 °C y 18 °C respectivamente, es decir, previo a la inducción con IPTG. En los carriles 3 y 5 se observa el patrón de proteínas que se obtuvo a partir de las muestras tomadas a las 4 horas a 37 °C y a las 18 horas a 18 °C, posterior a la inducción. Al comparar el patrón de proteínas entre T_0 - T_4 y T_0 - T_{18} , se puede observar la expresión de la proteína SdrP que aparece como una banda de alta intensidad con peso molecular por encima de los 20 kDa (~ 22 kDa). Es interesante mencionar que, las células BL21-Star transformadas con la construcción pET28-PPS_SdrP tardan entre 7 y 8 horas en alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.6-0.8. Otras proteínas en nuestro laboratorio expresadas en el mismo sistema por lo regular demoran 4 horas en llegar a esta misma D.O.₆₀₀. Esto puede deberse a que bajo estas condiciones experimentales tenemos una expresión basal de SdrP en ausencia de IPTG. Lo cual altera la

expresión de los promotores activados por CAP. Una posible solución a este problema es utilizar cepas BI21(DE3)pLys, las cuales expresan la lisozima T7 que suprime la expresión basal de proteínas antes de la inducción.

Purificación de la proteína SdrP recombinante

Se estableció un protocolo de purificación en tres etapas por cromatografía líquida, que incluyen como primer paso cromatografía de afinidad a níquel (IMAC), seguida de cromatografía de intercambio iónico y finalmente cromatografía de filtración en gel.

Purificación por IMAC. Como se puede observar en la figura 6A, en los carriles 2 y 3 se observa que la banda de proteína que corresponde al peso molecular de SdrP se encuentra en la fracción soluble del sobrenadante, en los carriles 4-10 se pueden observar los lavados con los amortiguadores Ala1, Ala2 y Ala3. En la figura 6B, los carriles 3-9, representan la elución de SdrP con los amortiguadores AE1 y AE2. Como se puede observar SdrP comienza a eluir con 100 mM de imidazol y se observa que con 300 mM de imidazol SdrP deja de interactuar con la resina de níquel. La eficiencia de este paso de purificación demuestra que el fragmento de 6 histidinas de SdrP se encuentra expuesto al solvente y que puede interactuar con la resina. El análisis densitométrico de los geles, muestra que la pureza de SdrP en este punto de la purificación, es mayor a 90%.

Cromatografía de intercambio iónico. En la figura 7, se esquematizan los resultados de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico. En la gráfica de la figura 7A, en negro se representan las unidades de mili absorbancia (mAU) a 280 nm en función del volumen de elución de la muestra de SdrP. En rojo, se muestra el gradiente de concentración de NaCl en función del volumen de elución. El pico más alto del cromatograma, corresponde a las fracciones 26-32, con un volumen de elución entre 120 ml y 140 ml. Así mismo, podemos observar que el inicio del pico corresponde a una concentración aproximada de 250 mM de NaCl. En la figura 7B, las bandas en los carriles 2, 3 y 4, corresponden a la fracción 28, 29 y 30. Así mismo el peso de la banda, corresponde con el peso molecular de SdrP.

Cromatografía de exclusión molecular. En la figura 8, se representan los resultados obtenidos en la última etapa de purificación, que corresponde a la cromatografía de filtración en gel. En la figura 8A, se pueden observar dos picos, el pico más grande abarca las fracciones 10, 11 y 12 y el pico más pequeño se encontraba en la fracción 16. Comparando estos datos con la curva de calibración de la columna, utilizando los siguientes marcadores de peso molecular 1.35, 17, 44, 158 y 650 kDa, identificamos a las fracciones 10-13 con un peso molecular aproximado de 44 kDa. Por lo tanto, se analizaron las muestras de las fracciones 10, 11, 12 para determinar la presencia de SdrP. En la figura 8B, se pueden observar las bandas que corresponden a las fracciones 10, 11 y 12 (carriles 3, 4 y 5 respectivamente) que corresponden al peso molecular de SdrP (22 kDa del monómero) lo cual a su vez corresponde con el peso calculado a partir del pico máximo de elusión, que es de 44 kDa (dímero). Después de concentrar la muestra la pureza calculada por densitometría fue cercana al 100% (Fig. 8B, carril 6). El rendimiento obtenido de proteína pura utilizando este protocolo de purificación fue de 22 mg por cada litro de cultivo.

Ensayo de movilidad del complejo SdrP:DNA₃₈

La primer pregunta que abordamos fue si SdrP producida a partir de un gen sintético como proteína recombinante en *E. coli* era capaz de unirse y reconocer su sitio de unión en el DNA. Para abordar esta pregunta, primero se diseñó una secuencia consenso, palindrómica, de 38 pb (Fig. 9A). Esta secuencia fue diseñada considerando la secuencia consenso reportada por Agari en el 2008, mientras que la longitud del DNA se diseñó tomando como base las estructuras reportadas del complejo CAP:DNA a mejor resolución (Napoli y col., 2006). Para analizar de manera cualitativa la interacción SdrP con el DNA, se estableció un protocolo de movilidad del complejo SdrP-DNA₃₈ en una columna de exclusión molecular Superdex200.

El experimento consistió en determinar la movilidad del complejo SdrP-DNA₃₈ con respecto a SdrP y al DNA de 38 pb. En la figura 9B, la gráfica representa las unidades de mAU de SdrP-DNA₃₈ (verde), DNA₃₈ (azul) y SdrP (rojo) en función

del volumen de elución. Como se puede observar en la figura 9B, en la curva verde las fracciones 13-14 corresponden al complejo SdrP-DNA₃₈, con un peso molecular aproximado de 94 kDa. La curva azul correspondiente al DNA₃₈ abarca las fracciones 15-17 y corresponden a un peso molecular de 27 kDa, mientras que la curva roja con las fracciones 14-16, donde se encuentra SdrP, corresponden a un peso molecular de 44 kDa. El corrimiento hacia el eje de las ordenadas en la curva de color verde indica que el peso molecular de la muestra SdrP-DNA₃₈ es mayor que el de SdrP y el DNA₃₈ solos. Con estos datos podemos concluir que SdrP es capaz de unirse a la secuencia consenso de DNA₃₈ y que el complejo SdrP:DNA es suficientemente estable como para ser purificado por cromatografía de exclusión molecular. Estos resultados concuerdan con los reportados por Agari y colaboradores en el 2008, donde demuestran que SdrP es capaz de activar la transcripción sin necesidad de un efector alostérico, es decir, que SdrP se encuentra siempre en una conformación “activada”.

Caracterización de la estabilidad térmica de SdrP

La caracterización de la estabilidad térmica de SdrP se realizó con muestras purificadas por dos protocolos distintos. Uno de ellos corresponde al protocolo reportado por Agari y colaboradores en el 2008, mientras que el segundo corresponde a la metodología reportada en este trabajo. La principal diferencia consiste en que Agari y colaboradores utilizan en las primeras etapas de purificación un choque térmico de 70°C por 10 minutos como paso previo a la cromatografía líquida en columna.

El perfil de desnaturalización térmica de SdrP purificada con choque térmico (ScCt) se puede observar en la figura 10A. La gráfica representa el cambio de la intensidad de fluorescencia a 304 nm en función de la temperatura. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Boltzman obteniéndose una T_m de 35.6 °C +/- 0.32. Sin embargo, como puede observarse en la figura 10A, el ajuste de los datos no es bueno en el rango de 280-300 K y aparentemente no se alcanza la saturación del sistema. Analizando estos resultados y considerando que en un experimento típico de desnaturalización térmica o con agentes desnaturalizantes

uno espera obtener un comportamiento sigmoideo (Lara-González 2014). Se decidió repetir este análisis en presencia de un agente estabilizador de la estructura cuaternaria de las proteínas, en nuestro caso se utilizó trehalosa (Jai y Rajiv 2003, Nishant e Ipsita 2008). El perfil de desnaturalización térmica de una muestra de SdrP purificada en las mismas condiciones que el caso anterior pero en presencia de 0.8M de trehalosa, se puede observar en la figura 10B. En este caso es evidente que los datos describen dos curvas sigmoideas por lo que fueron ajustados a una ecuación doble de Boltzman y se calcularon dos valores de T_m que corresponden a la transición observada para cada sigmoide, con una T_{m1} de 21.2 °C +/- 0.45 y una T_{m2} de 46 °C +/- 0.74. El hecho de que durante la desnaturalización térmica se observen dos transiciones indica que probablemente se trata de un proceso de desnaturalización térmica en tres estados. En nuestro caso, al tratarse de una proteína dimérica, el proceso de desnaturalización podría incluir la siguiente transición: dímero plegado -> monómero plegado -> monómero desplegado.

