



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Purificación y caracterización bioquímica de una proteína de *Trypanosoma cruzi*
homóloga a RNAsas P proteicas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Sergio Aguirre Sampieri

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Torres Larios
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Rudiño Piñera - Instituto de Biotecnología UNAM

Dr. Enrique Merino Pérez - Instituto de Biotecnología UNAM

MÉXICO, D. F. Junio, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Índice	3
Índice de Figuras y Tablas	6
Abreviaturas.....	9
Agradecimientos	11
Resumen	12
Abstract.....	13
Introducción	14
Las moléculas de tRNA deben ser procesadas para ser funcionales	14
El procesamiento de los tRNAs requiere de RNasa P	14
La enorme mayoría de las RNasas P son ribozimas	16
Existen algunas proteínas con actividad de RNasa P	17
En el complejo mitocondrial humano (mtRNasa P), la subunidad proteica MRPP3 contiene el sitio activo	18
Existen homólogos de MRPP3 (PRORPs) con actividad de RNasa P	18
La estructura tridimensional de PRORP1 muestra paralelismos con la RNasa P basada en RNA	19
Proteínas PRORP en tripanosomátidos	21
La actividad de RNasa P no es necesaria en la mitocondria de los tripanosomátidos.....	21
Los tripanosomátidos son organismos de interés médico y comercial	22
Planteamiento del problema	26
Hipótesis	27
Objetivos.....	27
Objetivos Particulares.....	27
Materiales y métodos.....	28
Obtención y diseño del gen que codifique a la proteína TcPRORP2	28
Expresión y solubilización de la PRORP 2 de <i>T. cruzi</i>	29
Geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE.....	29
Análisis de sobre-expresión o purificación por “lote”	30
Purificación de la PRORP2 de <i>T. cruzi</i>	30
Espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS)	32
Búsqueda de bases de datos	32
Ensayos de desplazamiento térmico y búsqueda de fragmentos	33
Síntesis del precursor de tRNA	34
Prueba para verificar que la proteína purificada se encuentre libre de RNasas.....	35
Ensayos de actividad de RNasa P	35
Ensayo de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA)	35
1. Análisis de expresión de las proteínas TcPRORP 1 y 2 por purificación en “lote”	36
1.1. La expresión en las cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) resulta en proteína no expresada o insoluble.....	36

2. La expresión en las cepas Rosetta-gami(DE3)pLacI y OrigamiB(DE3)pLacI, así como un amortiguador distinto, permiten la expresión de la proteína TcPRORP2Δ-29 de forma soluble	39
3. La proteína TcPRORP2Δ-29 tiene una baja afinidad por la resina de níquel	41
4. La purificación de TcPRORP2Δ-29 se logró a través de un protocolo de cinco pasos	43
5. La identidad de la proteína TcPRORP2Δ-29 se comprobó por espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS)	48
6. De acuerdo a ensayos de desplegamiento térmico monitoreado por fluorescencia la proteína TcPRORP2Δ-29 presenta alta estabilidad térmica	49
7. El protocolo de purificación de cinco pasos permite la obtención de una proteína libre de RNasas	51
8. La proteína TcPRORP2Δ-29 parece no mostrar actividad de RNasa P sobre un sustrato canónico.	52
9. La proteína TcPRORP2Δ-29 parece unir al tRNA de acuerdo a Ensayos de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA).....	54
Discusión	56
1. La expresión en las cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) resultó en proteína expresada de manera insoluble	56
2. El cambio de cepa de sobre-expresión, así como un cambio en la composición del amortiguador usado permitieron la obtención de la proteína TcPRORP2Δ-29 en forma soluble	56
2.1. La expresión en forma soluble de la proteína TcPRORP2Δ-29 se logró con el uso de la cepa de <i>E. coli</i> OrigamiB(DE3)pLacI	56
2.2.1. El uso de un amortiguador con 1.5 M de NaCl permitió la solubilización de la proteína	58
2.2.2. Uso de arginina 40 mM en el amortiguador	59
3. La proteína TcPRORP2Δ-29 tiene una baja afinidad por la resina de níquel, por lo que la cantidad de proteína purificada permanece baja	59
4. La purificación de TcPRORP2Δ-29 se logró a través de un protocolo de cinco pasos; sin embargo, la proteína muestra restos de contaminantes.....	60
5. La identidad de la proteína TcPRORP2Δ-29 fue comprobada por espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS)	60
6. La proteína TcPRORP2Δ-29 muestra una estabilidad térmica inesperada	61
6.1. El remplazo de lisina → arginina ayuda a incrementar la estabilidad térmica de las proteínas	62
6.2. Las proteínas termoestables tienen mayor número de aminoácidos cargados que sus homólogos mesófilos	62
6.3. El incremento en elementos de estructura secundaria ayuda a estabilizar las proteínas	64
6.4. La mayoría de las diferencias en el modelo de TcPRORP 2 parecen ubicarse en regiones de la superficie	65
7. El protocolo de purificación de cinco pasos permite la obtención de una proteína libre de RNasas	66
8. Los ensayos de actividad de RNasa P muestran que la TcPRORP2Δ-29 parece incapaz de realizar la maduración del extremo 5'	67

9. Los experimentos de EMSA confirman que la TcPRORP2 Δ -29 es capaz de unir al pre-tRNA y revelan la presencia de distintos estados de oligomerización.....	67
9.1. Posible diversidad de sustratos de TcPRORP2	68
Conclusión	69
Perspectivas	70
Bibliografía.....	72
Anexos	75

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Estructura terciaria del tRNA.....	14
Figura 2. Reacción de la RNasa P.....	15
Figura 3. Estructura de la holoenzima RNasa P bacteriana.....	17
Figura 4. Estructura de la PRORP 1 de <i>A. thaliana</i>	19
Figura 5. Comparación del modo de unión entre la RNasa P canónica y las enzimas PRORP.....	20
Figura 6. Modelo propuesto de la transcripción, procesamiento y edición del tRNA ^{Trp} en <i>L. tarentolae</i>	22
Figura 7. Características distintivas del metabolismo de RNA en tripanosomátidos.....	23
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos de <i>A. thaliana</i> PRORP1 y <i>T. cruzi</i> PRORP2.....	25
Figura 9. La Proteína TcPRORP1Δ-88 se sobre-expresa de manera insoluble en la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus.....	37
Figura 10. Los ensayos de purificación por “lote” en condiciones desnaturalizantes confirman la sobre-expresión de TcPRORP1Δ-88 en la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus.....	38
Figura 11. La cepa de <i>E. coli</i> OrigamiB(DE3)pLacI permite la expresión de la proteína TcPRORP2Δ-29 en la fracción soluble.....	39
Figura 12. La proteína TcPRORP2Δ-29 se sobre-expresa de manera soluble en la cepa de <i>E. coli</i> OrigamiB(DE3)pLacI	40
Figura 13. La expresión de la proteína TcPRORP2Δ-29 es inducible con 1mM de IPTG a 37°C por 4 hrs.....	41
Figura 14. La mayor parte de la proteína TcPRORP2Δ-29 no se une a la resina de níquel a una concentración de 10 mM de imidazol en el amortiguador de lisis	42
Figura 15. Diagrama representativo del protocolo de purificación utilizado para TcPRORP2Δ-29.....	43
Figura 16. La mayor cantidad de proteína TcPRORP2Δ-29 es eluída de la columna de níquel con una cantidad de 30 mM de imidazol.	44
Figura 17. La fracción eluída en 6% es la que presenta una mayor cantidad de proteína y menor cantidad de contaminantes	44
Figura 18. La etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína TcPRORP2Δ-29 es eliminada por la proteasa TEV.....	45
Figura 19. La eliminación de la etiqueta de histidinas permite purificar nuevamente la proteína TcPRORP2Δ-29 por un nuevo paso de afinidad a Níquel....	46
Figura 20. La proteína TcPRORP2Δ-29 tiene un punto isoelectrico calculado de 6.28, por lo que es retenida en una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, 1 ml).....	47

Figura 21. La proteína TcPRORP2Δ-29 no es desnaturalizada después de una incubación a 65°C por 45 min	47
Figura 22. Representación de las intensidades relativas de los espectros del experimento de espectrometría de masas en tándem MS/MS.....	49
Figura 23. Secuencia de la proteína TcPRORP2 identificada por espectrometría de masas en tándem MS/MS analizada con el software Scaffold.....	49
Figura 24. Curvas de desnaturalización térmica de las proteínas modelo AtPRORP1 Δ-61 y HsTIM.....	50
Figura 25. La proteína TcPRORP2Δ-29 es estable a altas temperaturas.....	51
Figura 26. La proteína purificada TcPRORP2Δ-29 parece estar libre de RNAsas.....	52
Figura 27. La TcPRORP2Δ-29 parece incapaz de realizar el corte del extremo 5' del pre-tRNA ^{Phe} , a diferencia de AtPRORP1 Δ-61 y la RNasa P de <i>T. marítima</i>	53
Figura 28. El experimento de cambio de movilidad electroforética muestra la unión de TcPRORP2Δ-29 con el pre-tRNA.....	54
Figura 29. Secuencias de aminoácidos de la TcPRORP2 donde se muestran las cisteínas.....	57
Figura 30. Modelo de la TcPRORP2 obtenido a través de modelado por homología con el servidor SWISS-MODEL generado a partir de la estructura resuelta de la PRORP1 de <i>A. thaliana</i> (código PDB 4G26).....	58
Figura 31. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos de AtPRORP1 y TcPRORP2 donde se indican las características que se cree pueden brindar estabilidad térmica a las proteínas.....	63
Figura 32. Comparación de las estructuras determinadas a partir de datos experimentales de AtPRORP1 (código PDB 4G26) y generadas a partir de modelado por homología de TcPRORP2.....	65
Figura 33. Modelo de la TcPRORP2 mostrando los aminoácidos expuestos al solvente que se cree pueden estar incrementando la estabilidad térmica de la proteína	66
Figura S1. Los genes PRORP se encuentran distribuidos en distintos linajes eucariotas.....	76
Figura S2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de MRPP3 y las proteínas PRORP de <i>A. thaliana</i>	80
Figura S3. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos de la RNasa P Proteica Mitocondrial Humana 3 (MRPP3) y las proteínas PRORP de <i>T. cruzi</i>	81

Tabla 1. Sustratos endógenos de la RNasa P canónica.....	16
Tabla 2. Distintos genes y construcciones de las proteínas PRORP empleadas durante el estudio.....	24
Tabla 3. La expresión de distintas construcciones de RNasas P Proteicas en diferentes cepas de <i>E. coli</i> lleva a la expresión de proteína de forma soluble e insoluble.....	36
Tabla S1. Combinaciones de antibióticos utilizados con las distintas cepas de <i>E. coli</i>	77
Tabla S2. Composición final del medio complejo auto inducible ZYM-5052.....	77
Tabla S3. Composición final del medio mínimo auto inducible MDA-5052 (50 mM fosfatos) suplementado con amino ácidos.....	78
Tabla S4. Composición de la mezcla de metales usados con el medio mínimo auto inducible MDA-5052	79

Abreviaturas

AtPRORP.- *Arabidopsis thaliana* PRORP.

BLAST.- Basic Local Alignment Search Tool.

DNA.- Ácido Desoxirribonucleico.

dsRNA.- RNA de cadena doble (double strain RNA).

DTT.- Dithiothrietol.

EDTA.- Ácido etilen-diamino-tetra-acético.

ELISA.- Ensayo inmunoabsorbente ligado a Enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay).

EMSA.- Ensayo de cambio de movilidad electroforética (Electrophoresis Shift Assay).

ExPASy.- Sistema de Análisis de Proteína Experto (Expert Protein Analysis System).

FPLC.- Cromatografía Líquida de Rápido Desempeño (Fast Performance Liquid Chromatography).

HEPES.- Ácido (2-Hydroxyethyl)-1-piperazina ethanosulfónico.

HsTIM.- *Homo sapiens* Triosa Fosfato Isomerasa.

IMAC.- Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography).

IPTG.- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

LC/MS/MS.- Cromatografía Líquida / Espectrometría de Masas en Tándem.

LTQ-FT.- Espectrometría de Masas Híbrida.

MOPS.- Ácido 3-(N-morpholino)propanesulfónico.

MRPP.- Proteína Mitocondrial Ribonucleasa P (Mitochondrial Ribonuclease P Protein).

mRNA.- Ácido Ribonucleico Mensajero (messenger RNA).

mtRNaseP.- Ribonucleasa P Mitocondrial (Mitochondrial RNase P).

MWCO.- Tamaño del poro de peso molecular (Molecular Weight Cut Off).

NCBI.- National Center for Biotechnology Information.

NEB.- New England Biolabs.

Ni-NTA.- Níquel- Ácido Nitriloacético.

NYN.- Nucleasa Nedd4-BP1 YacP (Nedd4-BP1 YacP Nuclease).

PAGE.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (Polyacrilamide Gel Electroforesis).

PDB.- Protein Data Bank.

PEG.- Polietilenglicol.

Pi.- punto isoeléctrico.

PIN.- PilT N-terminal.

ppm.- Partes por millón.

PPR.- Repetición Pentatricopéptido (Pentatricopeptide Repeat).

PRORP.- Ribonucleasa P Proteica (Proteinaceous RNase P).

pre-tRNA.- Precursor del Ácido Ribonucleico de Transferencia.

PSIPRED.- Protein Structure Prediction Server.

RNA.- Ácido Ribonucleico.

RNasa P.- Ribonucleasa P.

rpm.- Revoluciones por minuto.

rRNA.- Ácido Ribonucleico Ribosomal.

RT-PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time-Polymerase Chain Reaction).

SAXS.- Dispersión de Rayos X de Angulo Pequeño (Small Angle X-ray Scattering)

snoRNA.- RNA pequeño nuclear (small nucleolar RNA).

ssRNA.- RNA de cadena sencilla (single strain RNA).

TEV.- Tobacco Etch Virus.

TcPRORP.- *Trypanosoma cruzi* PRORP.

Tm.- Temperatura media de desnaturalización.

tmRNA.- Acido Ribonucleico de transferencia-mensajero (transfer messenger RNA)

Tris.- Tris(hidroximetil)aminometano.

tRNA.- Ácido Ribonucleico de Transferencia (transfer RNA)

Agradecimientos

Agradecemos al CONACYT por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría número de CVU 486976 y el apoyo al proyecto 164838, así como al Programa de la UNAM de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN201213 “Estudios estructurales sobre Ribonucleasa P”; también agradecemos a la Dra. Marta Contreras Zentella por el préstamo y asesoramiento en el uso del bio-reactor utilizado en el estudio, y a la Dra. Adelaida Díaz Vilchis por la ayuda y asesoramiento brindados durante el desarrollo de la investigación.

Resumen

En los últimos años se ha descubierto que existen proteínas con actividad de ribonucleasa P (RNasa P), es decir, que son capaces de realizar la maduración del extremo terminal 5' de los pre-tRNAs. En la mayoría de los organismos, la RNasa P es un complejo ribonucleoproteico cuya actividad catalítica radica completamente en la sub-unidad de RNA, por lo que el descubrimiento de esta familia de proteínas es de amplio interés. En este trabajo se realizó la obtención y caracterización parcial de una proteína derivada de una secuencia de DNA mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* (TcPRORP2), homóloga a RNasas P Proteicas (PRORPs). El producto del gen sintético fue expresado en células de *E. coli* OrigamiB(DE3)pLacI y solubilizado en un amortiguador de lisis compuesto por NaCl 1.5 M, arginina 40 mM y 10% de glicerol. Después de 5 pasos de purificación, la proteína se mantiene soluble en un amortiguador compuesto por NaCl 25 mM, Tris 50 mM pH 8.0, ZnSO₄ 10 μM, 2-β mercaptoetanol 5 mM, ácido cítrico 5 mM y 10% de glicerol. La identidad de la proteína fue confirmada por espectrometría de masas. Experimentos en geles de retardo indican que la proteína parece capaz de unir a las moléculas de pre-tRNA, pero a diferencia de otras RNasas P Proteicas, parece no ser capaz de realizar la maduración del extremo 5' de un pre-tRNA canónico. Lo anterior hace sentido con el hecho de que, en tripanosomátidos, los tRNAs son importados al interior de la mitocondria como moléculas maduras, al menos en el contexto de los extremos terminales 5' y 3'. Es posible que otras moléculas de RNA, aún sin identificar, sean los sustratos naturales de esta enzima.