Con los resultados anteriores nos preguntamos si la inestabilidad observada en SdrP podía deberse al choque térmico que se usa durante el proceso de purificación propuesto por Agari y colaboradores en 2008. Para ello analizamos una muestra de SdrP purificada sin choque térmico, es decir utilizando el protocolo descrito en este trabajo. En la figura 11 se puede observar el perfil de desnaturalización térmica de SdrP purificada sin choque térmico y sin trehalosa (SsCt), los datos fueron ajustados a la ecuación doble de Boltzman obteniéndose una T_{m1} de 13.73 °C +/- 0.3 y una T_{m2} de 43.49 °C +/- 0.49. Estos resultados apoyan un modelo de desnaturalización térmica en tres estados. Sin embargo aun queda pendiente el experimento de desnaturalización térmica de SdrP purificada sin choque térmico en presencia de trehalosa 0.8 M. Puesto que como se observa en la figura 11, los datos no muestran de forma clara las dos sigmoides que se observan en presencia de trehalosa (Figura 10B).

Continuando con la caracterización de SdrP en relación al posible proceso de desnaturalización térmica en tres estados que como se propuso anteriormente podría incluir dímero plegado -> monómero plegado -> monómero desplegado.

Analizamos la fluorescencia del ANS en presencia de SdrP a tres temperaturas 5, 34 y 70 °C. El ANS interacciona preferentemente con las regiones hidrofóbicas de las proteínas y cuando se encuentra unido a estas regiones hidrofóbicas y es excitado, su fluorescencia aumenta significativamente. Debido a esto, el ANS se utiliza como un reactivo para seguir el proceso de desnaturalización térmica de proteínas por ejemplo en experimentos de tipo termofluor (Matulis D. y col., 2005). En la figura 12 se puede observar la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de ANS a las tres temperaturas utilizadas. De acuerdo a nuestro modelo y en relación con los resultados de la figura 10B, a 5 °C podríamos tener a SdrP como dímero y en concordancia con esto la fluorescencia de ANS en comparación con las otras dos temperaturas es prácticamente nula. De acuerdo a nuestro modelo, a 34 °C tenemos el monómero plegado, en este caso el ANS podría interactuar con las regiones hidrofóbicas de la interface de dimerización expuestas al solvente y como consecuencia tenemos un aumento en la fluorescencia de ANS, como se observa en la curva roja de la figura 12. Finalmente, a 70 °C y de acuerdo con la $Tm2$ calculada de 42-44 °C tendríamos presente la forma desplegada del monómero y con ello una exposición significativa de regiones hidrofóbicas al solvente. Los datos en negro de la figura 12 concuerdan con nuestro modelo observándose un incremento notable de la fluorescencia de ANS. Sin embargo, aunque estos datos apoyan nuestro modelo de desnaturalización térmica en tres estados, necesitamos realizar experimentos adicionales que nos permitan identificar a cada una de las especies observadas en los estados de transición. Uno de estos experimentos podría ser un análisis de dispersión dinámica de luz de SdrP a las mismas temperaturas utilizadas con ANS. Podríamos diferenciar fácilmente el peso molecular en solución del dímero (44 kDa) y el monómero (22 kDa) para confirmar nuestro modelo.

Cristalización y difracción por rayos X del complejo SdrP-DNA₃₈

Cristalización

Los ensayos de cristalización se realizaron empleando la técnica de difusión de vapor en gota sentada a 16 °C. Después de 2-3 semanas de incubación, 11 de las 96 condiciones de cristalización presentaron cristales (Tabla 1). En base a propiedades como el tamaño y la forma/definición del cristal, se seleccionó la condición CS17 como la condición que produce los mejores cristales, esta condición contiene sulfato de litio 0.2 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 y 30% de polietilenglicol 4000 como precipitante. Otra condición en la cual también se producen cristales de buena calidad es la condición CS25 (Tabla 1). Ambas condiciones se utilizaron para producir mas cristales con un lote diferente de complejo SdrP:DNA₃₈, con el objetivo de observar reproducibilidad y contar con suficientes cristales para experimentos de difracción. Para ello, se prepararon experimentos de cristalización usando diferentes proporciones del complejo SdrP:DNA₃₈ con respecto del precipitante y un rango de concentración del complejo SdrP:DNA₃₈ por arriba y por debajo de la concentración usada en el experimento inicial (0.2 mM, 0.4 mM y 0.6 mM), estos cristales crecieron en los siguientes 3-4 días. Adicionalmente, se incluyó un control negativo en el cual se usó únicamente el amortiguador empleado en la preparación del complejo SdrP:DNA₃₈. Esto, con el objetivo de descartar la posibilidad de que los cristales que crecen en esta condición fueran de alguna sal y no de proteína. En la figura 13A se puede observar una de las condiciones en las que se obtuvieron cristales (CS22, Tabla 1).

Experimentos preliminares de difracción de rayos-X

Como se menciona en la sección de la metodología los cristales fueron incubados por 10-30 segundos en una solución crio-protectora como paso previo a los experimentos de difracción. Esta etapa fue necesaria puesto que el experimento se realiza a 100 K (-173 °C) con el objetivo de reducir al mínimo lo que se conoce como daño por radiación. La principal ventaja de trabajar a esta temperatura es que se puede coleccionar una serie de datos completos a partir de un solo cristal. Es

por eso que actualmente de forma rutinaria la colección de datos de difracción se hace a esa temperatura tanto en equipos de difracción de ánodo rotatorio, tubo sellado y en fuentes sincrotrón. Sin embargo, es necesario tener un agente crio-protector para evitar que se formen cristales de agua, puesto que estos difractan y forman anillos de difracción a 2.67 y 3.67 Å, superponiéndose a la difracción correspondiente a la proteína de interés (Garman 2010). Dependiendo de la solución precipitante en la que crece el cristal, es posible utilizar diferentes agentes crio-protectores, entre los más comunes se puede mencionar el glicerol a una concentración final de 20-25%, pero también se puede usar PEG de bajo peso molecular, MPD, etilen glicol, alcoholes, aceites e incluso sales (Garman E. y col 2003). En nuestro caso utilizamos como agente crio-protector PEG400 a una concentración final de 25-30% con lo que conseguimos obtener un estado vítreo alrededor del cristal.

Los cristales analizados por difracción de rayos X fueron los que crecieron en las condiciones CS22, CS41 y CS45 (Tabla 1). Es importante resaltar que los cristales producidos en las condiciones CS17 y CS25 que morfológicamente fueron los mejores, no han sido sometidos a este análisis. Para la colección de datos se utilizó el método de rotación, que es el método que se utiliza de forma rutinaria. Éste consiste, en coleccionar los datos de difracción mientras el cristal es rotado en pequeños incrementos, usualmente de 0.1° y hasta 2° (Rupp 2010). En nuestro caso para cada cristal analizado se tomaron 2 imágenes u oscilaciones con 1° de rotación, a 0° y a 90° de distancia. De las tres condiciones analizadas hasta la fecha, los mejores resultados que hemos obtenido fueron con los cristales de la condición CS45. A pesar de que estos cristales difractan a baja resolución, el análisis de estos datos con el paquete d*TREK nos permitió asignar un grupo espacial provisional $P4_12_12$ y una celda con las dimensiones $a=54$, $b=54$ y $c=147$ (Figura 13B). Las condiciones encontradas hasta ahora deben ser optimizadas para poder obtener cristales que difracten a alta resolución (1.5 a 3 Å). Por ejemplo, se puede hacer un análisis minucioso al rededor de la condición CS45 variando el pH, la concentración del precipitante o probando aditivos (sales, iones, detergentes). Alternativamente los cristales que ya tenemos podrían someterse a

un proceso de deshidratación (McPherson y col., 2011., Newman 2005). Sin embargo, con la información que tenemos hasta ahora podemos concluir lo siguiente. Los cristales que obtenemos al menos en el caso de la condición CS45 y las condiciones CS17 y CS25 son cristales de proteína. La primera observación experimental que sustenta esta conclusión son los experimentos de cristalización utilizando como control negativo el mismo amortiguador que se utilizó en la formación del complejo SdrP:DNA₃₈. En todos los casos el control negativo no formó cristales. Además, los cristales producidos en las condiciones CS17 y CS25 son extremadamente frágiles y se disuelven con el movimiento y con la manipulación directa bajo el microscopio, esto es típico de cristales de proteína. Sin embargo, la mejor evidencia de que se tratan de cristales de proteína se observan en la figura 13-B. En la figura se pueden observar que todas las intensidades colectadas, se encuentran a baja resolución. Por el contrario, un cristal de sal presenta muy pocas intensidades y normalmente éstas se encuentran a mediana y muy alta resolución. Mas aún, el tamaño de la celda calculado es muy grande para una sal que contiene pocos átomos. En este caso se puede hacer la siguiente estimación. Si consideramos un volumen promedio por residuo de aminoácido de 140 Å³ y un volumen promedio para cada base nitrogenada, pentosa y grupo fosfato del DNA de 314.3 Å³ (Nadassy y col. 2001, Pommie y col. 2004), el volumen del complejo SdrP:DNA₃₈ es aproximadamente de 80,446.8 Å³. El volumen de la celda calculada con las dimensiones a=54, b=54 y c=147 Å es de 428,652 Å³. Por lo que en este volumen podrían acomodarse dos complejos de SdrP:DNA₃₈ ocupando 38% del volumen de la celda, el 62% restante estaría ocupado por solvente. Estos datos concuerdan perfectamente con la mayoría de los casos reportados en el PDB donde se observa un rango de 40-78% de contenido de solvente (Rupp 2010).

Conclusión

En este trabajo, logramos obtener la proteína SdrP recombinante pura, utilizando el gen sintético de SdrP, el cual se subclonó eficientemente en el vector de expresión pET28-PPS obteniendo así la construcción pET28-PPS_SdrP. Las condiciones establecidas en nuestro protocolo de purificación nos permite obtener un rendimiento de proteína pura de 22 mg por litro de cultivo. En estas condiciones es posible concentrar nuestra muestra de proteína hasta 15-20 mg/ml.

A través del análisis de movilidad por cromatografía de exclusión molecular del complejo SdrP-DNA₃₈, pudimos determinar que la proteína SdrP purificada por choque térmico, es funcional. Al comparar el patrón de elución del complejo, con las muestras de SdrP sin DNA y de DNA₃₈ sin SdrP, pudimos determinar que SdrP es capaz de reconocer y unirse a esta secuencia consenso de 38 pb, permitiéndonos obtener el complejo SdrP:DNA₃₈. El complejo es estable y puede ser purificado por cromatografía de exclusión molecular.

El análisis preliminar de la desnaturalización térmica de SdrP indica que la proteína pasa del estado nativo al estado desnaturalizado a través de un intermediario que se puede detectar experimentalmente. Probablemente, los tres estados que observamos corresponden al dímero plegado -> monómero plegado -> monómero desplegado. A partir de estos datos, se estimaron dos valores de T_m para la muestra SdrP purificada sin choque térmico, 13.6 y 44.2 °C.

Tenemos una condición de cristalización para el complejo SdrP:DNA₃₈, que produce cristales capaces de difractar a 10-15 Å. Estos cristales son de proteína, pertenecen al grupo espacial $P4_12_12$ y tienen una celda de $a=54$, $b=54$ y $c=147$ Å.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACyT No CB2011-168710 y por el proyecto CONACyT INFRA No 204373. KEGR agradece al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la beca otorgada para la realización de este trabajo. Al Dr. José Sampedro Pérez, por su asesoría durante los experimentos de fluorescencia. Al Dr. Rubén Paul Gaytan por asesoramiento en la síntesis del DNA₃₈ y a la Dra. Adela Rodríguez Romero, por su asesoría durante el análisis por difracción de rayos X de los cristales de SdrP obtenidos en este trabajo.

Referencias

- Agari, Y., Kuramitsu, S., Shinkai, A. (2010). Identification of novel genes regulated by the oxidative stress-responsive transcriptional activator SdrP in *Thermus thermophilus* HB8. *FEMS Microbiol. lett.* 313, 127-134.
- Agari, Y., Kashiwara, A., Yokohama, S., Kuramitsu, S., Shinkai, A. (2008). Global expression mediated by *Thermus thermophilus* SdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.* 70(1), 60-75.
- Akyol, I., Comlekcioglu, U. (2009). Gene regulation and transcriptional regulation in bacteria. *G.U. Journal of Science.* 22(2), 77-82.
- Botsfor, L. J., Harman, J. G. (1992). Cyclic AMP in Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 56(1), 100-122.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.
- Browning, D.F., Busby, S.J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature.* 2, 1-9.
- Ebright, R. H., Ebright, Y. W., Gunasekera, A. (1989). Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* DNA site. *NAR.* 17(23), 10295-10305.
- Elspeeth F. Garman. (2010). Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care?. *Acta Cryst. D.* 66. 339–351.
- Emmer, M., de Crombrughe, B., Pastan, I., Perlman, R. (1970). Cyclic AMP receptor protein of *E. coli*: its role in the synthesis of inducible enzymes. *PNAS.* 66(2), 480-487.
- Garman, E. and Nave, C. (2003) Radiation damage to crystalline biological molecules: current view. *J. Synchrotron Radiat.*, 9, 327-328
- Harman JG. (2001). Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochemical et Biophysica Acta.* 1547:1-17.
- Jai K. Kaushik and Rajiv Bhat. (2003). Why is trehalose an exceptional protein stabilizer?. *JBC.* 278(29):26458-26465.

- Lara-González S., Estrella-Hernández P., Ochoa-Leyva A., Portillo-Tellez MdeC., Caro-Gómez LA., Figueroa-Angulo EE., Salgado-Lugo H., Miranda-Ozuna JFT., Ortega-López J., Arroyo R., Brieba LG., Benitez-Cardoza CG. (2014). Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication. *Proteins*. 82 (1), 22-33.
- Lawson, C., Swigon, D., Murakami, S. K., Darst, S. A., Berman, H. M., Ebright, R. H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Current opinion in structural biology*. 14, 10-20.
- Lee, D.J., Minchin, S.D., Busby, S.J.W. (2012). Activating transcription in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 125-152.
- Matulis, D., Kranz, J.K., Salemme, F.R., Todd, M.J. (2005). Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry*. 44(13). 5258-5266.
- Mcpherson, A., Nguyen, C, Cudney, R., Larson, S.B. (2011). The role of small molecule additives and chemical modification in protein crystallization. *Cryst. Growth Des.* 11, 1469-1474.
- Nadassay, K., Tomas-Oliveira, I., Alberts, I., Janin, J. Wodak, S.J. (2001). Estándar atomic volumes in double-stranded DNA and packing in protein-DNA interfaces. *Nucleic Acid Research*. 29(16), 3362-3376.
- Napoli, A. A., Lawson, L. C., Ebright, L. H., Berman, L. H. (2006). Indirect readout of DNA sequence at the primary-kink site in the CAP-DNA complex: recognition of pyrimidine-purine and purine-purine steps. *J. Mol. Biol.* 357, 173-183.
- Newman, J. (2005). Expanding screening space through the use of alternative reservoirs in vapor-diffusion experiments. *Acta. Crys. D*(61), 490-493.
- Nishant Kumar, Ipsita Roy. (2008). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*. 12:24-36.
- Oshima, T., Imahori, K. (1974). Description of *Thermus Thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. Nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a

- Japanese Thermal Spa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24(1), 102-112.
- Passner, J. M., Schultz, S. C., Steitz, T. A. (2000). Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 304, 847-859.
- Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G., Lefranc, M.P., (2004). IMGT standarizing criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J. Mol. Recognit.* 17, 17:32.
- Popovych, N., Tzeng, Shiou-Ru., Marco, T., Ebright, R.H. (2009). Structural basis for cAMP-allosteric control of the catabolite activator protein. *PNAS*, 106(17), 6927-6932.
- Rupp Bernhard (2010). *Biomolecular Crystallography. Garland Science*, 809p.

Tablas y figuras

Tabla 1. Condiciones de cristalización del complejo SdrP:DNA₃₈

En la siguiente tabla se enmarcan las condiciones donde se observó la formación de cristales del complejo SdrP:DNA₃₈.