Abstract

Recently, some proteins have been found to have RNase P activity, which are able to process the 5' end of pre-tRNA. In most organisms, RNase P is a ribonucleoprotein complex whose activity resides entirely on the RNA subunit, so the discovery of this family of proteins has been of great interest. Here we show the purification and partial characterization of a mitochondrial sequence homologue of these Proteinaceous RNase P's (PRORP's) from *Trypanosoma cruzi* (TcPRORP2). The product of the synthetic gene was overexpressed in *E. coli* Origami(DE3) cells and solubilized in a lysis buffer containing 1.5 M NaCl, 40 mM arginine and 10% glycerol. After five purification steps, the protein was soluble in a buffer containing 25 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 10 μ M ZnSO₄, 5mM 2- β mercaptoethanol, 5 mM citric acid and 10% glycerol. LTQ-FT LC/MS/MS confirmed the identity of the protein. According to EMSA experiments, the protein seems to binds pre-tRNA, but unlike other PRORP proteins characterized so far, it seems unable to hydrolyze the 5' end of a canonical pre-tRNA. This makes sense since, in trypanosomatids tRNA's are imported as mature molecules, in terms of the 3' and 5' terminal ends. It is possible that other RNA molecules, still unidentified, are the natural substrates of this enzyme.

Introducción

Las moléculas de tRNA deben ser procesadas para ser funcionales

Los RNAs de transferencia (tRNAs) son moléculas clave en la decodificación de la información del código genético. Para que los tRNAs cumplan su función, deben ser procesados y modificados post-transcripcionalmente. En eucariotas, los tRNAs son transcritos por la RNA polimerasa III como un precursor con extensiones en los extremos terminales 5' y 3' (secuencias “leader” y “trailer”, respectivamente). Estas extensiones son eliminadas o procesadas por distintas enzimas, siendo el producto final una molécula de tRNA de una longitud estándar (76 nucleótidos), (Figura 1); (Nakanishi, K. y Nureki, O., 2005).

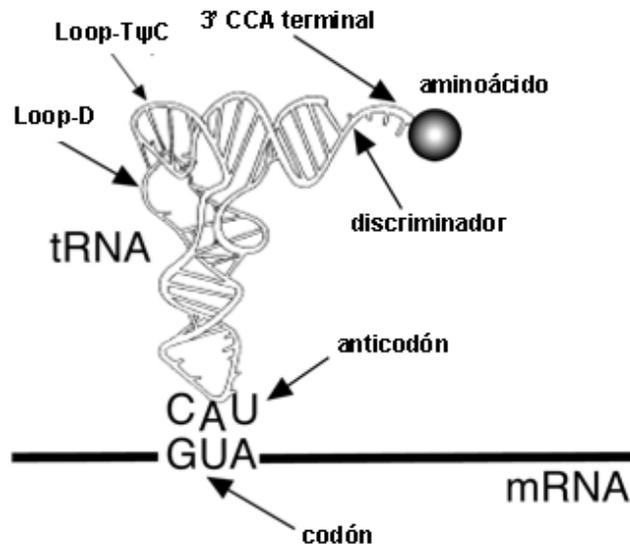


Figura 1. Estructura terciaria del tRNA. Tomado de Nakanishi, K. y Nureki, O., 2005.

El procesamiento de los tRNAs requiere de RNasa P

Hasta hace algunos años se asumía que la RNasa P, basada en RNA, era la única molécula responsable de la escisión endonucleolítica del extremo 5' de los tRNAs. Por medio del reconocimiento de elementos presentes en la estructura secundaria y terciaria del pre-tRNA, esta RNasa lleva a cabo la hidrólisis del enlace fosfodiéster (Reiter N. J. *et al.*, 2010), cortando un fragmento del extremo 5' de la molécula de tRNA. El producto de esta serie de reacciones es una

molécula de tRNA madura que mantiene un grupo fosfato (PO_4) en el extremo 5' y un grupo OH en el extremo 3', así como una pequeña molécula de RNA 5' leader (Figura 2). Dicho proceso es conocido como la maduración del extremo 5' de los tRNAs, que es esencial en todos los dominios de la vida y referido como actividad de RNasa P (Frank D. N. y Pace N. R., 1998).

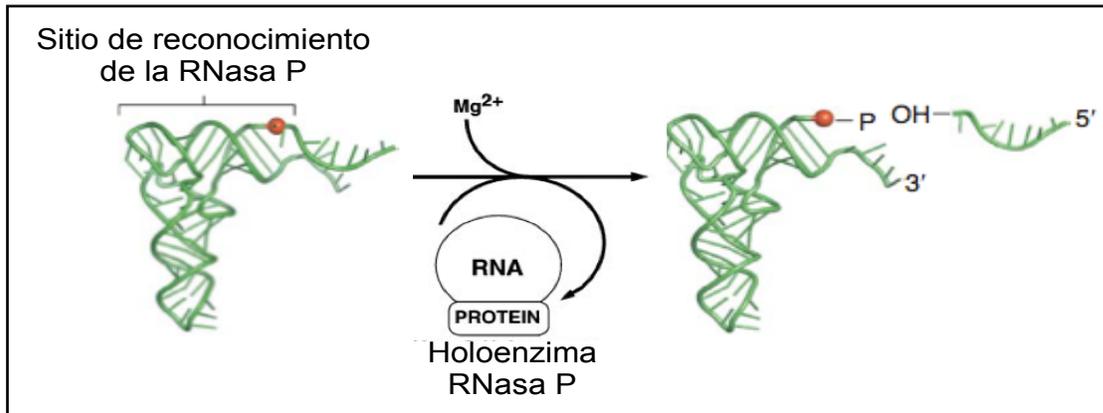


Figura 2. Reacción de la RNasa P. En presencia de cationes divalentes (Mg^{2+}), la Ribonucleasa P corta la secuencia del extremo 5' de los pre-tRNAs, dejando un grupo fosfato en el extremo 5' de la molécula de tRNA y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. La esfera roja indica el sitio de corte. Adaptado de Evans D. *et al.*, 2006 ; Frank D. N. y Pace N. R., 1998.

Aunado a su papel en la maduración del extremo 5' de los tRNAs, al día de hoy se conocen múltiples sustratos que son editados por la RNasa P canónica: algunos RNAs virales, RNA pre-4.5S, pre-tmRNA, algunos mRNAs, el RNA pequeño nuclear U6 y riboswitches, entre otros (Tabla 1), (Hernández-Cid A. *et al.*, 2012).

Tabla 1.*Sustratos endógenos de la RNasa P canónica.* Adaptado de Hernández-Cid A. *et al.*, 2012

Bacteria	Eucaria	Archea
Extremo 5' leader de los pre-tRNA (5'-leader)	5'-leader	5'-leader
Precursor 4.5S RNA	Transcrito 1 de adenocarcinoma asociado a metástasis de pulmón (MALAT1)	
M3 RNA inducido por Φ80	RNAs no codificante como el transcrito Men β	
C4 RNA antisentido derivado de fagos	RNAs no codificantes como HRA1	
CI RNA P4 de fagos	Precursor de tmRNA	
mRNA Polycistrónico del operon de histidina	RNA de Viperina	
RNA de <i>E. coli</i> derivado de regiones intergénicas no codificantes, ej: operon de lactosa	Pre-rRNA	
Estructuras transientes de riboswitches	snoRNA de la Caja C/D	
RNAs Virales no-tRNA, ej: RNA del Virus del Mosaico Amarillo del Nabo (TYMV)	Distintos RNAs nucleares en <i>S. cerevisiae</i>	
tmRNA, también conocido como 10Sa RNA		
ColE1 RNA		
OLE RNA de bacterias extremófilas		

La enorme mayoría de las RNAsas P son ribozimas

En la mayoría de los organismos, la RNasa P es un complejo ribonucleoproteico, formado por un único componente de RNA catalítico (Guerrier-Takada, C. *et al.*, 1983), iones divalentes y una subunidad proteica en *Bacteria* (Figura 3), al menos nueve en *Eucaria* y cinco en *Archea* (Hartmann, Enno y Hartmann, Roland K., 2003); (Hernández-Cid A. *et al.*, 2012). Sin embargo, la molécula de RNA es capaz de realizar la maduración del pre-tRNA *in vitro* en ausencia de la subunidad proteica a elevadas concentraciones de magnesio (100 mM Mg²⁺) (Frank D. N. y Pace N. R., 1998), por lo que se piensa que la adición de sub-unidades proteicas para formar la holoenzima, es un acontecimiento evolutivo relativamente reciente y la RNasa P ancestral debió estar desprovista de proteína (Hartmann, Enno y Hartmann, Roland K., 2003), siendo una única molécula de RNA catalítica; es decir, una auténtica ribozima.

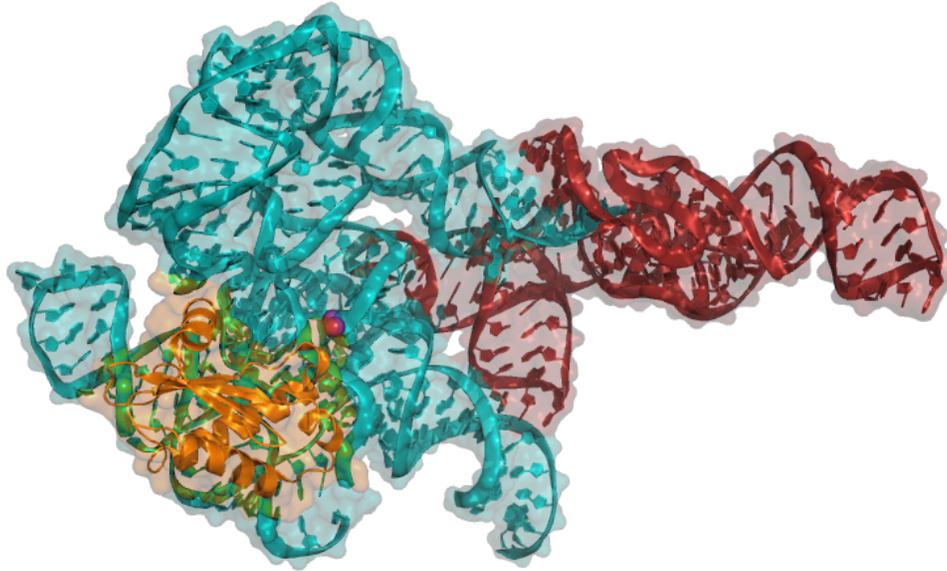


Figura 3. Estructura de la holoenzima RNasa P bacteriana. ([Reiter N. J. *et al.*, 2010] código PDB 3Q1R). La subunidad catalítica de RNA está dividida en 2 dominios: el dominio de especificidad (rojo) y el dominio catalítico (cian), la holoenzima bacteriana además está compuesta por una única subunidad proteica (naranja) e iones divalentes (magenta).

En la actualidad, sólo se conocen dos complejos moleculares cuya actividad catalítica está basada únicamente en RNA y su número de recambio es mayor a uno (capaces de catalizar una reacción por más de una sola vez). Dichos complejos moleculares son el ribosoma y la RNasa P (Torres-Larios A. *et al.*, 2006).

Existen algunas proteínas con actividad de RNasa P

En el año 2008, el descubrimiento de los componentes moleculares de la RNasa P de la mitocondria humana (mtRNasa P), reveló que en humanos existe un complejo mitocondrial con actividad de RNasa P compuesto exclusivamente por tres proteínas. Este complejo no requiere del componente de RNA para mantener su actividad catalítica; a su vez las proteínas que forman el complejo mitocondrial son llamadas MRPP1, 2 y 3 (siglas en inglés de Mitochondrial Ribonuclease P Protein), con motivos correspondientes a una tRNA metiltransferasa (MRPP1), una cadena corta de un miembro de la familia deshidrogenasa-reductasa (MRPP2) y una

proteína, hasta ese momento de función y origen evolutivo desconocidos (MRPP3), (Holzmann, J. *et al.*, 2012).

En el complejo mitocondrial humano (mtRNasa P), la subunidad proteica MRPP3 contiene el sitio activo

Los análisis de la secuencia de aminoácidos de MRPP3, revelaron la presencia de dos motivos de repeticiones de 35 aminoácidos (PPR o pentatricopéptidos) e identificaron otros bloques de secuencias conservadas en el extremo C-terminal de la proteína, los cuales parecían caracterizar una nueva familia de genes presente en animales, plantas y en la mitocondria de tripanosomátidos (kinetoplasto). En uno de estos bloques se encontró una secuencia conservada de cuatro aminoácidos: tres aspartatos y una histidina, la cual se sabe forma parte del sitio activo de coordinación de iones en proteínas de la clase metalonucleasa. Sin embargo, a pesar de las características individuales de MRPP3, es necesaria la presencia de las tres proteínas MRPP para reconstituir la actividad de RNasa P *in vitro* (Holzmann, J. *et al.*, 2012).

Existen homólogos de MRPP3 (PRORPs) con actividad de RNasa P

Posteriormente, en el año 2009, otro grupo de investigación identificó tres ortólogos de MRPP3 en el genoma de *Arabidopsis thaliana*; al igual que MRPP3, los tres ortólogos también poseen un dominio PPR y un dominio metalonucleasa con una secuencia altamente conservada de tres aspartatos y una histidina, junto con la etiqueta de los aminoácidos DXMRDH, conteniendo el tercer aspartato y la histidina, en el mismo sitio en donde se ha identificado la etiqueta metalonucleasa en MRPP3 (Gobert A. *et al.*, 2010).

Dichas características definieron a una nueva familia de nucleasas relacionadas llamadas PRORPs (siglas en inglés para PROteinaceous Rnase P). Las tres isoformas de *A. thaliana* fueron nombradas PRORP1, PRORP2 y PRORP3. La proteína PRORP1 de *A. thaliana* se ha identificado localizada en mitocondrias y cloroplastos, mientras que PRORP2 y PRORP3 se han localizado exclusivamente en el núcleo de *A. thaliana* (Gobert A. *et al.*, 2010), se ha demostrado que éstas son capaces de reconstituir, de manera individual, la actividad de RNasa P (Gutmann B. *et al.*, 2012).

Análisis subsecuentes de bases de datos y experimentales muestran que los genes PRORP son prevalentes en múltiples linajes eucariontes evolutivamente distantes como: protozoarios (*Ostreococcus tauri* y *Trypanosoma brucei*), (Lai L. B. *et al.*, 2011); (Taschner A. *et al.*, 2012), plantas (*A. thaliana*), (Gobert A. *et al.*, 2010) y mamíferos (*Ailuropoda melanoleuca*); (Figura S1 y Figura 8) (Gobert A. *et al.*, 2010).

La estructura tridimensional de PRORP1 muestra paralelismos con la RNasa P basada en RNA

A mediados del año 2012, se determinó la estructura de una de las isoformas de las PRORPs de *A. thaliana* (PRORP1), (Howard M. J. *et al.*, 2012); la estructura (Figura 4) confirmó la existencia de un dominio de la clase metalonucleasa unido a un dominio PPR, a través de un dominio de unión a zinc (Howard M. J. *et al.*, 2012).