No.	Condición	Origen
1	Citrato de sodio tribasico dihidratado 0.2 M HEPES sodio pH 7.5 0.1 M (+/-)-2-Metil-2,4-pentadiol 30% v/v	Cristal screen, condición 5
2	Cacodilato trihidratado de sodio pH 6.5 0.1 M Acetato de sodio trihidratado 1.4 M + PEG400	Cristal screen, condición 7
3	Sulfato de litio monohidratado 0.2 M Tris-HCl, pH 8.5 0.1M Polietilenglicol 4000 30% v/v	Cristal screen, condición 17
4	Acetato de sodio trihidratado 0.2 M Tris-HCl, pH 8.5 0.1 M Polietilenglicol 4000 30% v/v	Cristal screen, condición 22
5	Cacodilato trihidratado de sodio pH 6.5 0.1 M Acetato de sodio trihidratado 1.4 M	Cristal screen, condición 25
6	HEPES sodio, pH 7.5 0.1 M Tartrato de sodio potasico tetrahidratado 0.8M	Cristal screen, condición 29
7	Acetato de sodio trihidratado pH 4.6 0.1 M Formato de sodio 2M	Cristal screen, condición 34
8	Tris-HCl, pH 8.5 0.1 M Fosfato de amonio monobasico 2 M	Cristal screen, condición 48
9	Citrato de sodio tribasico dihidratado pH 5.6 0.1M Tert-butanol 35% v/v	Cristal screen 2, condición 17
10	HEPES sodio 0.1M 2-propanol 10% v/v PEG 4000 20% w/v	Cristal screen, condición 41
11	Acetato dihidratado de zinc 0.2 M Cacodilato trihidratado de sodio 0.1M	Cristal screen, condición 45

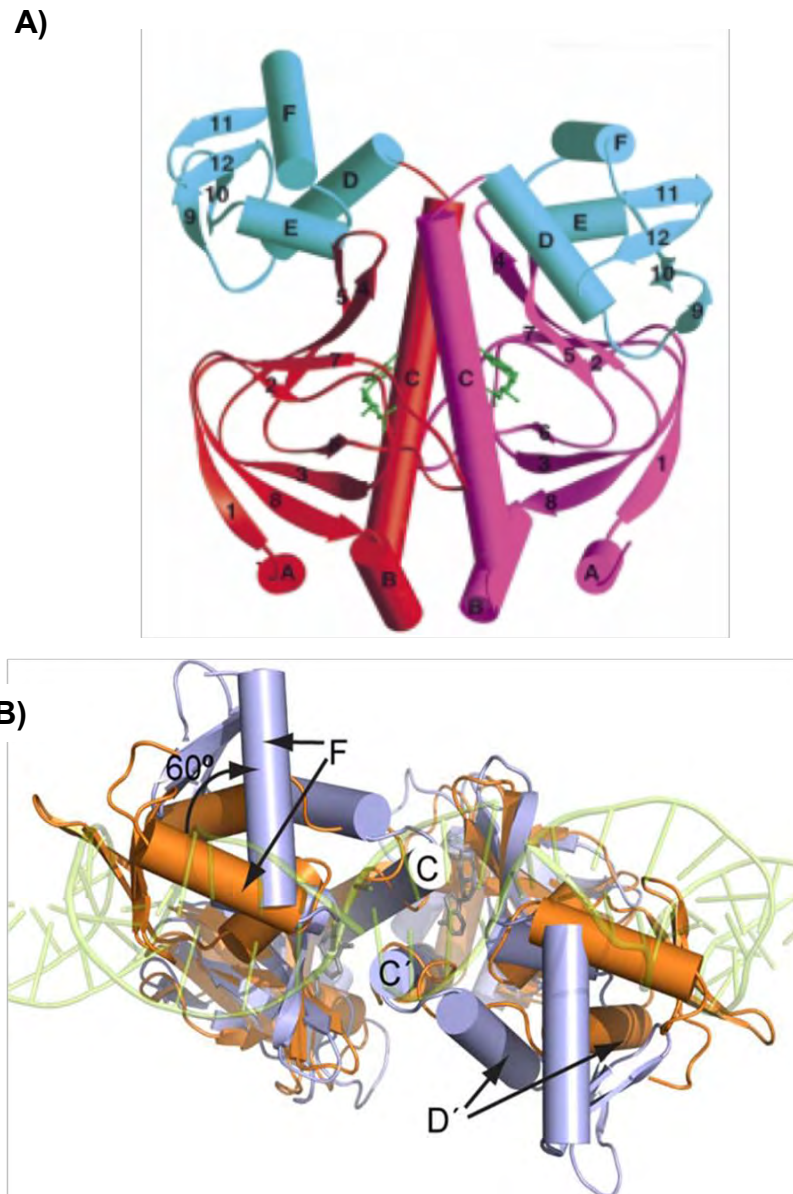


Figura 1. Estructura terciaria de CAP

A) La estructura del dímero de CAP se representa como flechas y tubos. Las hélices- α representadas como cilindros y las laminas- β como flechas. De color magenta la región N-terminal, en color cian la región C-terminal. En verde se representan las moléculas de cAMP unidas al sitio de unión de cAMP (Passner y col., 2000). B) Superposición del dominio de unión a DNA (DBD) de apo-CAP (anaranjado) y CAP-cAMP₂ (azul) (Harman 2001), señalando el giro de 60° de las hélices-F en ambas conformaciones (Popovych y col., 2009).

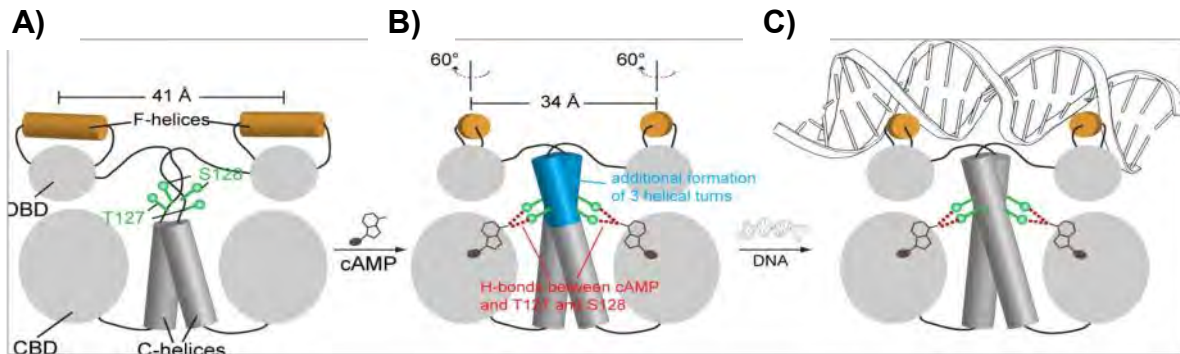


Figura 2. Interacciones intermoleculares determinantes en el cambio conformacional de CAP en presencia de cAMP

A) Estado inactivo: "Off" de CAP. En gris se muestran los dominios CBD y DBD. En verde los residuos Thr127 y Ser128, involucrados en la interacción directa con cAMP. En anaranjado las hélices-F en posición "off". B) Estado activado: "ON" de CAP en presencia de cAMP. En verde los residuos Thr127 y Ser128 forman puentes de hidrogeno con cAMP provocando la formación de la transición "coil-to-helix". Así mismo, en anaranjado las hélices-F se encuentran posicionadas 60° respecto a su posición original, estado "on". C) El cambio conformacional que provoca la transición del estado "off" al estado "on", permite a CAP interactuar con el surco mayor del DNA (Popovych y col. 2009).

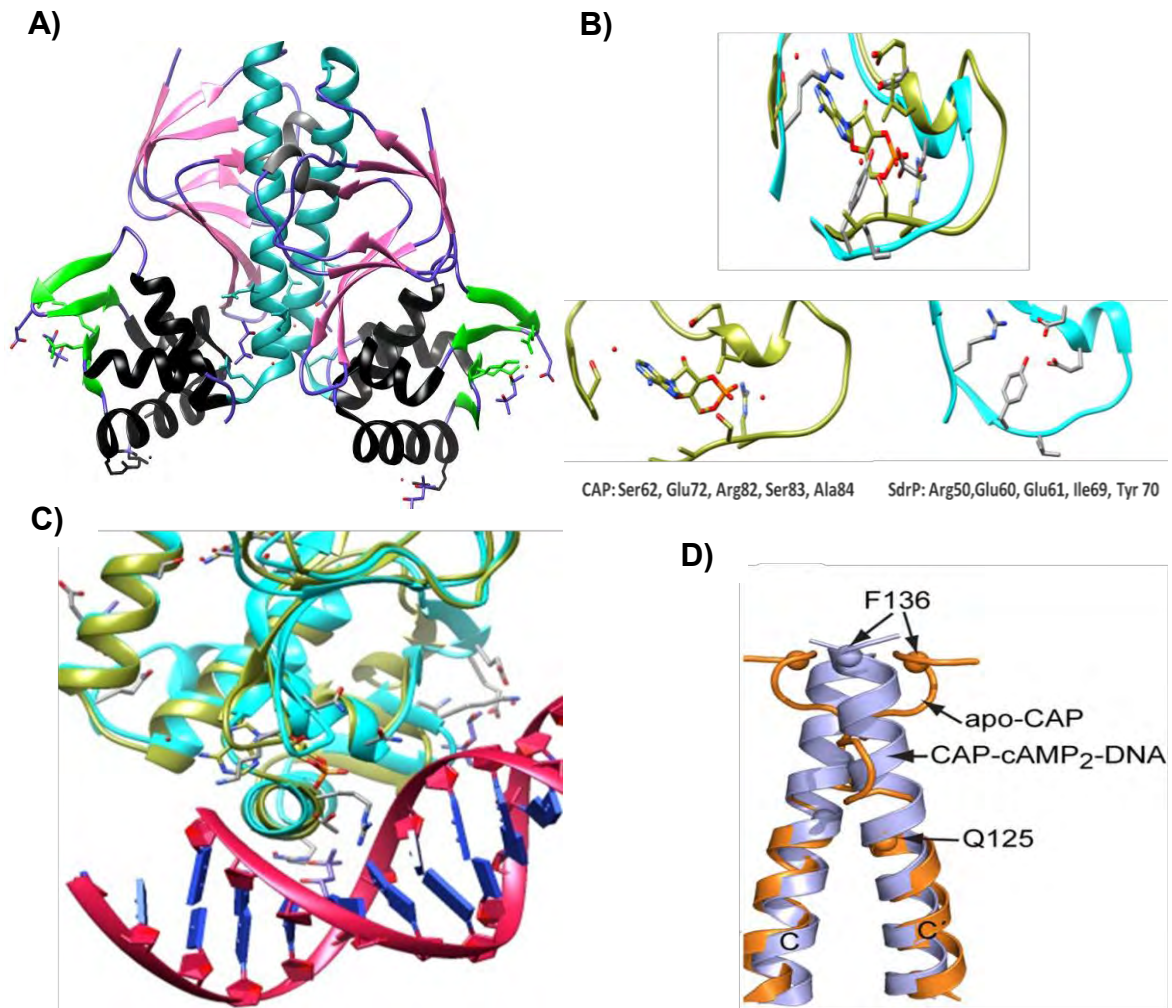


Figura 3. Alineamiento estructural de los CBD, DBD e interfaz de unión del dímero de CAP y SdrP

A) Estructura terciaria de SdrP, muestra la posición de sus estructuras secundarias, en cyan se presenta la región de dimerización. B) Alineamiento estructural del sitio de unión a catabolito de CAP (verde) y SdrP (cyan). C) Alineamiento estructural de la hélice-F de CAP y de la hélice-E de SdrP. D) Superposición de la región Val126-Phe136 de apo-CAP (anaranjado) y CAP-(cAMP)₂ (azul). El alineamiento estructural y manipulación de las estructuras se realizó con el software Chimera.

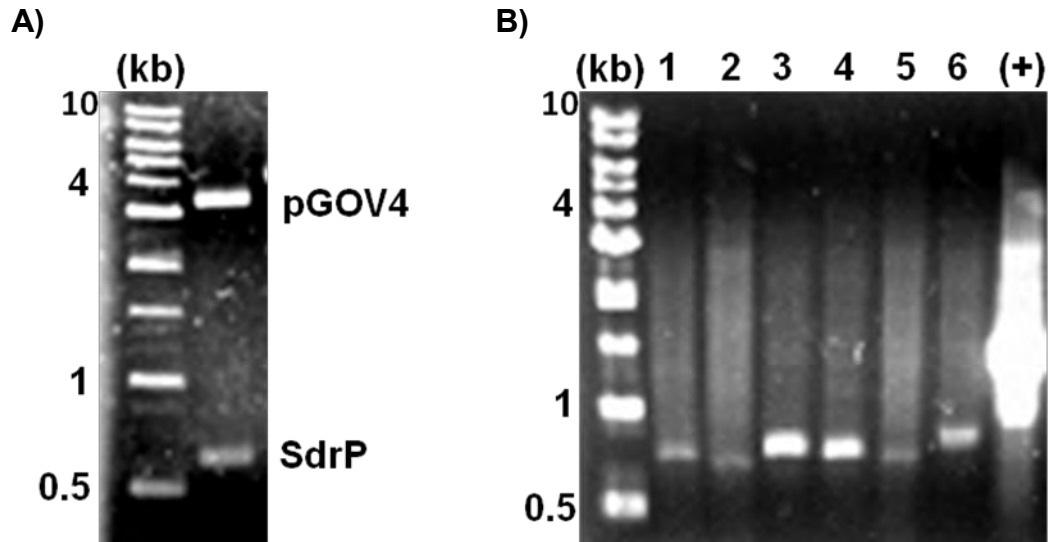


Figura 4. Digestión y clonación del gen sintético de SdrP

A) Digestión de la construcción pGOV4-SdrP. Se observan dos bandas, una de 4 kb (superior) correspondiente al vector pGOV4 y una banda de 700 pb correspondiente a SdrP (inferior). El análisis se realizó en geles de agarosa al 0.8 %. B) Análisis por PCR de colonia del gen sintético de SdrP. Las bandas de los carriles 1-6 representan el producto de PCR correspondiente al inserto clonado en el vector pET28, el análisis se realizó a en un gel de agarosa al 0.8%. Se utilizó como control positivo el vector pET19 (carril (+)).

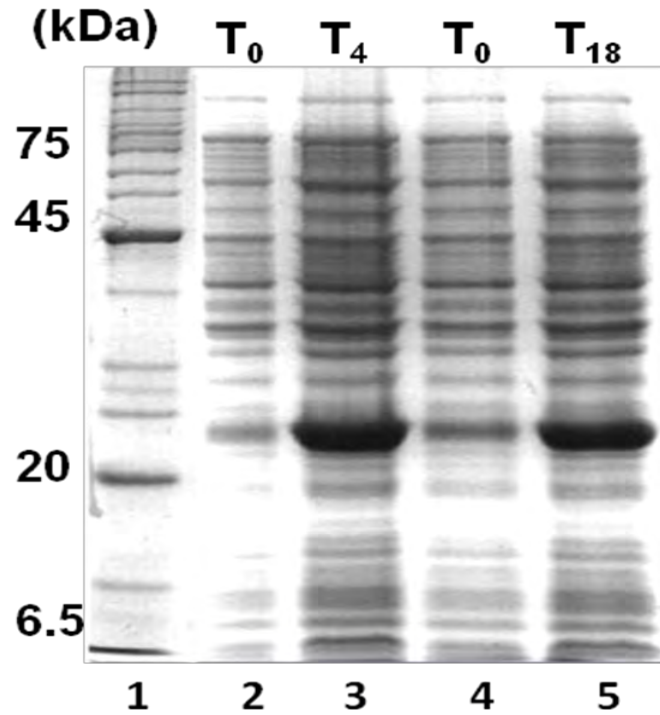


Figura 5. Ensayo de expresión de la proteína SdrP recombinante

Gel de poliacrilamida al 15%. Se muestra el análisis del ensayo de expresión de la proteína SdrP en el tiempo 0 y 4 horas después de la inducción para 37 °C (carriles 2 y 3). En el tiempo 0 y a las 18 horas para 18 °C (carriles 4 y 5). La inducción se realizó a una concentración 1 mM de IPTG.