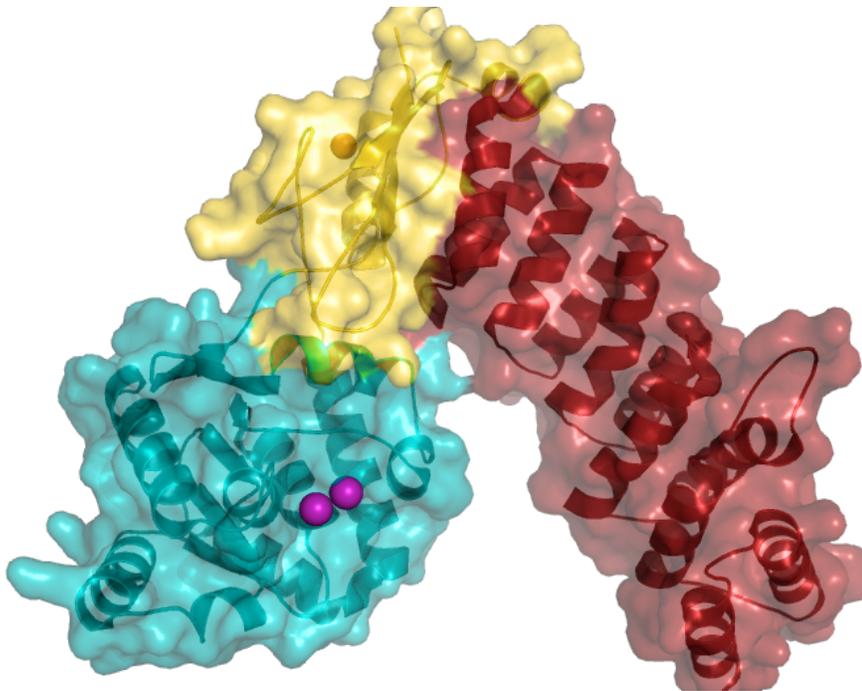


Figura 4. Estructura de la PRORP 1 de *A. thaliana* ([Howard M. J. *et al.*, 2012] código PDB 4G24). La estructura, resuelta a una resolución de 1.75 Å, confirma la existencia de un dominio metalonucleasa (cian) unido a un dominio compuesto por 5.5 PPRs (rojo), a través de un dominio de unión a zinc (amarillo). En magenta se presentan dos iones de magnesio unidos al supuesto sitio activo coordinados por tres aspartatos invariables en todas las proteínas PRORP y en naranja, el ión de zinc. Estudios de Gutmann B. *et al.*, 2012, indican la unión específica de un átomo de zinc por cada molécula de PRORP.

La estructura también reveló que el plegamiento del dominio metalonucleasa pertenece a la familia de nucleasas NYN (Nedd4-BP1 YacP Nuclease), que es miembro de la superfamilia de ribonucleasas PIN (PiIT N-terminal). El dominio NYN se encuentra en todas las ramas del árbol de la vida; a menudo fusionado a motivos de unión a RNA, este dominio ha evolucionado para adoptar distintos papeles en el procesamiento de RNA (Howard M. J. *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que las enzimas PRORP reconocen al pre-tRNA a través del brazo aceptor del tRNA y que el dominio del anticodón es dispensable. Se ha demostrado que los determinantes de unión se deben encontrar en los residuos altamente conservados del tRNA como: la G18 en el asa D, y la C56 y R57 en el asa T ψ C, lo que muestra un modo de unión similar entre la RNasa P canónica y las enzimas PRORP (Figura 5), (Gobert, A. *et al.*, 2013), y sugiere que las enzimas PRORP son capaces de reconocer cualquier estructura canónica en forma de tRNA.

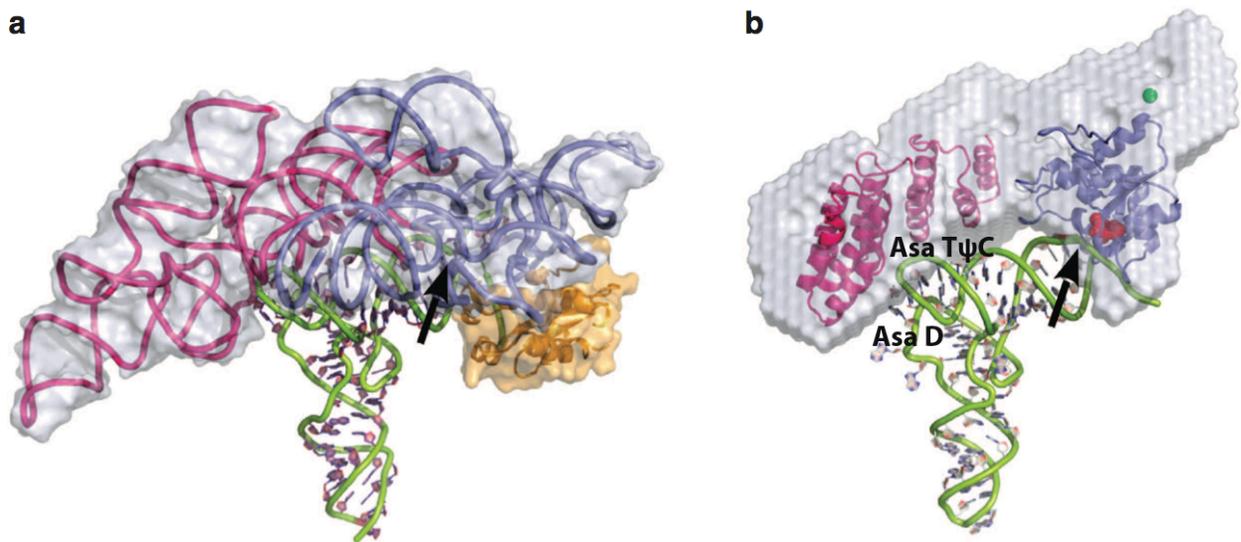


Figura 5. Comparación del modo de unión entre la RNasa P canónica y las enzimas PRORP.

- (a) Estructura de la holoenzima RNasa P de *Thermotoga maritima* (código PDB 3Q1R). Se presenta el dominio catalítico en azul y dominio de especificidad en violeta, la única subunidad proteica se presenta en naranja y el sustrato en verde.
- (b) Modelo de *A. thaliana* PRORP 2 (código PDB 2G24) en la misma orientación y colores. El dominio catalítico (NYN) se presenta en azul, con los residuos conservados de aspartatos presentados como esferas rojas; el dominio de unión a RNA (PPR) se presenta en violeta. La interacción y posición con el tRNA se predijeron a partir de los datos obtenidos de experimentos de SAXS. El ión de zinc se encuentra indicado por una esfera verde en la región central. Las flechas en negro indican el sitio de corte. Tomado de Gobert A. *et al.*, 2013.

Proteínas PRORP en tripanosomátidos

A mediados del año 2012, el grupo de investigación responsable del descubrimiento de las proteínas MRPPs, reportó haber identificado y aislado dos proteínas PRORP de *T. brucei*, una presente en el núcleo y la otra en el kinetoplásto. Éstas fueron nombradas PRORP 1 y 2 respectivamente (Taschner A. *et al.*, 2012). Demostraron que la proteína PRORP1 es la responsable del procesamiento de los pre-tRNAs en el núcleo de *T. brucei*, lo cual concuerda con estudios bioinformáticos previos que habían fallado en hallar candidatos de secuencias que codificaran a la subunidad de RNA de la RNasa P canónica en el genoma de estos organismos (Michaeli S. *et al.*, 2012). También identificaron que en tripanosomátidos, como en otros eucariotas, coexiste más de una forma de PRORP: una presente en el núcleo (PRORP1) y una distinta en el kinetoplásto (PRORP2), reportando que ambas tienen actividad de RNasa P (Taschner A. *et al.*, 2012).

La actividad de RNasa P no es necesaria en la mitocondria de los tripanosomátidos

En contraste con levaduras y plantas, en tripanosomátidos como *Leishmania* y *T. brucei*, se ha demostrado que el juego completo de tRNAs debe ser importado al kinetoplasto, ya que el mismo no posee genes que codifiquen a tRNAs en su genoma (Nabholz C. E. *et al.*, 1999).

Un estudio previo *in vivo* ha demostrado que la importación de un tRNA heterólogo a la mitocondria de tripanosomátidos es independiente de las secuencias genómicas en el extremo 5', demostrando que dicho tRNA es capaz de ser importado al interior de la mitocondria de tripanosomátidos independientemente de su contexto genómico (Hauser, R., y A. Schneider, 1995). A su vez, estudios experimentales han fallado en obtener evidencia de la existencia de pre-tRNAs mitocondriales en *Leishmania tarentolae* y *T. brucei*, sugiriendo que las moléculas de pre-tRNA presentes en la mitocondria de estos organismos, deben encontrarse en forma madura; es decir, sin extensiones en el extremo terminal 5'. (Aphasizhev, R. *et al.*, 1998). Asimismo se ha demostrado que el procesamiento de los extremos terminales 5' y 3' de los tRNAs; citosólicos y mitocondriales, ocurre en el núcleo antes de ser exportados al citosol (Kapushoc, S. T. *et al.*, 2000).

En conjunto, estos resultados corroboran datos experimentales previos, obtenidos en sistemas *in vivo* e *in vitro* de *T. brucei* y *Leishmania sp.*, que indican que en los tripanosomátidos las moléculas de tRNA deben de encontrarse como tRNAs maduros para poder ser importados al interior de la mitocondria (Kapushoc, S. T. *et al.*, 2000), (Figura 6), lo que resulta en juegos casi idénticos de tRNAs en el citosol y en la mitocondria (Nabholz C. E. *et al.*, 1999). Esto es sorprendente, debido a que una RNasa P Proteica mitocondrial ha sido recién caracterizada en *T. brucei* (Taschner A. *et al.*, 2012).

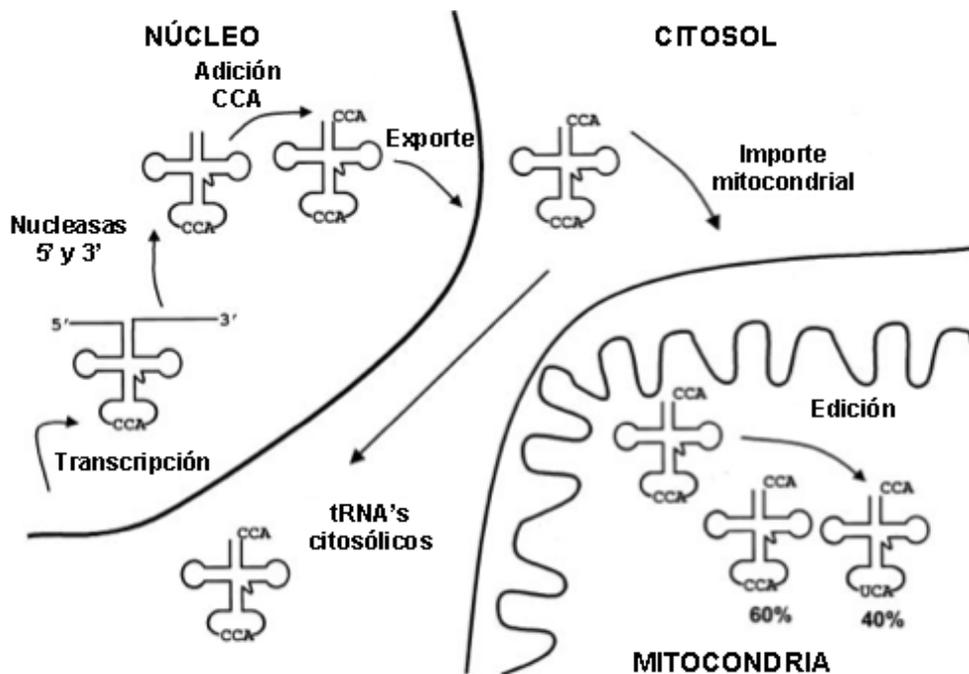


Figura 6. Modelo propuesto de la transcripción, procesamiento y edición del tRNA^{Trp} en *L. tarentolae*. El tRNA es transcrito a partir del genoma nuclear con extensiones en los extremos terminales 5' y 3'. Después del procesamiento de los extremos terminales, una secuencia CCA es adicionada al extremo 3' del tRNA en el interior del núcleo. El tRNA procesado es entonces exportado al citosol. Una porción del tRNA exportado se mantiene en el citosol y una porción es importada al interior de la mitocondria (Kapushoc S. T. *et al.*, 2000).

Los tripanosomátidos son organismos de interés médico y comercial

Los tripanosomátidos son organismos unicelulares del orden *Kinetoplastida* y representan una de las ramas más antiguas del linaje *Eucariota*. Caracterizados por la presencia de un sólo

flagelo y una sola mitocondria, cuyo genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta región (dentro de la propia mitocondria y cerca de la base del flagelo), denominada kinetoplasto (Figura 7), (Simpson L. *et al.*, 1996). Diversas especies son patógenas en humanos y animales domésticos, siendo objeto de interés médico y comercial.

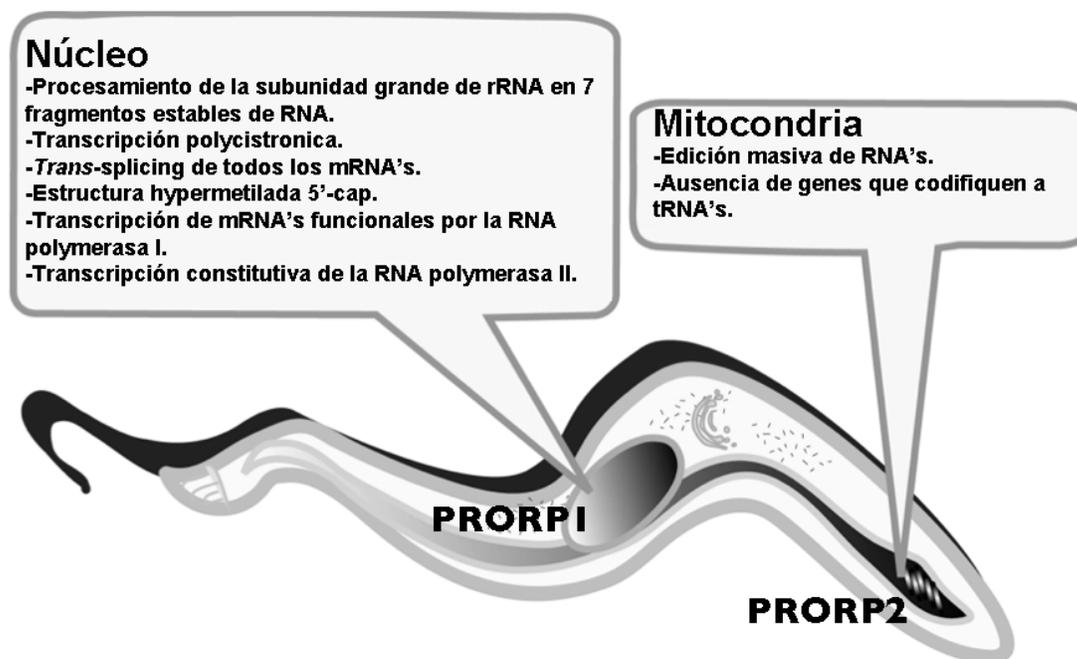


Figura 7. Características distintivas del metabolismo de RNA en tripanosomátidos. Representación simplificada de una célula de *T. brucei* junto con una lista de características involucradas en la transcripción, procesamiento y maduración de RNA's en tripanosomátidos (Fernández-Moya *et al.*, 2010).

Trypanosoma cruzi es un protista perteneciente a la familia *Tripanosomatidae*, es un parásito intracelular con un ciclo de vida bifásico, siendo el agente causal de la enfermedad de Chagas o “mal de Chagas” en países tropicales y sub-tropicales de América (Simpson L. *et al.*, 1996). Los tratamientos terapéuticos actuales son insuficientes debido a su grado de toxicidad, dificultad en la administración y el desarrollo de resistencia a los fármacos usados (Fernández-Moya *et al.*, 2010), lo que hace indispensable el desarrollo de nuevos tratamientos.