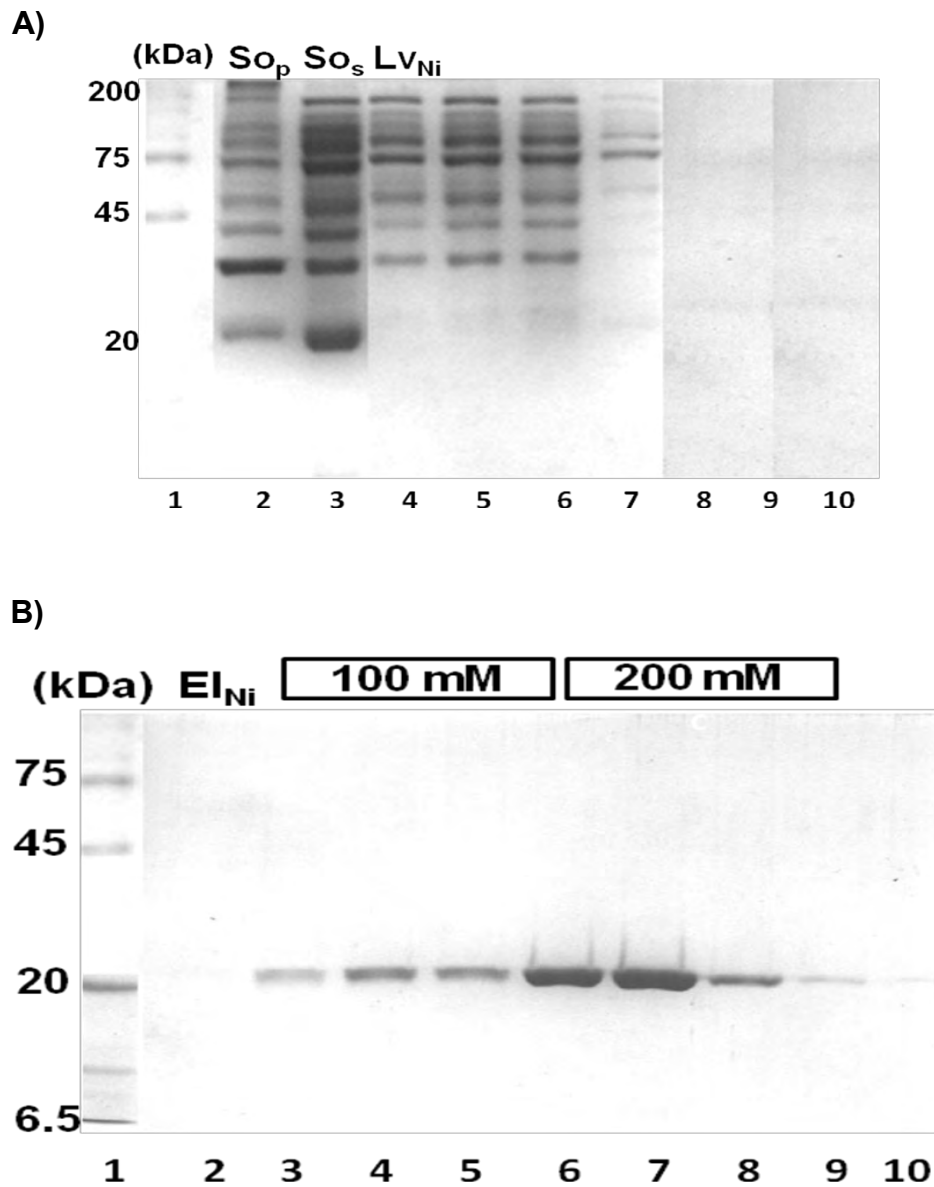


Figura 6. Primera etapa de Purificación (IMAC)

A) Muestras de la primera y segunda etapa de purificación. El pellet del sonicado (So_p), el sobrenadante del sonicado (So_s) y fracción del lavado de la columna Ni-NTA con 10 mM y 20 mM de imidazol (LV_{Ni}). B) Muestras de la elución de SdrP de la columna Ni-NTA (El_{Ni}). La muestra fue eluida con 100 mM y 300 mM de imidazol. El análisis se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%.

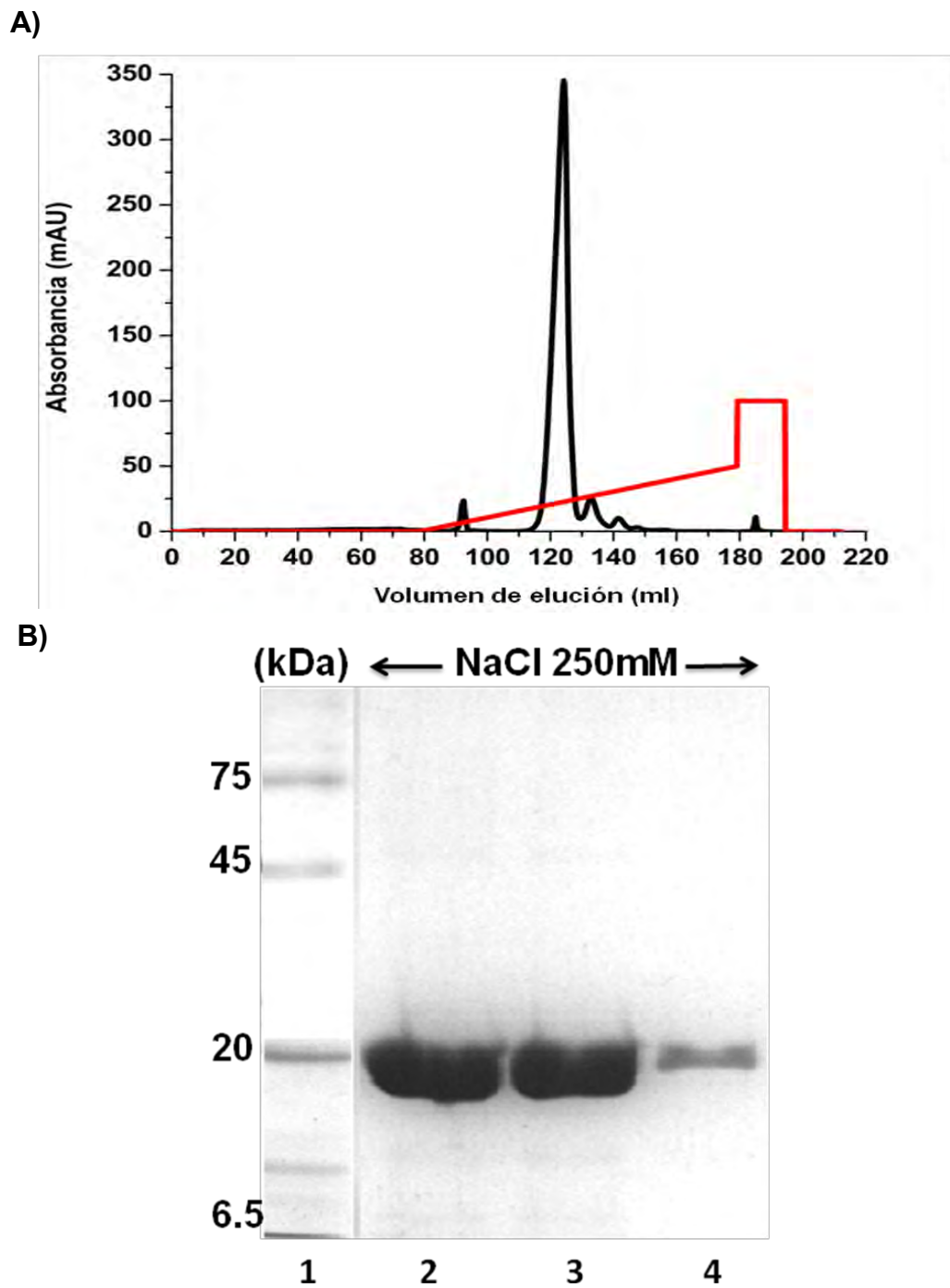
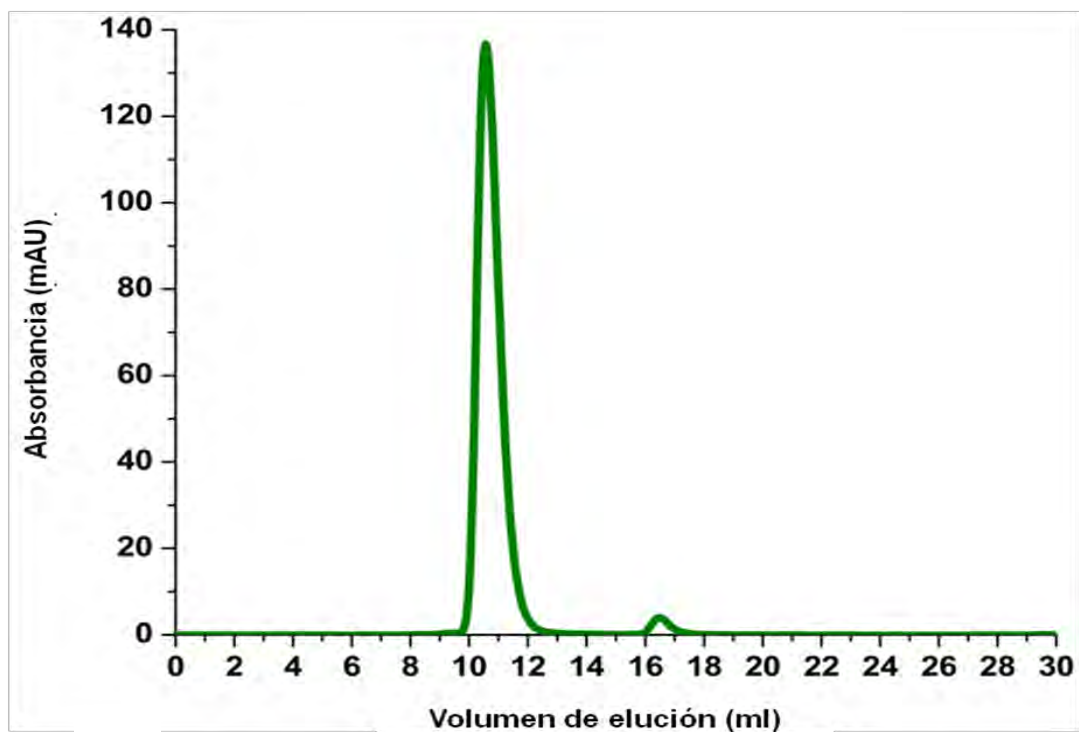


Figura 7. Segunda etapa de purificación (intercambio iónico)

A) Cromatograma de la purificación por intercambio iónico. Se esquematizan los picos correspondientes a la elución de SdrP (negro) y el aumento de la concentración de Buffer B en porcentaje (rojo). B) Gel de poliacrilamida al 15%. Muestras de las fracciones correspondientes al pico máximo (120 ml-140 ml).