En el presente estudio nos abocamos a la purificación y caracterización parcial de una secuencia mitocondrial de *T. cruzi* homóloga a RNasa P Proteicas caracterizadas al día de hoy, no obstante, durante el desarrollo del estudio se utilizaron distintas construcciones de genes que

codificaran a distintas proteínas PRORP de *T. cruzi* (TcPRORP 1 y 2) y de diversos organismos (Tabla 2), llegando a ser la construcción de la proteína mitocondrial de *T. cruzi* (TcPRORP2) con una delección N-terminal Δ -29 (TcPRORP2 Δ -29), el blanco más interesante y manejable para el desarrollo de la investigación.

Tabla 2.

Distintos genes y construcciones de las proteínas PRORP empleadas durante el estudio.

Genes y construcciones de las Proteínas PRORP empleados durante el estudio.		
<i>A. thaliana</i> PRORP1 y PRORP1 mut.	<i>A. thaliana</i> PRORP1 Δ -76	<i>A. thaliana</i> PRORP1 Δ-61
<i>A. thaliana</i> PRORP2 y PRORP2 mut.	<i>A. thaliana</i> PRORP2 Δ -31	
<i>P. infestans</i> PRORP1		
<i>T. cruzi</i> PRORP1 Δ-88		
<i>T. cruzi</i> PRORP2 Δ-29		

En la columna de la izquierda se muestra el gen original del que derivan el resto de construcciones a su derecha, los genes en color se muestran con los colores correspondientes a las imágenes. Las construcciones marcadas como *mut.* representan mutantes donde los 2 primeros aspartatos catalíticos han sido mutados a alaninas. Las construcciones marcadas con **Δ -número** indican el número de aminoácidos eliminados del extremo N-terminal de la proteína.

El porcentaje de identidad entre la RNasa P Proteica mitocondrial de *T. cruzi* (TcPRORP2) y la RNasa P Proteica organelar de *A. thaliana* (AtPRORP1) es de alrededor de 22% (Figura 8). Dadas las evidencias existentes al día de hoy en tripanosomátidos en general, no es probable que la enzima TcPRORP2 comparta la misma diversidad de sustratos que AtPRORP1. Es decir, que otros RNAs distintos a los pre-tRNAs, pueden ser los sustratos *in vivo* de esta enzima (Tan, T. H. P. *et al.*, 2002).

De manera similar el porcentaje de identidad entre la RNasa P Proteica mitocondrial de *T. cruzi* (TcPRORP2) y la Proteína Mitocondrial Humana RNasa P (MRPP3) es de aproximadamente 20%, lo cual indica que la proteína TcPRORP2 puede representar un blanco susceptible de ser inhibido para el tratamiento de enfermedades causadas por *T. cruzi*.

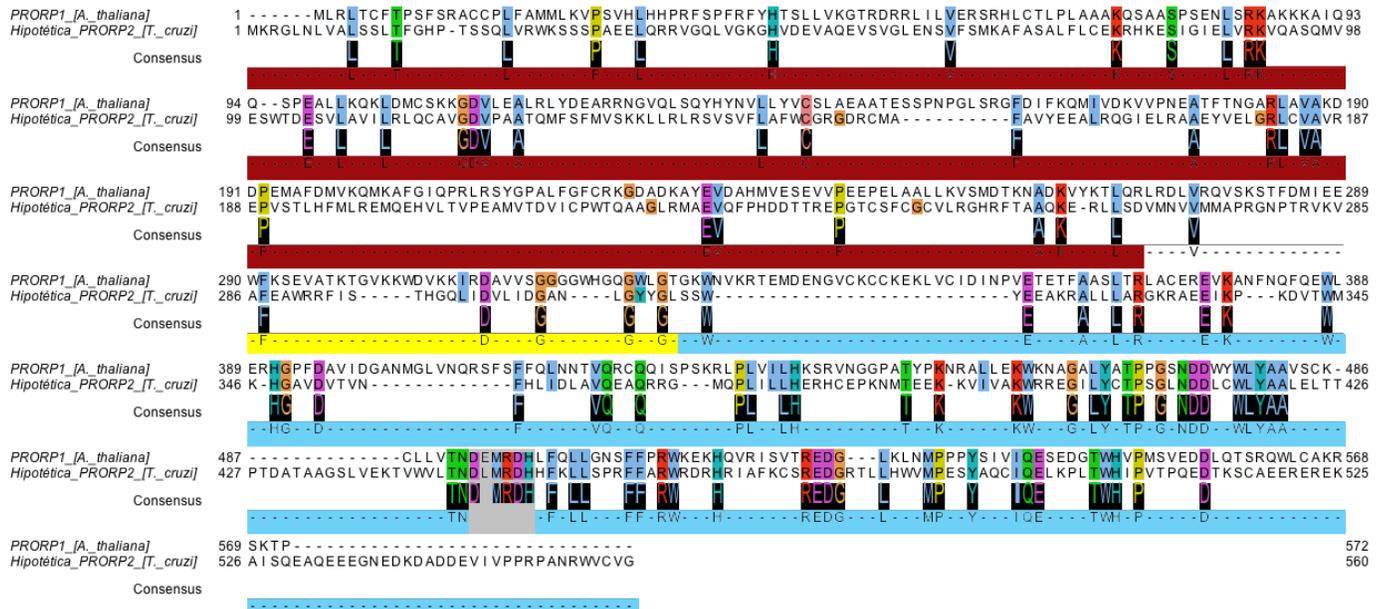


Figura 8. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *A. thaliana* PRORP1 y *T. cruzi* PRORP2. Dos aspartatos seguidos río abajo por una etiqueta DXMRDH (en gris) cerca del extremo C-terminal de la proteína se pueden encontrar la mayoría de las secuencias homólogas de los genes PRORP. Las barras de colores muestran los dominios identificados en la estructura (Figura 4). Los porcentajes de identidad entre cada dominio son de 18.18 % para el **dominio PPR**, 10.5% para el **dominio de unión a zinc** y 30.32% para el **dominio NYN**.

Planteamiento del problema

Hasta hace algunos años, se asumía que la RNasa P basada en RNA era la única enzima responsable del procesamiento de los tRNAs en todas las ramas del árbol de la vida. No obstante, se ha demostrado que tanto en humanos como en otras ramas eucariotas, existe un grupo de proteínas que presentan actividad de RNasa P (PRORPs).

El descubrimiento y la caracterización de las proteínas PRORP es relativamente reciente (2010), por lo que el campo de estudio sobre esta familia de proteínas se encuentra en sus primeras etapas. También se ha demostrado que en tripanosomátidos como *T. brucei*, conviven 2 formas de PRORP y ha sido reportado que ambas poseen actividad de RNasa P. Sin embargo, no resulta evidente porqué la proteína PRORP presente en mitocondria de tripanosomátidos debería de conservar dicha actividad.

El objetivo principal de nuestra investigación es la obtención y caracterización de una proteína derivada de una secuencia de DNA mitocondrial de *T. cruzi* (TcPRORP2) homóloga a RNasas P proteicas caracterizadas al día de hoy. Con el fin de realizar estudios estructurales, analizar el espectro de actividad de RNasa P y obtener conocimiento acerca de las funciones que pueda estar desarrollando la proteína PRORP2 en la mitocondria de *T. cruzi*, así como la importancia de la misma para determinar si ésta puede ser un blanco susceptible de ser inhibido.

Hipótesis

Existe una proteína homóloga a RNasas P proteicas en la mitocondria de *T. cruzi*, con actividad de RNasa P.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es purificar y caracterizar la proteína mitocondrial PRORP2 de *T. cruzi* (TcPRORP2), así como corroborar si la misma posee actividad de RNasa P utilizando un sustrato canónico de la RNasa P basada en RNA.

Objetivos Particulares

- Realizar una búsqueda y diseño de genes que codifiquen la proteína u homólogos de interés.
- Expresar y purificar la proteína putativa mitocondrial PRORP de *T. cruzi* (TcPRORP2 Δ -29).
- Caracterizar la proteína purificada.
- Llevar a cabo un análisis de estabilidad de la TcPRORP2 Δ -29 mediante la metodología de desplazamiento térmico.
- Realizar ensayos de actividad enzimática y de unión a tRNA.

Materiales y métodos

Obtención y diseño del gen que codifique a la proteína TcPRORP2

Para la obtención del gen que codifica a la proteína TcPRORP2, se realizó una búsqueda de homólogos de la proteína PRORP1 de *A. thaliana* (AtPRORP1), con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la página web del NCBI (National Center for Biotechnology Information); se encontraron 106 secuencias con una identidad mayor al 19%; dentro de éstas se encontró una proteína de *T. cruzi* (Proteína hipotética [Trypanosoma cruzi strain CL Brener] >gb|EAN99662.1) cuya identidad a AtPRORP1 es de alrededor de 22%. Para la elección de la secuencia, se buscó la presencia de 2 aspartatos seguidos río abajo por la etiqueta de aminoácidos DXMRDH que es altamente conservada en la mayoría de genes que codifican a las proteína PRORP (Figura 8).

La secuencia de nucleótidos correspondiente al gen de interés fue traducida a aminoácidos usando la herramienta “Translate” del servidor web ExPASy (<http://web.expasy.org>); se analizó en búsqueda de elementos de estructura secundaria con las herramientas de PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>). Identificados los elementos de estructura secundaria, se decidió eliminar los primeros 29 aminoácidos (TcPRORP2 Δ -29) del extremo N-terminal de la proteína, debido a que los mismos no presentaban una estructura secundaria definida, además existe coincidencia con el alineamiento de la estructura tridimensional resuelta de *A. thaliana*; es decir que en el alineamiento de las secuencias de TcPRORP2/AtPRORP1 la delección Δ -29 de TcPRORP2 coincide con la delección Δ -61 de la AtPRORP1. Posteriormente se analizó la estabilidad de las secuencias TcPRORP2 y TcPRORP2 Δ -29 utilizando el servidor XtalPred-RF (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>), con el fin de constatar si la construcción TcPRORP2 Δ -29 era un mejor candidato que TcPRORP2 “wild type” para llevar a cabo el estudio.

El gen que codifica a la proteína TcPRORP2 Δ -29 se diseñó con una etiqueta de polihistidinas (6 x HisTag) en el extremo N-terminal, fusionada a la proteína a través de un sitio de proteólisis TEV (TEV: Tobacco Etch Virus proteolysis site) para facilitar los pasos de purificación.

El plásmido de sobreexpresión pJExpress401-T5-amp-High con la construcción del gen de interés, se adquirió de la compañía DNA2.0 (<https://www.dna20.com>); siguiendo el algoritmo de optimización de codones de la compañía, basado en la abundancia de tRNAs de *Escherichia coli* en condiciones limitadas de nutrientes.

Expresión y solubilización de la PRORP 2 de *T. cruzi*

Las cepas de *E. coli*, BL21 DE3, BL21 DE3 pLys, BL21 DE3 Codon Plus, Rosetta-gami(DE3)pLacI y OrigamiB(DE3)pLacI, se transformaron con el plásmido que contiene la secuencia codificante para TcPRORP2Δ-29 por el método de CaCl₂ y plaquearon en cajas de Luria-Broth /Agar con el antibiótico correspondiente para cada cepa (Tabla S1).

Las colonias obtenidas se cultivaron en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo Luria-Broth y los antibióticos correspondientes para cada cepa; los cultivos se crecieron con agitación orbital a 250 rpm, a 37 °C, hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0.6, posterior a esto se agregó 1 mM de IPTG a cada uno de los cultivos y distintos cultivos se incubaron a 10 °C por 16 horas, 20 °C por 10 horas y 37 °C por 4 horas, para inducir la expresión de la proteína.

Además, colonias transformadas de la cepa OrigamiB(DE3)pLacI fueron crecidas en 50 ml de medios auto inducibles ZYM-5052 y MDA-5052 (Tablas S3 y S4) a 20 °C y 37 °C hasta llegar a la saturación (>10 O.D. a 600 nm).

Geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE

Para caracterizar los pasos de purificación se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida; a menos que se indique lo contrario, todas las electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se realizaron con cantidades equitativas de reactivos, cambiando en algunos casos la concentración final de poliacrilamida. Se prepararon 3.7 ml del gel separador (1.27 ml solución acrilamida-bis 30%/0.8%, 0.937 ml solución Tris 1.5 pH 8.8, 1.27 ml agua, 18.75 μl 20% SDS, 37.5 μl 10% de persulfato de amonio, 3.75 μl de TEMED) y 1.892 ml del gel concentrador (5%) (468 μl Tris 1 M pH 6.8, 1.153 ml de agua, 0.251 ml solución acrilamida-bis 30%/0.8%, 9.37 μl 20% SDS, 9.37 μl 10% persulfato de amonio, 2 μl de TEMED). Los geles se

corrieron con el sistema Mini-PROTEAN® Universal (Bio-Rad) a 220 voltios, y se tiñeron con una solución compuesta de 50% etanol, 10% ácido acético glacial y 0.1% de azul de Coomasie R-250, Biorad.

Análisis de sobre-expresión o purificación por “lote”

Después de la inducción, los cultivos de 50 ml se centrifugaron a 5,000 rpm por 20 min. Se desechó el medio de cultivo y las células se congelaron a -20°C. Las células congeladas se lisaron por sonicación en 5 ml de buffer de lisis (NaCl 1.5 M, KCl 50 mM, MgCl₂ 500 μM, DTT 1 mM, arginina 40 mM y 10% de glicerol). La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min, se recuperó la fracción soluble y se incubó con 50 μL de resina de níquel Ni-NTA (Qiagen) por 1 hora a 4 °C en un agitador con movimiento de balanceo. Pasado el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min, se eliminó el sobrenadante y a la pastilla de resina de níquel se agregó 1 ml de amortiguador de lisis nuevamente, se incubó por 10 min a 4°C en un agitador con movimiento de balanceo y se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min, este paso se repitió una vez más para eliminar proteínas que no estuvieran unidas a la resina de níquel. Lavada la pastilla de resina de Ni-NTA dos veces, se re-suspendió por agitación en 50 μL de amortiguador de lisis con una concentración final de imidazol de 500 mM, se incubó la muestra en movimiento a 4 °C por 10 min y se tomó una alícuota de 20 μL de la fracción soluble para analizar en PAGE en un gel de acrilamida al 12%. También se incluyeron muestras de la fracción insoluble, la fracción no adherida a la resina y el extracto celular total.

Purificación de la PRORP2 de *T. cruzi*

Colonias de la cepa OrigamiB(DE3)pLacI que mostraban la sobre-expresión de la proteína TcPRORP2Δ-29, se utilizaron para inocular 6 L de medio de cultivo Luria-Broth. Para esto, las colonias se crecieron en 3 ml de medio de cultivo Luria-Broth con los antibióticos correspondientes en agitación orbital a 37 °C por toda la noche. Matraces de 2 L conteniendo 500 ml de medio Luria-Broth y los antibióticos correspondientes se inocularon con un volumen de 1/500 con el inóculo crecido la noche anterior. Incubados por ≥ 6 horas hasta alcanzar una O.D. de 0.6 a 600 nm e inducida la producción de la proteína con la adición de 1 mM de IPTG

incubando a 37°C por otras 4 horas. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 14,000 rpm por 20 min y se desechó el medio de cultivo, las pastillas de células se congelaron a -20 °C para su uso posterior.

Las pastillas de células congeladas se destruyeron por sonicación en aproximadamente 50 ml de amortiguador de lisis (NaCl 1.5 M, KCl 50 mM, MgCl₂ 500 μM, DTT 1 mM, arginina 40 mM y 10% de glicerol) y después centrifugadas por 30 min a 14,000 rpm.

La fracción soluble se cargó en una columna Ni-NTA (HisTrap HP, 5ml GE) montada en un equipo de FPLC ÄKTAprime Plus (GE) y se realizó un paso de purificación por IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography); para esto, se pasó la muestra a través de la columna de níquel. Una vez cargada la muestra en la columna, se hizo pasar amortiguador de lisis por la columna hasta obtener una línea basal en la lectura de UV del sistema. Obtenida la línea basal se realizó un gradiente de elución escalonado haciendo pasar 6%, 10%, 20% y 100% de buffer de lisis conteniendo imidazol a una concentración final de 500 mM y se capturó el total de los volúmenes de elución.

La fracción eluída en el 6% se concentró por centrifugación en un centrifugador de 30,000 MWCO hasta tener un volumen de 1.5 ml aproximadamente. La muestra se dializó en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo) de 3,500 MWCO de 3 ml en agitación por 2 horas en 1 L de amortiguador compuesto por: NaCl 250 mM, Tris pH 8.0 50 mM, 2 β-mercaptoetanol 5 mM, ácido cítrico 5 mM, ZnSO₄ 10 μM, arginina 40 mM y 10% de glicerol. Después se cambió el amortiguador por uno similar conteniendo: NaCl 50 mM, Tris pH 8 50 mM, 2 β-mercaptoetanol 5 mM, ácido cítrico 5 mM, ZnSO₄ 10 μM y 10% de glicerol. Pasadas 4 horas se cambió nuevamente el amortiguador, se inyectó una relación 1:20 de enzima TEV al cartucho de diálisis y se mantuvo la diálisis-corte por toda la noche a temperatura ambiente. Concluidos los pasos anteriores se continuó dializando la muestra por 2 horas en el mismo amortiguador sin ácido cítrico.

Terminada la diálisis-corte, se realizó un nuevo paso de purificación por IMAC para eliminar rastros de contaminantes, las etiquetas de histidina y proteínas recombinantes que no habían sido cortadas por la enzima TEV. Se colectó la fracción no adherida a la columna de níquel (HisTrap HP, 5ml GE) y se concentró nuevamente en un centrifugador de 30,000 MWCO.

La muestra concentrada se calentó a 65 °C por 45 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 45 min. Se tomó la fracción soluble y se hizo pasar a través de una columna de

intercambio aniónico (Mono Q Hitrap q XL 1ml, GE) montada en el sistema de FPLC. Después, se realizó un gradiente lineal de elución con un amortiguador compuesto por: NaCl 1.5 mM, Tris pH 8.0 50 mM, 2 β-mercaptoetanol 5 mM, ZnSO₄ 10 μM y 10% de glicerol. Se colectó la fracción de interés y se hizo pasar nuevamente por una columna de desalado (HiTrap Desalting, 5 ml) para cambiar al amortiguador final compuesto por NaCl 25 mM, Tris pH 8.0 50 mM, 2 β-mercaptoetanol 5 mM, ZnSO₄ 10 μM y 10% de glicerol.

Finalmente, la muestra se concentró una vez más en un centrífugo de 30,000 de MWCO y se almacenó a 4 °C.

Espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS)

La proteína purificada TcPRORP2Δ-29 se visualizó por medio de PAGE en un gel de acrilamida al 8% y se cortó la banda del gel correspondiente al peso molecular calculado, la muestra se envió al Research Resources Center (RRC) de la Universidad de Illinois en Chicago (UIC), para su análisis por Espectrometría de Masas Híbrida (LTQ-FT) y por Cromatografía Líquida / Espectrometría de Masas en Tándem (LC/MS/MS). Los resultados fueron analizados con el software de visualización y validación de MS/MS Scaffold (<http://www.proteomesoftware.com/products/scaffold/>).

Búsqueda de bases de datos

Todas las muestras del experimento de MS/MS se analizaron con el uso de Mascot (Matrix Science, London, UK; versión 2.2.07). La deconvolución del estado de carga y des-isotoponización no se realizaron. Mascot se estableció para buscar en la base de datos NCBIInr_20110824 (seleccionado para Eucariotas, 5119902 registros) asumiendo que la enzima de digestión utilizada fue tripsina. Se realizó la búsqueda en Mascot con una tolerancia iónica de fragmentos de 0,60 Da y una tolerancia iónica de 10,0 ppm. Se especificó un derivado de iodocetamida de cisteína como una modificación arreglada y la oxidación de metionina como una modificación variable.

Se utilizó Scaffold (version Scaffold_4.1.1, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar los péptidos identificados en el experimento de MS/MS. La identificación de los péptidos

se validó sólo si podían establecer una probabilidad mayor al 90,0% por el algoritmo Peptide Prophet (Keller, A. *et al.*, 2002), con la corrección de Scaffold delta-mass. La identificación de las proteínas se aceptó sólo si tenía una probabilidad mayor al 95,0% y contenía al menos dos de los péptidos identificados.

Ensayos de desplazamiento térmico y búsqueda de fragmentos

En el presente estudio aplicamos el ensayo de desplazamiento térmico ligado a fluorescencia desarrollado por Pantoliano y colaboradores (US patent 6,020,141). La proteína purificada TcPRORP2 Δ -29, a una concentración de 200 μ g/ml, fue utilizada para realizar una búsqueda de aditivos y amortiguadores que pudieran estabilizar la proteína TcPRORP2 Δ -29 (Ericsson, U. B. *et al.*, 2006), así como la búsqueda de fragmentos terapéuticos que pudieran unir dicha proteína (Pantoliano, M. W. *et al.*, 2001).

Los ensayos de desplazamiento térmico en búsqueda de aditivos y amortiguadores se realizaron utilizando el fluoróforo para proteínas SYPRO Orange (Life Technologies). Se mezcló el fluoróforo con la proteína TcPRORP2 Δ -29 a una concentración de 50:1 respectivamente. La búsqueda de amortiguadores y aditivos se realizó con el kit de solubilización OptiSol (Dilyx Biotechnologies). En una placa de 48 pozos de RT-PCR MicroAmp Optical (Life Technologies) se agregó 1 μ g de proteína purificada/SYPRO Orange en cada pozo. Posteriormente, se agregaron en pozos distintos 9 μ L de cada una de las condiciones a probar, al tiempo que se mezclaba por pipeteo con la proteína. Se cubrió la placa con una película adhesiva MicroAmp Optical (Life Technologies) y se centrifugó. Se cargó la placa en un equipo de RT-PCR StepOne (Life Technologies). El programa de corrida consistió en una rampa lineal de temperatura que va de los 25 °C a los 99 °C en 45 min (2.5 °C x min).

La búsqueda de fragmentos que pudieran unir a TcPRORP2 Δ -29 se llevó a cabo con la librería de fragmentos pequeños Zenobia. En una caja de 96 pozos para ELISA se prepararon cocteles de cuatro fragmentos en cada pozo. Ya que los compuestos estaban pre-plaqueados para ser soluciones stock en PEG400 a una concentración final de 200 mM cada uno, se mezclaron volúmenes equivalentes de un grupo de cuatro compuestos llevando a una concentración efectiva de 50 mM de cada compuesto en la mezcla y 5 mM en el ensayo; para esto, se agregaron 2 μ L de cada uno de cuatro compuestos distintos a un pozo; al finalizar, la caja se selló con una película

adhesiva y se envolvió en aluminio para proteger los cocteles de la luz; se mezcló con un vortex por aproximadamente 30 s, se centrifugó y almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Para realizar el ensayo de desplazamiento térmico en búsqueda de fragmentos, se utilizó una placa de 96 pozos de RT-PCR MicroAmp Optical (Life Technologies), se agregó 1 μ L de cada coctel de cuatro fragmentos en pozos distintos, a estos se adicionó 1 μ g (1mg/ml) de proteína purificada/SYPRO Orange (1:50) y 8 μ L del amortiguador final (NaCl 25 mM, Tris pH 8.0 50 mM, 2 β -mercaptoetanol 5 mM, ZnSO₄ 10 μ M y 10% de glicerol) a cada pozo, se selló la caja con una película adhesiva y se mezcló con un vortex por 10 s, se cubrió la caja con papel aluminio y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, la caja se centrifugó y se cargó en un equipo de RT-PCR StepOne Plus (Life Technologies). El programa de corrida consistió en una rampa lineal de temperatura que va de los 25 °C a los 99 °C, en 45 min (2.5 °C x min).

Síntesis del precursor de tRNA

El sustrato pre-tRNA (pre-tRNA^{Phe}) de *T. maritima* fue provisto por la Dra. Adelaida Díaz Vilchis. De manera general, el gen se adquirió a la compañía GenScript. La construcción del gen se encuentra en el vector de clonación pUC18. La cepa de *E. coli* XL-Gold se transformó con el plásmido de expresión y posteriormente se purificó DNA de cultivos celulares. Se separaron las fracciones de DNA plasmídico y genómico por centrifugación en un gradiente de CsCl-BrEt. Se tomó la fracción correspondiente al DNA plasmídico y se digirieron 1.50 mg de DNA por reacción en 300 μ L de amortiguador NEB 3 (New England Biolabs) y ~450 unidades de BsmA 1 (New England Biolabs). Más tarde se purificó el DNA por medio de una precipitación en fenol-cloroformo-etanol. El material obtenido de los pasos anteriores se utilizó para realizar una transcripción *in vitro* con la enzima RNA polimerasa del fago T7. Los productos de la síntesis *in vitro* fueron purificados por medio de una PAGE en un gel de acrilamida al 12%.

Prueba para verificar que la proteína purificada se encuentre libre de RNasas

Para verificar que la proteína purificada no estuviese contaminada con RNasas después de los pasos de purificación, se incubaron 15 μg de pre-tRNA con 20 μg de proteína purificada TcPRORP2 Δ -29 por 24 horas a temperatura ambiente. Después las muestras se analizaron por medio de una PAGE en un gel de acrilamida al 18% / Urea 7 M a 300 V constantes y se visualizaron en una pantalla de fluoruro (Ambion), con luz UV y/o tiñendo con BrEt.

Ensayos de actividad de RNasa P

Las reacciones de procesamiento del pre-tRNA se llevaron a cabo de la siguiente manera: el sustrato pre-tRNA (10 μM pre-tRNA^{Phe}) se disolvió en el buffer de reacción reportado por Liudmila V. Pavlova *et al.*, 2012, (Hepes 20 mM pH 7.4, acetato de amonio 150 mM, espermidina 2 mM, espermina 0.05 mM, DTT 4 mM y acetato de magnesio 10 mM) y se incubó a 94 °C por 15 min y después se dejó enfriar a 37 °C. A la par, se disolvieron por separado 40 μM de la proteína purificada TcPRORP2 Δ -29 y de la ribozima RNasa P de *T. maritima* en buffer de reacción y ambas se incubaron a 55 °C por 10 min. Después se mezcló la proteína TcPRORP2 Δ -29 (o enzima RNasa P) y el pre-tRNA a una concentración 4:1 (1=10 mM) respectivamente. Se incubaron a 55 °C durante 1 hora. Terminado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción agregando un volumen de buffer de carga para geles de RNA suplementado con EDTA (9 M urea, 1x TBE, colorante cianol xileno y 100 mM EDTA). Los productos de reacción se analizaron en una PAGE en un gel de acrilamida al 18% PAGE / Urea 7 M a 300 V constantes y se visualizaron en una pantalla de fluoruro (Ambion), con luz UV y/o tiñendo con BrEt.

Ensayo de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA)

Los ensayos de Cambio de Movilidad Electroforética se llevaron a cabo en condiciones nativas en un amortiguador compuesto por: THE 1X, MgCl₂ 100 mM y Ac. NH₄ 100 mM, según lo reportado por Ming-Juan Luo and Robin Reed, 2003 y visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 5% (Rosalind Kim, 2011).

Resultados

1. Análisis de expresión de las proteínas TcPRORP 1 y 2 por purificación en “lote”

1.1. La expresión en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) resulta en proteína no expresada o insoluble

Se realizaron diversos intentos para sobre-expresar las construcciones TcPRORP1Δ-88 y TcPRORP2Δ-29 (Tabla 3). Primero se intentó sobre-expresar las proteínas en las cepas de *E. coli*: BL21 DE3, BL21 DE3 pLysS y BL21 DE3 Codon Plus y realizar la purificación en “lote” en un amortiguador compuesto por MOPS 20 mM, NaCl 150 mM y 10% glicerol a pH 7.8.

Tabla 3.

La expresión de distintas construcciones de RNAsas P Proteicas en diferentes cepas de *E. coli* lleva a la expresión de proteína de forma soluble e insoluble.

Gen \ Cepa	BL21 DE3	BL21 DE3 pLysS	BL21 DE3 Codon Plus	Rosetta-gami (DE3)pLacI	OrigamiB(DE3) pLacI
AtPRORP1A-61	✓	✓	✓	✓	✓
TcPRORP1A-88	✗	✗	⊙	⊙	---
TcPRORP2A-29	✗	✗	✗	⊙	✓

Las distintas construcciones de PRORPs pueden o no sobre-expresar dependiendo de la cepa utilizada, asimismo dicha expresión puede darse de manera soluble o insoluble dependiendo también de la construcción y la cepa. Se marca con una ✓ los ensayos positivos que llevaban a la sobre-expresión de proteína de forma soluble, con ⊙ la expresión de proteína en forma insoluble y con ✗ los ensayos que no llevan a la sobre-expresión de proteína, a su vez el tamaño de las ✓ indica si la cantidad de proteína expresada era menor o mayor en la cepa correspondiente.

La proteína TcPRORP1Δ-88 parece encontrarse expresada en el extracto total de la cepa BL21 (DE3) Codon Plus; más no así en la fracción soluble, por lo que parte de la pastilla obtenida después de centrifugar el lisado se disolvió en agua y buffer de carga para electroforesis de proteínas y subsecuentemente se analizó por PAGE en un gel de acrilamida al 12% a 220 voltios (Figura 9).

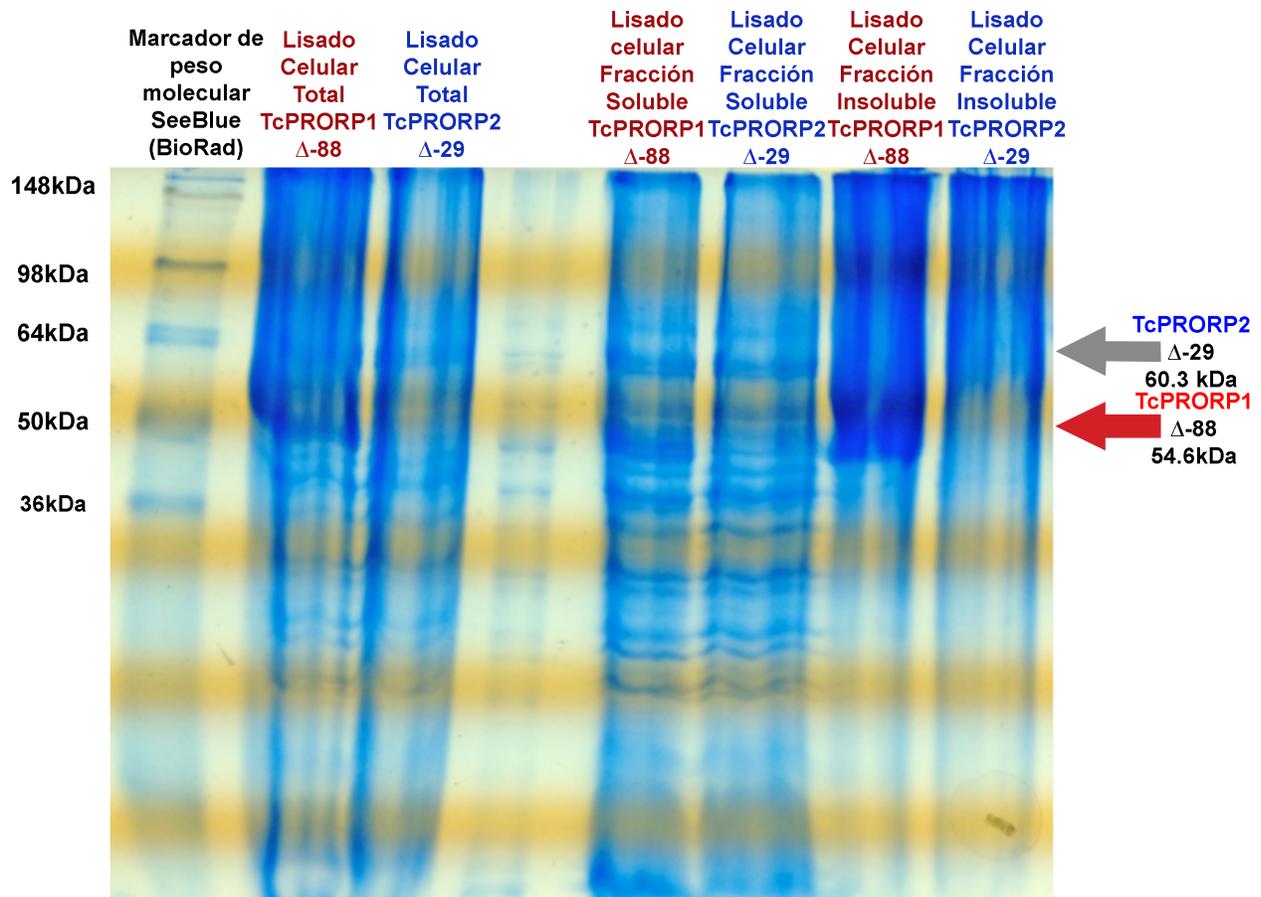


Figura 9. La Proteína **TcPRORP1 Δ -88** se sobre-expresa de manera insoluble en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus. SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12% mostrando los ensayos de sobre-expresión por purificación en “lote” de la cepa BL21(DE3)Codon Plus. La composición del amortiguador de lisis es: 50 mM MOPS, NaCl 150 mM, imidazol 15 mM y 10% de glicerol, a pH final de 7.8. Una proteína del peso molecular esperado parece estar presente en el carril correspondiente a la fracción insoluble y en el lisado celular total de las células transformadas con **TcPRORP1 Δ -88**, no así **TcPRORP2 Δ -29**.