A)



B)

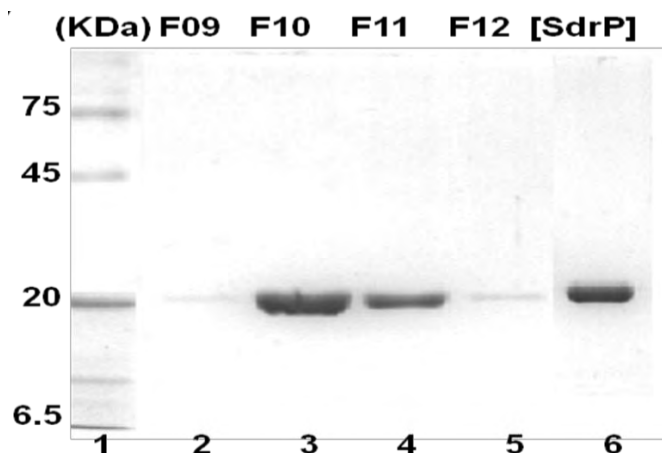


Figura 8. Tercera etapa de purificación (exclusión molecular)

A) Esquema cromatografico que representa el pico de elusión por cromatografía de exclusión molecular de la proteína SdrP (verde). B) Gel de poliacrilamida al 15%. Representa las fracciones correspondientes al pico máximo de la figura 5A, carriles 2, 3, 4, 5 (F09, F10, F11) y el concentrado de las tres fracciones ([SdrP]).

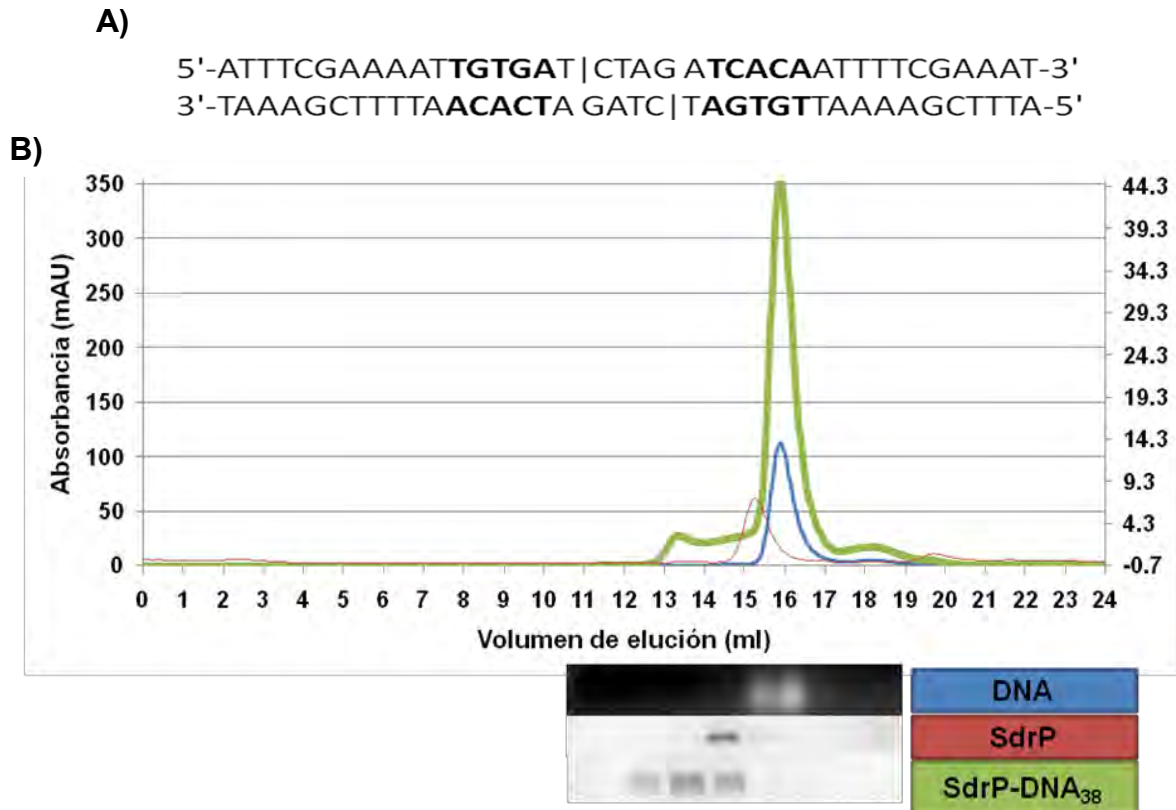
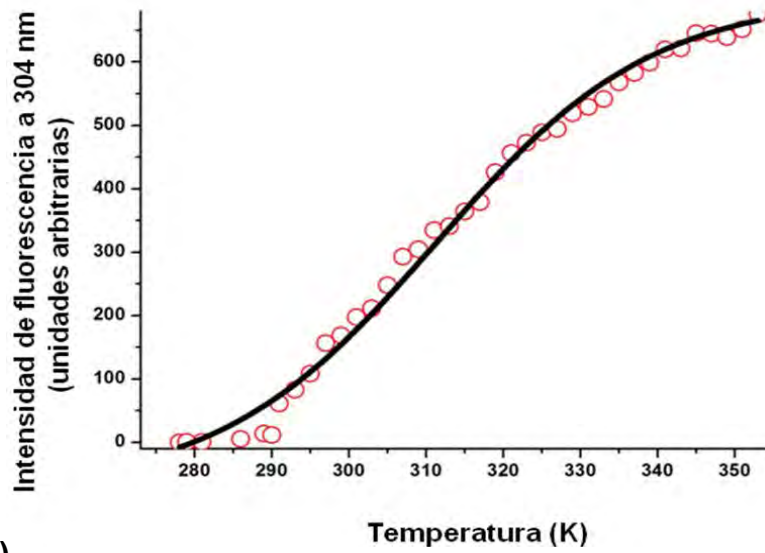


Figura 9. Análisis de la interacción entre SdrP y su secuencia consenso de DNA

A) Secuencia de 38 pb diseñada para realizar el análisis de la formación del complejo SdrP-DNA₃₈. B) Esquema cromatográfico del ensayo de movilidad del complejo SdrP-DNA₃₈. Se esquematizan la muestra de SdrP-DNA₃₈ (verde), SdrP (guinda) y DNA₃₈ (azul), obtenidos por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200. El análisis de las fracciones correspondientes a los picos máximos de cada cromatograma se realizó en geles de poliacrilamida al 15% para las proteínas y gel de agarosa al 4% para el DNA.

A)



B)

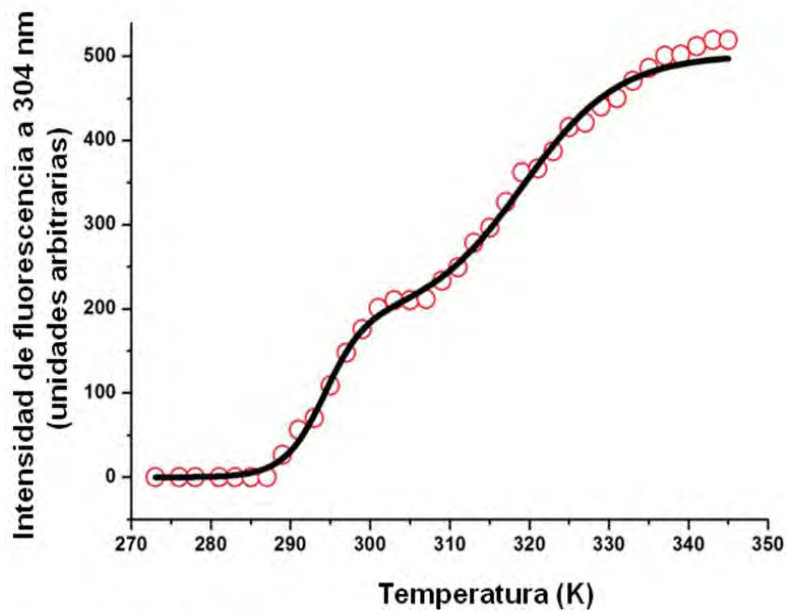


Figura 10. Desnaturalización térmica de la muestra ScCt de SdrP

A) Curva de desnaturalización de la muestra ScCt en ausencia de trehalosa. B) Curva de desnaturalización de la muestra ScCt en presencia de trehalosa 0.8 M.