Una proteína correspondiente al peso molecular esperado se observa expresada en el lisado celular total y en la pastilla del lisado, por ello se realizó un procedimiento de purificación en “lote” en condiciones desnaturalizantes. La purificación en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en las mismas condiciones y amortiguador que se realizaron los ensayos previos, sólo que esta vez agregando urea a una concentración final de 8 M (Figura 10).

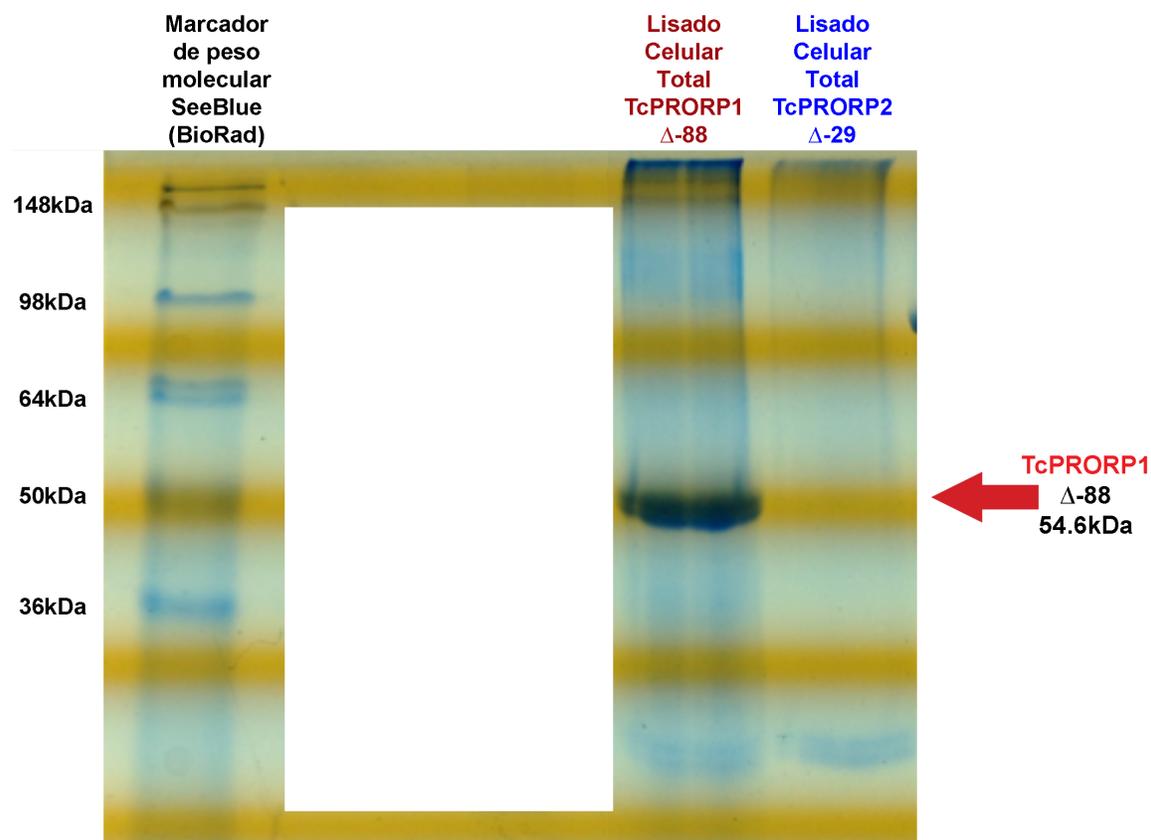


Figura 10. Los ensayos de purificación por “lote” en condiciones desnaturalizantes confirman la sobre-expresión de **TcPRORP1Δ-88** en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus. SDS-PAGE-urea 8 M en un gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes donde se muestran los resultados de los ensayos de sobre-expresión por purificación en “lote” de la cepa BL21(DE3)Codon Plus. La composición del amortiguador de lisis es: 50 mM MOPS, NaCl 150 mM, imidazol 15 mM, urea 8 M y 10% de glicerol, a pH 7.8. La banda de proteína sobre-expresada corrobora la presencia de **TcPRORP1Δ-88** en el extracto celular, no así en el carril que corresponde a **TcPRORP2Δ-29**.

Los resultados de la purificación en “lote” y la PAGE en condiciones desnaturalizantes indican que la proteína TcPRORP1Δ-88 se sobre-expresa de manera insoluble en la cepa BL21(DE3)Codon Plus. Para los fines de la investigación se necesitaba una proteína que sea sobre-expresada en forma soluble, por ello se decidió continuar los ensayos de sobre-expresión en otras cepas de *E. coli* y probar un amortiguador de lisis distinto.

2. La expresión en las cepas Rosetta-gami(DE3)pLacI y OrigamiB(DE3)pLacI, así como un amortiguador distinto, permiten la expresión de la proteína TcPRORP2Δ-29 de forma soluble

Células de las cepas Rosetta-gami(DE3)pLacI y OrigamiB(DE3)pLacI se transformaron ambas con los plásmidos de expresión que codifican a las proteínas TcPRORP1Δ-88 y TcPRORP2Δ-29. Se indujo la sobre-expresión de la proteína y las células se lisaron por sonicación en un amortiguador compuesto por: KCl 50 mM, NaCl 1.5 M, MgCl₂ 500 μM, DTT 1 mM, arginina 40 mM y 10% de glicerol, a pH final de 7.8. Se realizó una purificación por “lote” y se analizó la fracción soluble de las muestras por medio de una PAGE en un gel de acrilamida al 12% a 220 voltios constantes (Figura 11).

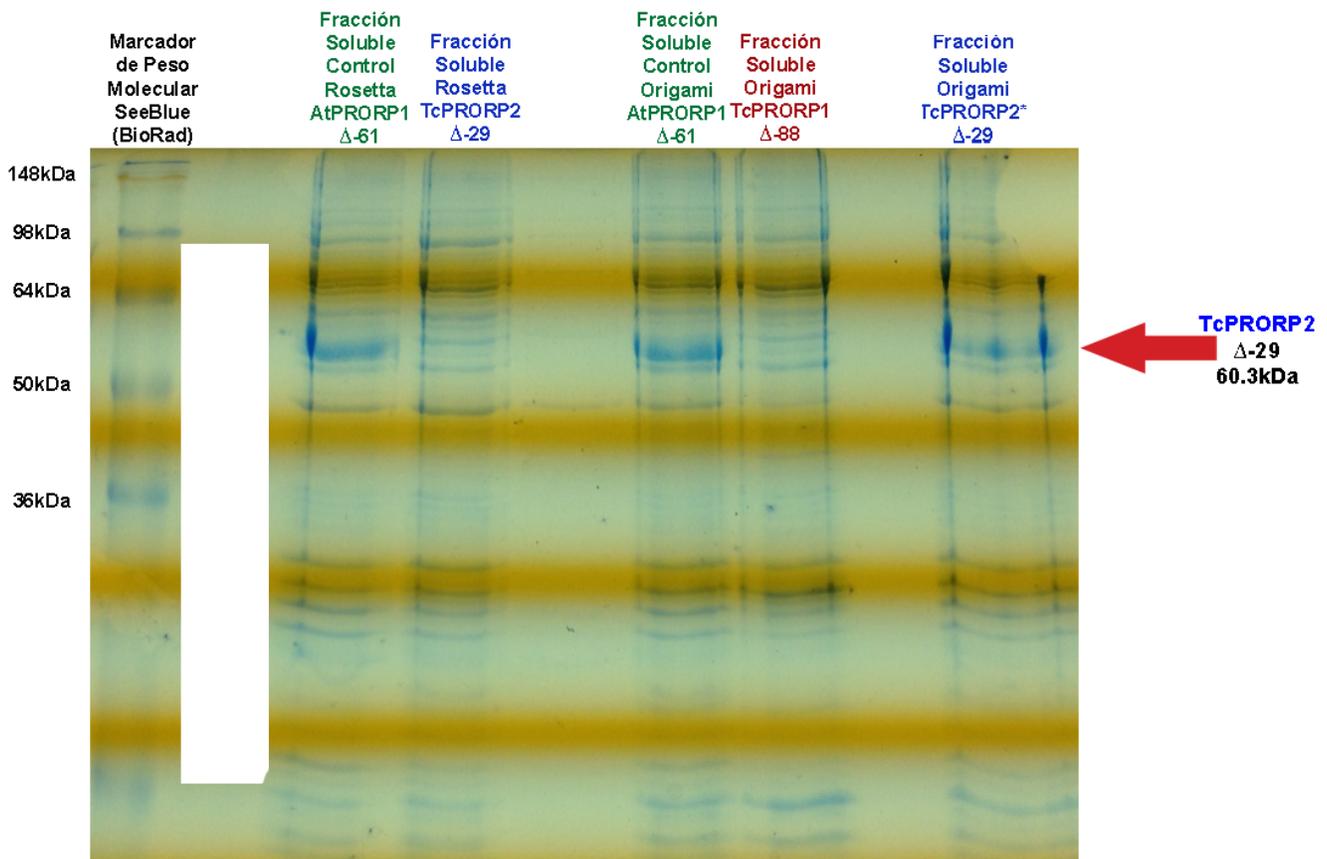


Figura 11. La cepa de *E. coli* OrigamiB(DE3)pLacI permite la expresión de la proteína TcPRORP2Δ-29* en la fracción soluble. SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12% mostrando las fracciones solubles de los ensayos de sobre-expresión por purificación en “lote” de las cepas Rosetta-gami(DE3)pLacI y OrigamiB(DE3)pLacI. La composición del amortiguador de lisis es: KCl 50mM, NaCl 1.5M, MgCl₂ 500 μM, DTT 1mM, arginina 40mM, y 10% de glicerol, a un pH final de 7.8.

Al contrario de TcPRORP1 Δ -88, que parecía sobre-expresarse en la cepa BL21(DE3) Codon Plus de manera insoluble, TcPRORP2 Δ -29 parecía estar sobre-expresada de manera soluble en la cepa OrigamiB(DE3)pLacI (Figuras 12 y 13). Por lo que se decidió continuar el estudio con la construcción TcPRORP2 Δ -29.

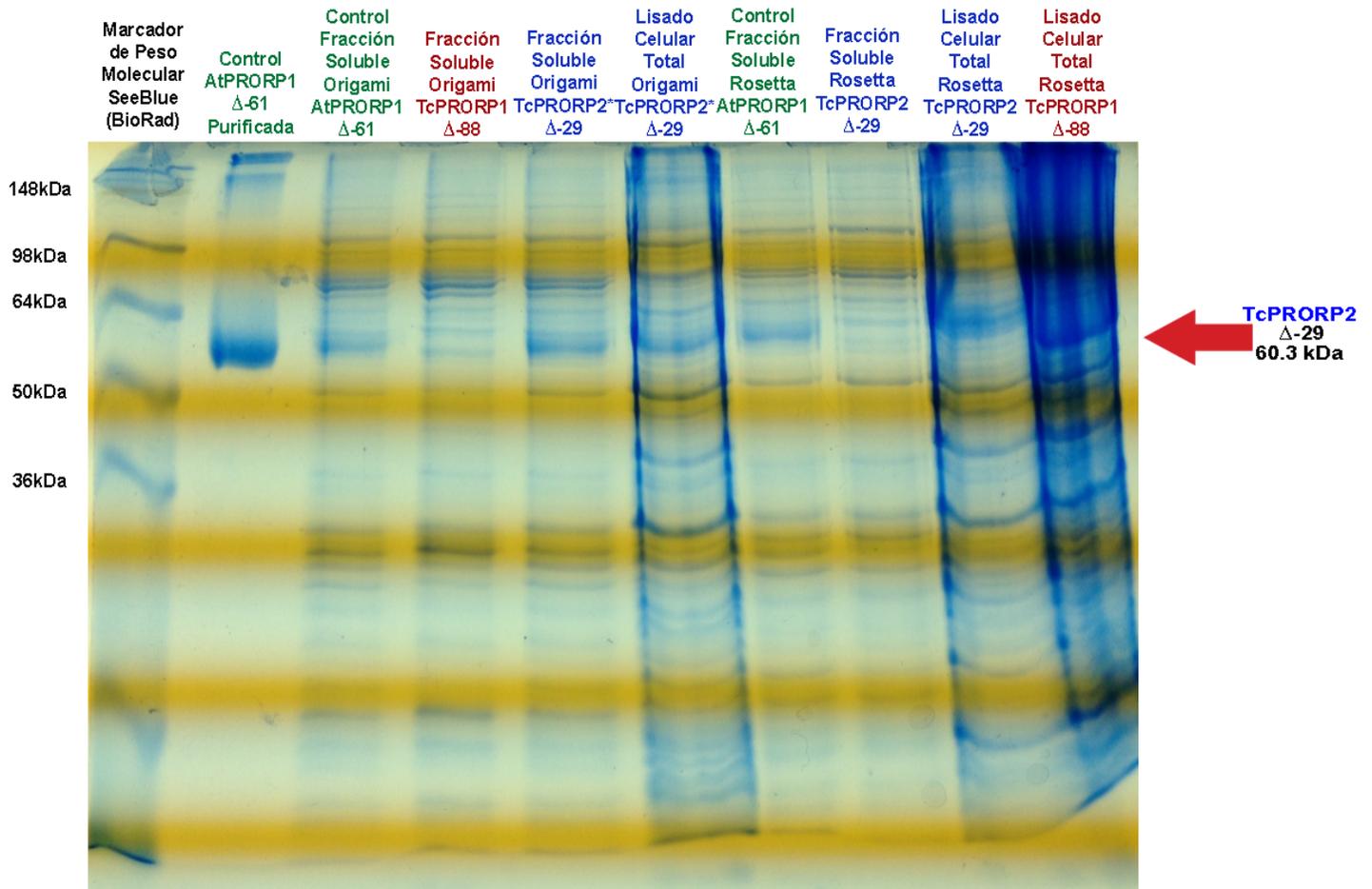


Figura 12. La proteína **TcPRORP2 Δ -29*** se sobre-expresa de manera soluble en la cepa de *E. coli* **OrigamiB(DE3)pLacI**. SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12% que muestra los ensayos de sobre-expresión por purificación en “lote” de las cepas Rosetta-gami(DE3)pLacI y OrigamiB(DE3)pLacI. La composición del amortiguador de lisis es: KCl 50 mM, NaCl 1.5 M, MgCl₂ 500 μ M, DTT 1 mM, arginina 40 mM, y 10% de glicerol, a pH final de 7.8. Se ha constatado que **TcPRORP2 Δ -29*** se sobre-expresa de forma soluble en la cepa OrigamiB(DE3)pLacI.

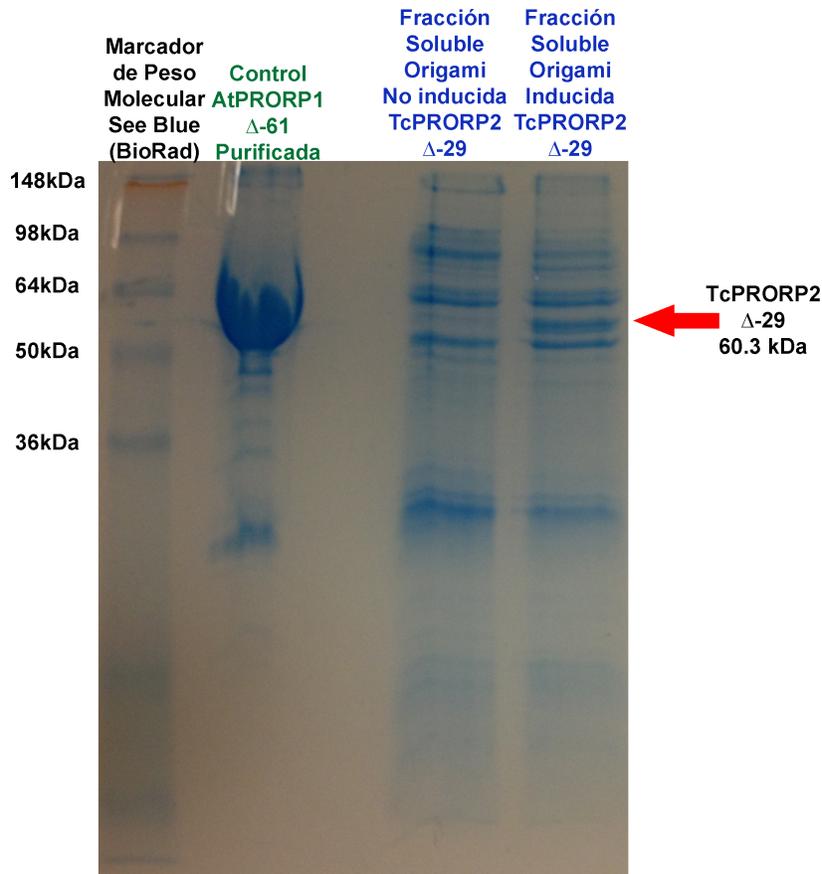


Figura 13. La expresión de la proteína **TcPRORP2 Δ -29** es inducible con 1mM de IPTG a 37°C por 4hrs. PAGE en un gel de acrilamida al 12% que muestra la expresión de la proteína **TcPRORP2 Δ -29** en la cepa OrigamiB(DE3)pLacI, así como un control no inducido.

3. La proteína TcPRORP2 Δ -29 tiene una baja afinidad por la resina de níquel

Se realizaron ensayos de purificación en “lote” para determinar qué concentración de imidazol era la más adecuada para unir la proteína TcPRORP2 Δ -29 a la resina y cuál para la elución. Se observó que una baja cantidad inicial de imidazol en el amortiguador de lisis (10 mM) es suficiente para reducir de manera considerable la cantidad de proteína unida a la resina. Por otro lado, se observa que con una concentración de 30 mM de imidazol la mayor parte de la proteína no se une a la resina (Figura 14). Por lo anterior, se decidió cambiar la composición del amortiguador de lisis a otro sin imidazol y compuesto por: KCl 50 mM, NaCl 1.5 M, Tris pH 8 50 mM, MgCl₂ 500 μ M, DTT 1 mM, arginina 40 mM, ZnSO₄ 10 μ M y 10% de glicerol.

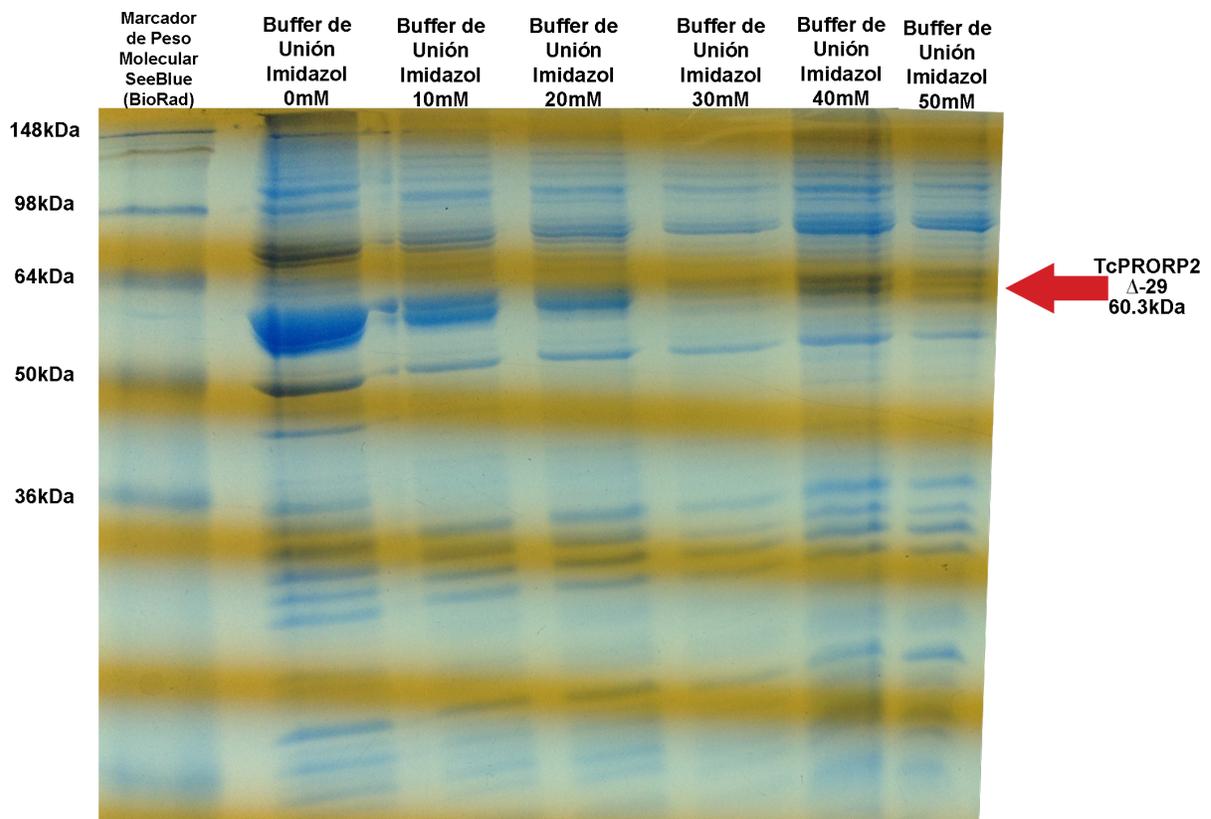


Figura 14. La mayor parte de la proteína **TcPRORP2 Δ -29** no se une a la resina de níquel a una concentración de 10 mM de imidazol en el amortiguador de lisis. PAGE en un gel de acrilamida al 12% que muestra distintas concentraciones de imidazol en el amortiguador de lisis para la unión de la proteína de la resina de níquel. El ensayo indica que una cantidad de 10 mM de imidazol es suficiente para inhibir de manera considerable la unión de la proteína de la resina de níquel.

4. La purificación de TcPRORP2 Δ -29 se logró a través de un protocolo de cinco pasos

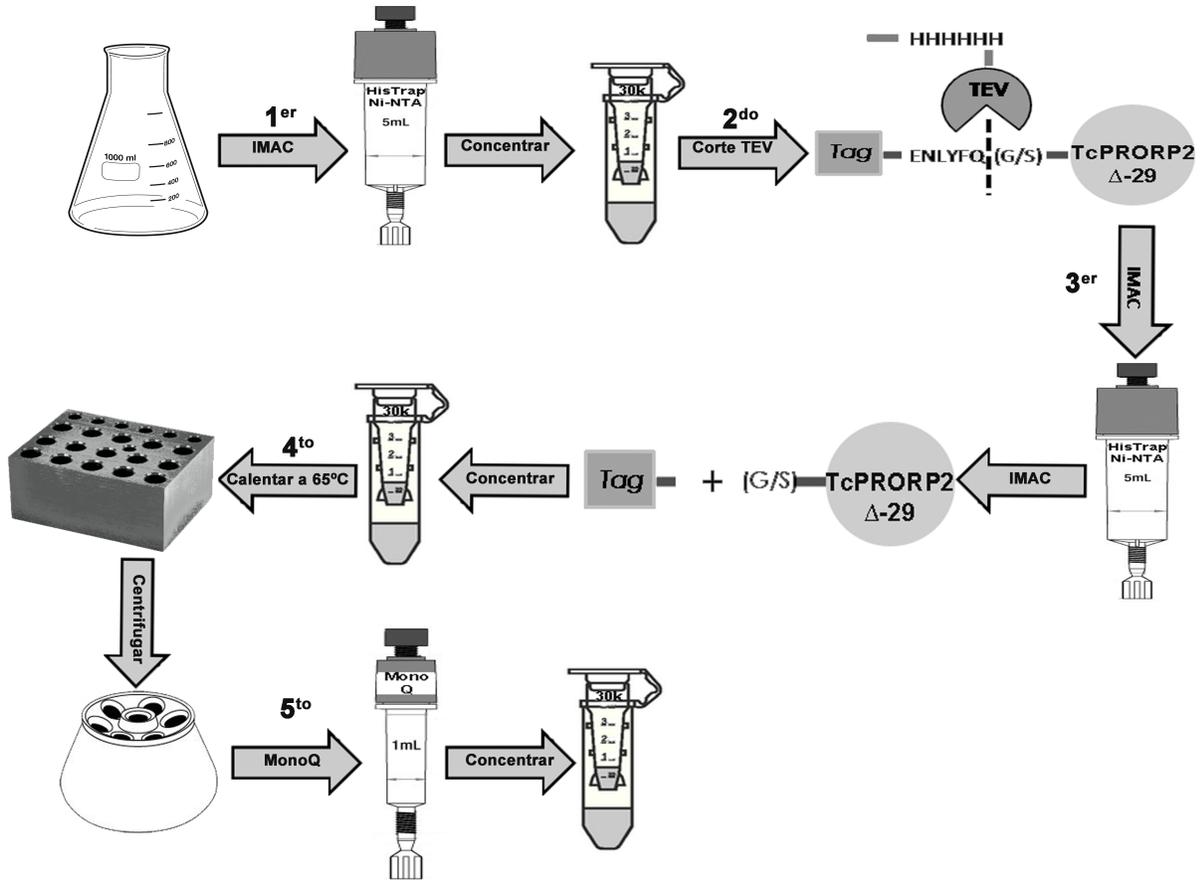


Figura 15. Diagrama representativo del protocolo de purificación utilizado para TcPRORP2 Δ -29. Los pasos principales son mostrados como números junto a las flechas.

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad a níquel. Se realizó un gradiente escalonado con amortiguador de lisis al que se había agregado imidazol a una concentración final de 500 mM; los pasos del gradiente fueron 6% (30 mM), 10% (50 mM), 20% (100 mM) y 100% (500 mM), (Figuras 16 y 17).

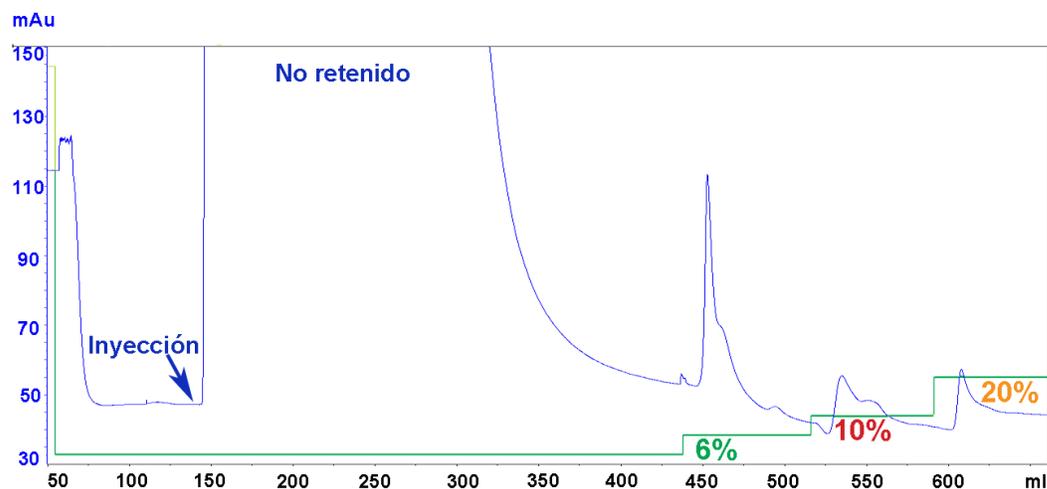


Figura 16. La mayor cantidad de proteína TcPRORP2 Δ -29 es eluída de la columna de níquel con una cantidad de 30 mM de imidazol. Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC) que muestra en azul la absorbancia del espectro UV y en verde la concentración del buffer de elución. Los pasos corresponden a 6%, 10% y 20% del buffer de elución con una concentración final de 500mM de imidazol. Se inyectó el clarificado obtenido de 6 L de medio de cultivo a un flujo de 5ml/min en una columna HisTrap FF Crude 5 ml (GE) de dimensión 16 x 25 mm y una capacidad de unión aproximada de 40 mg de proteína.

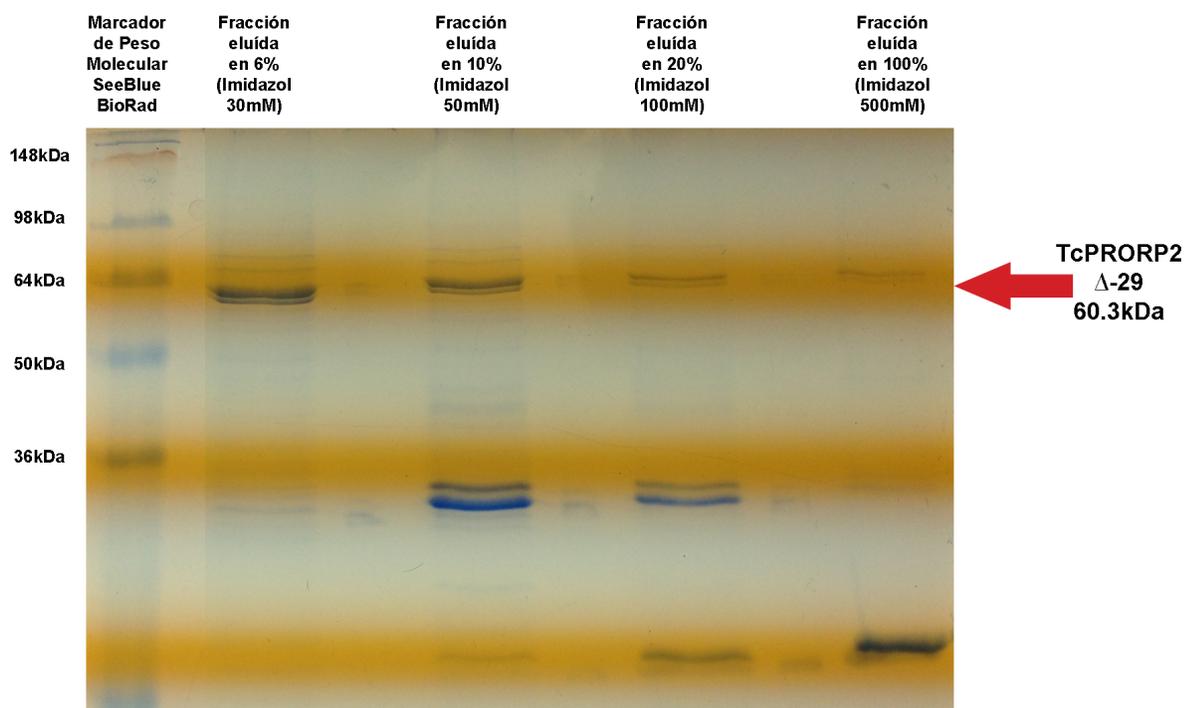


Figura 17. La fracción eluída en 30 mM imidazol es la que presenta una mayor cantidad de proteína y menor cantidad de contaminantes. PAGE en un gel de acrilamida al 12% mostrando las fracciones de proteína colectadas del paso de elución de la columna de Níquel. La fracción eluída en 6% es la que presenta una mayor cantidad de proteína.