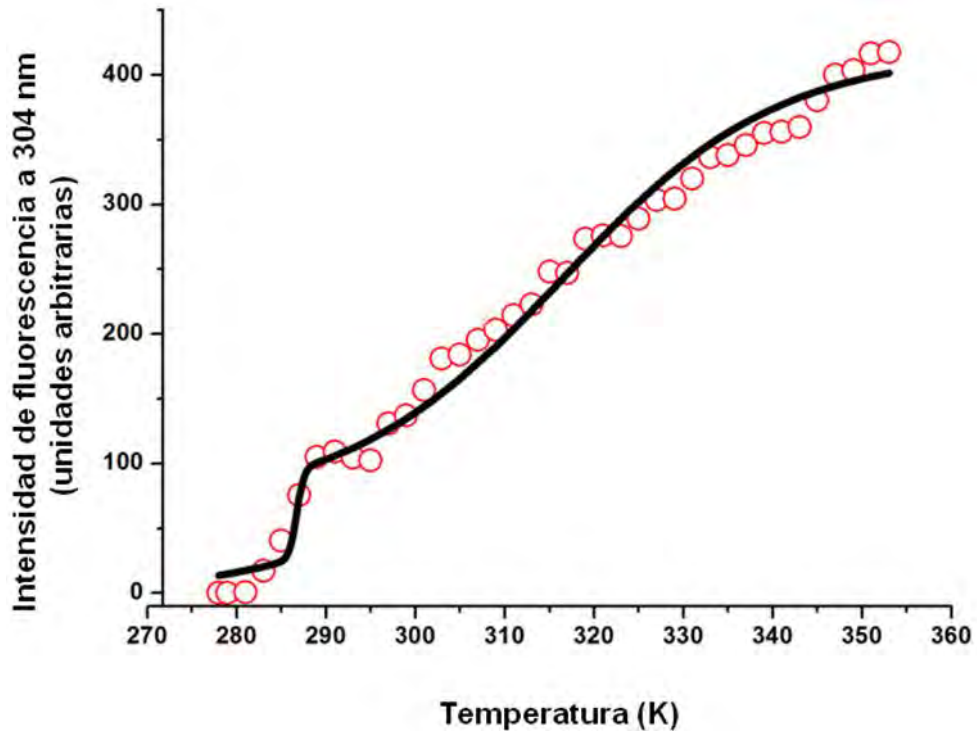


Figura 11. Desnaturalización térmica de la muestra SsCt de SdrP

Gráfica de la desnaturalización térmica de SsCt. Los datos del incremento en la fluorescencia fueron ajustados matemáticamente con la ecuación doble de Boltzmann.

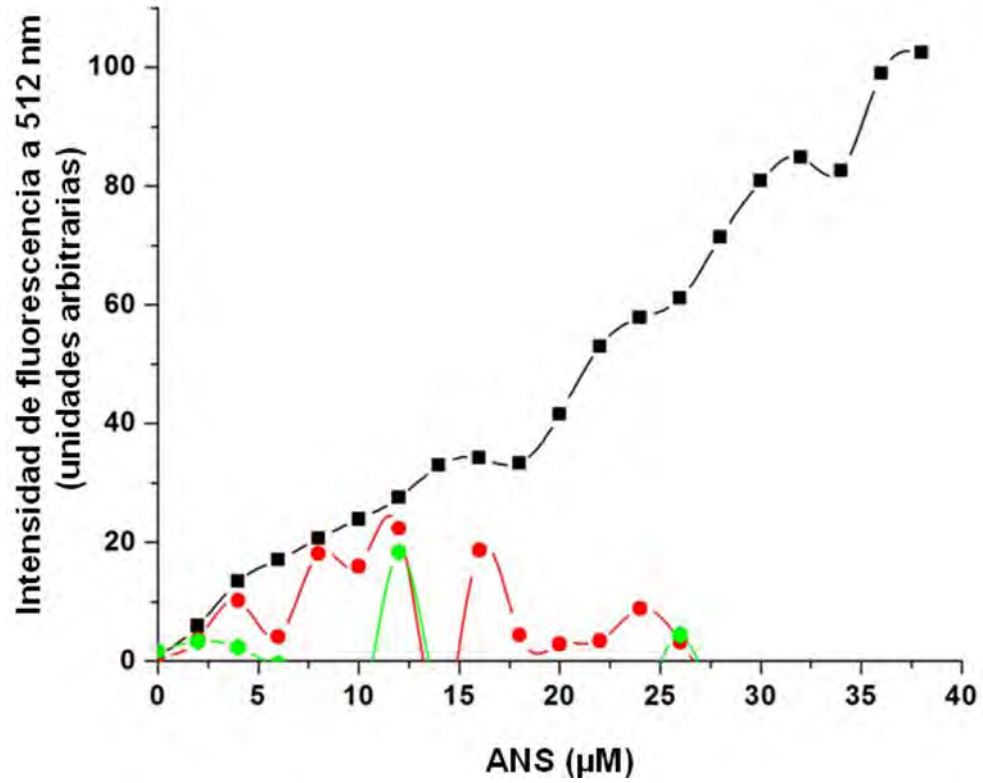
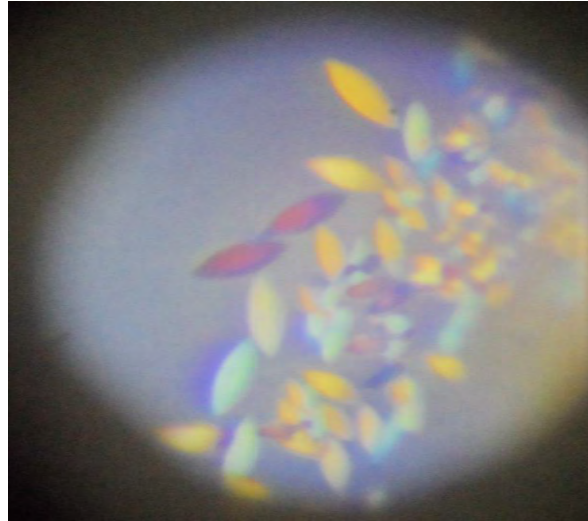


Figura 12. Análisis de la desnaturalización de SsCt en presencia de ANS

Seguimiento de la desnaturalización de SdrP utilizando ANS. Gráfica de la desnaturalización térmica de SdrP seguida por ANS. Se representa las curvas correspondientes a la titulación de SdrP con ANS a 5 °C (verde), 34 °C (rojo) y 70 °C (negro).

A)



B)

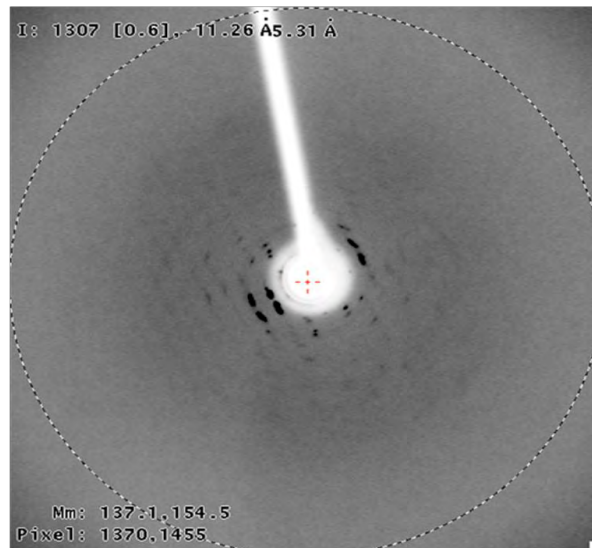


Figura 13. Ensayo de cristalización del complejo SdrP-DNA

A) Cristal del complejo SdrP-DNA₃₈ obtenido con el kit Cristal Screen HR2-110 (Hampton research), en la condición 0.1M de cocadilato de sodio trihidratado pH.- 6.5 y 1.4 M de acetato de sodio trihidratado. B) Patrón de difracción del complejo SdrP-DNA₃₈.