Después del paso de purificación por afinidad a níquel, la fracción eluída en 30 mM de imidazol se concentró, dializó y se trató con la enzima TEV; posteriormente se centrifugó la muestra y la fracción soluble se purificó nuevamente por una cromatografía de afinidad a níquel (Figuras 18 y 19).

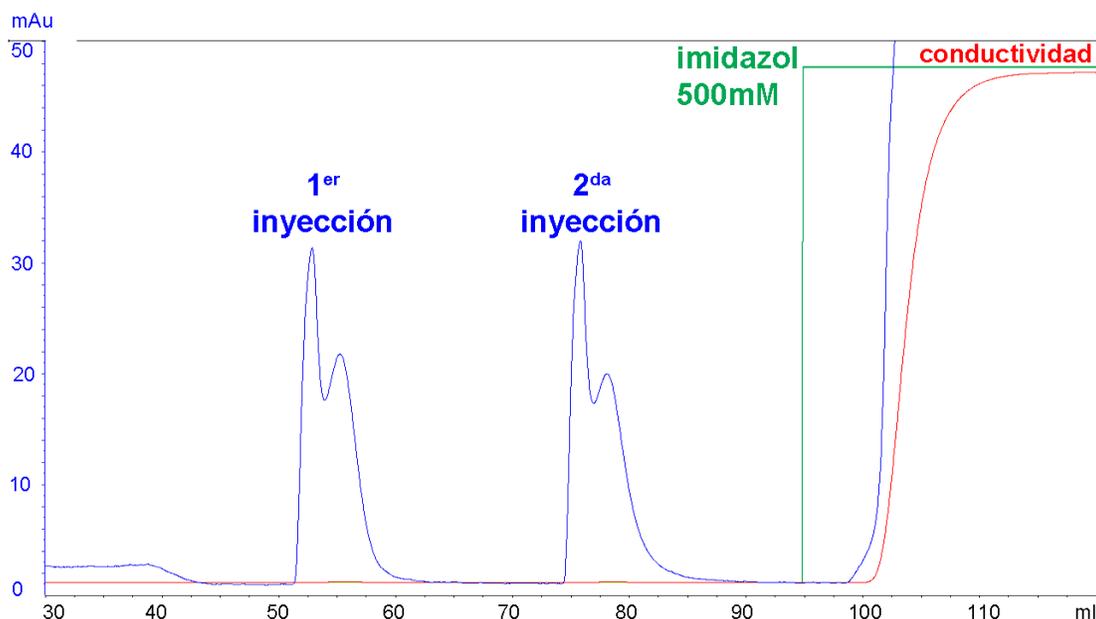


Figura 18. La etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína TcPRORP2Δ-29 es eliminada por la proteasa TEV. Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC) (mismas condiciones que la Figura 16) después del tratamiento con la enzima TEV, en azul se muestra la absorbancia del espectro UV, en verde la concentración del buffer de elución y en rojo la conductividad. Los picos en la absorbancia corresponden a la fracción de proteína no unida a la resina de níquel en dos pasos de inyección a la columna, se cargaron 20 ml totales en una manguera de inyección de 10 ml.

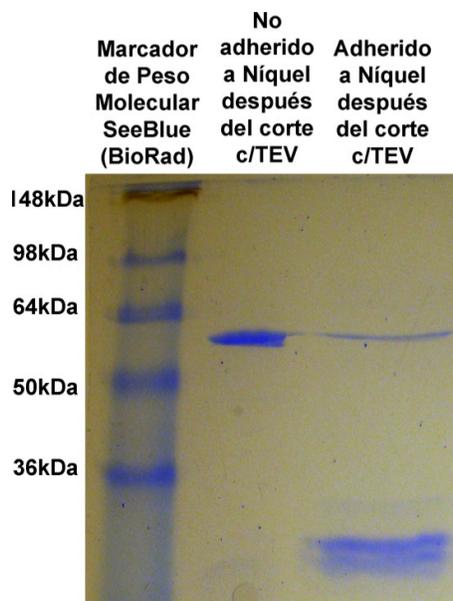


Figura 19. La eliminación de la etiqueta de histidinas permite purificar nuevamente la proteína TcPRORP2 Δ -29 por un nuevo paso de afinidad a níquel. PAGE en un gel de acrilamida al 12% que muestra la fracción de proteína que no se unió a la resina de níquel después del tratamiento con la TEV y la fracción que se unió a la resina después del mismo tratamiento; se asume que la banda del peso molecular aproximado a TcPRORP2 Δ -29 en la fracción adherida al níquel debe corresponder a la porción de proteína TcPRORP2 Δ -29 no cortada por la proteasa TEV. Control antes de la digestión con TEV no mostrado.

La fracción que no se unió a la resina de níquel se colectó y concentró nuevamente con un centrífugo de 30,000 MWCO; una vez concentrada la muestra, se calentó a 65 °C por 45 min y la fracción soluble se unió a una columna de intercambio aniónico. Después se realizó un gradiente lineal con un amortiguador con la misma composición, al que se había agregado NaCl a una concentración final de 1.5 M para la elución de la proteína (Figuras 20 y 21).

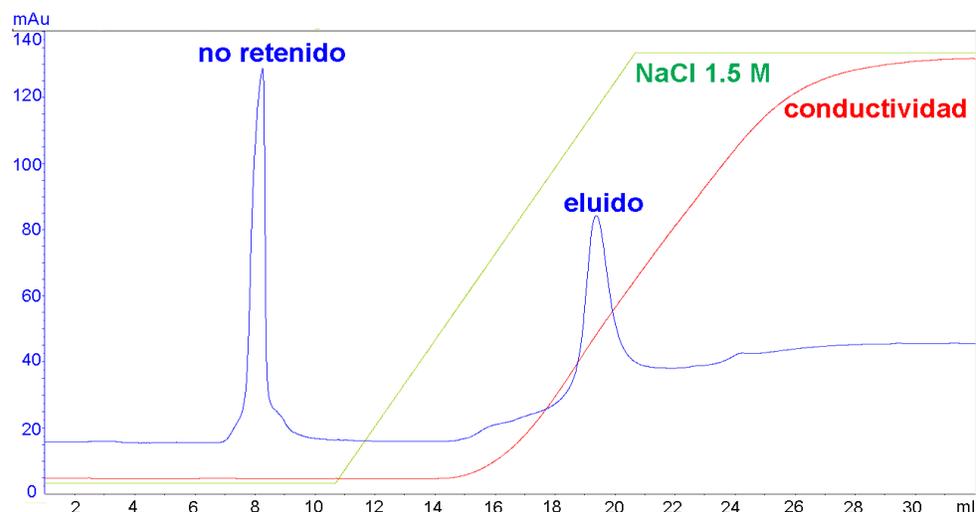


Figura 20. La proteína TcPRORP2Δ-29 tiene un punto isoeléctrico calculado de 6.28 y es retenida en una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, 1 ml). En azul se muestra la absorbancia del espectro UV, en verde la concentración del buffer de elución y en rojo la conductividad.. Se hizo pasar la proteína proveniente del paso anterior de purificación en un amortiguador compuesto por NaCl 50 mM, Tris pH 8 50 mM, 2 β-mercaptoetanol 5 mM, ácido cítrico 5 mM, ZnSO₄ 10 μM y 10% de glicerol, a un flujo de 1 ml/min a través una columna de intercambio aniónico con un volumen de cama de 1 ml (7x25 mm); se realizó un gradiente lineal en 10ml de buffer con una concentración final de NaCl de 1.5 M. El primer pico corresponde a la fracción no unida y el segundo a la fracción eluída a partir de una concentración aproximada de 320 mM de NaCl.

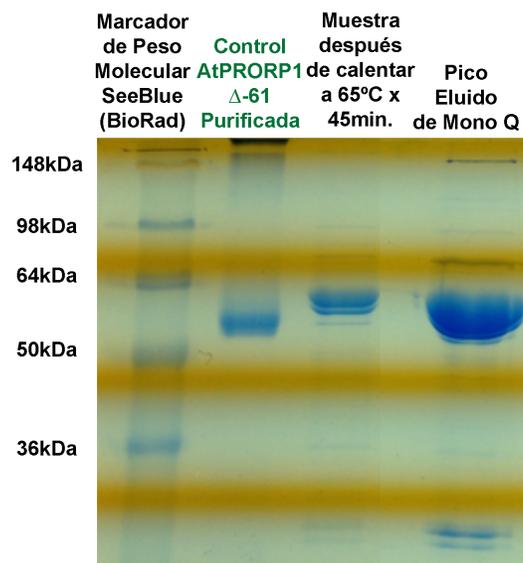


Figura 21. La proteína TcPRORP2Δ-29 no es desnaturalizada después de una incubación a 65°C por 45 min. PAGE en gel de acrilamida al 12% que muestra la proteína TcPRORP2Δ-29 obtenida después de 5 pasos de purificación y un control de AtPRORP1Δ-61. La proteína parece mantenerse estable después del paso de incubación a 65°C.

La fracción correspondiente al pico en la absorbancia del UV se concentró en un centrífugo 30,000 MWCO a una concentración final aproximada de 1mg/ml, se cuantificó y almacenó a 4 °C para su uso posterior. El rendimiento de la cantidad de proteína purificada fue de 33.33 $\mu\text{g}/1\text{ L}$ de medio de cultivo. La fracción eluída de la columna de intercambio aniónico parecía estar lo suficiente limpia y concentrada para continuar con los experimentos subsecuentes; sin embargo, la proteína purificada TcPRORP2 Δ -29 no se encuentra del todo pura, se puede observar la presencia de una banda de proteína con un peso menor a 36 kDa; no hemos determinado si dicha banda pudiera corresponder a un producto de degradación o a un contaminante.

5. La identidad de la proteína TcPRORP2 Δ -29 se comprobó por espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS)

Los resultados del experimento de espectrometría de masas se analizaron con el programa Scaffold, para visualizar y validar experimentos de MS/MS. El análisis de los resultados permitió identificar la proteína hipotética de *T. cruzi* con número de registro NCBI gi/71664466. En el análisis se identificaron 10 péptidos únicos correspondientes a 171 aminoácidos con una cobertura del 31% (171/560) de la secuencia de la proteína PRORP2 de *T. cruzi* (Figuras 22 y 23). A su vez, los resultados del análisis del experimento de espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS), muestran la presencia de otras proteínas junto con la muestra purificada de TcPRORP2 Δ -29, estas son: chaperonina GroEL, tripsina y distintas queratinas de humano, siendo los datos del experimento insuficientes para poder cuantificar cada una de ellas.

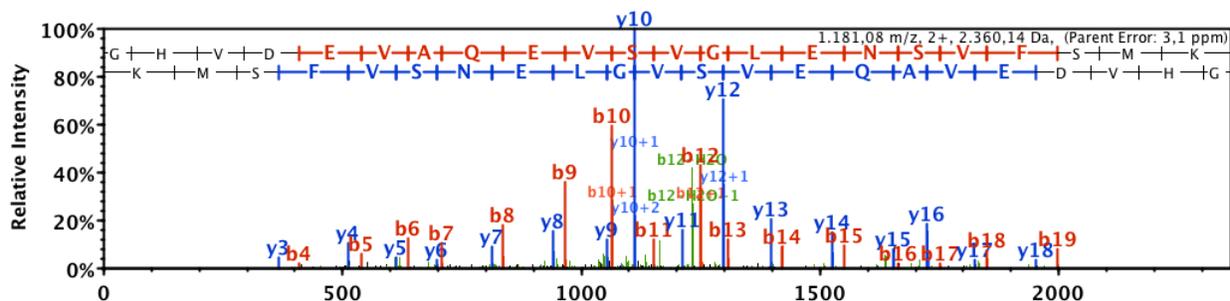


Figura 22. Representación de las intensidades relativas de los espectros del experimento de espectrometría de masas en tándem MS/MS. En rojo se muestra uno de los péptidos de TcPRORP2 identificado y mostrado en la Figura 23.

gi|71664466 (100%), 63.557,4 Da
 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 10 exclusive unique peptides, 20 exclusive unique spectra, 59 total spectra, 171/560 amino acids (31% coverage)

MK RGLNLVAL	SSLTFGHPTS	SQ LVRWKSSS	PAEELQRRVG	QLVGK	GHVD	E
VAQEVSVGLE	NSVF	SMKAF	SALFLCEK	RH	KESIGIELVR	KVQASQMVES
WTDESVLAVI	LRLQCAVGDV	PAATQMF	SFM	VSK	KLRLRS	VSVFLAFWCG
RGDRCMFAV	YEEALRQGI	LRAAEYVELG	RLCVAVREP	PV	STLHFMLR	EM
QEHVLTVPEA	MVTDVICPWT	QAAGLR	MAEV	QFPHDDTTRE	PGTCSFCGCV	
LRGHRFTAQ	KERLLSDVMN	VVMAPRGNP	TRVKVAFAEAW	RRFISTHGQL		
IDVLIIDGANL	GYYGLSSWYE	EAKRALLLAR	GKRAEEIKPK	DVTWMKHGAV		
DVTVNFHLID	LAVQEAQR	RGMQPLILLHER	HCEPKNMTTE	KKVIVAKWRR		
EGILYCTPSG	LNDDLWCWLYA	ALELTTPTDA	TAAGSLVEKT	VWVLTNDLMR		
DHHFKLLSPR	FFARWRDRHR	IAFKCSREDDG	RTLHLHWVMP	E	SYAQCIQELK	
PLTWHIPVTP	QEDTKSCAEE	REREK	AISQE	AQEEEGNEDK	DADDEVIVPP	
RPANR	WV	CV	GV			

Figura 23. Secuencia de la proteína TcPRORP2 identificada por espectrometría de masas en tándem MS/MS analizada con el software Scaffold. El experimento de espectrometría de masas en tándem identificó 59 espectros totales, 20 espectros únicos y 10 péptidos exclusivos. Abarcando un 31% de la secuencia de TcPRORP2. Se muestra en rojo el péptido identificado en la Figura 22.

6. De acuerdo a ensayos de desplegamiento térmico monitoreado por fluorescencia la proteína TcPRORP2Δ-29 presenta alta estabilidad térmica

Para realizar los ensayos de desplegamiento térmico se utilizaron como controles de corrida del experimento, proteína purificada de AtPRORP1Δ-61 y proteína purificada HsTIM (*Homo sapiens* Triosa Fosfato Isomerasa) en el amortiguador de purificación final (NaCl 25 mM, Tris pH 8.0 50 mM, 2 β-mercaptoetanol 5 mM, ZnSO₄ 10 μM y 10% de glicerol) (Figura 24). Los resultados revelan que la temperatura media de desnaturalización (T_m) de TcPRORP2Δ-29 es de ≥70°C en el amortiguador final y en presencia de diversos amortiguadores y aditivos; y de cerca de 88 °C en presencia de 1 M de trehalosa y 50 mM de MOPS (Figura 25).

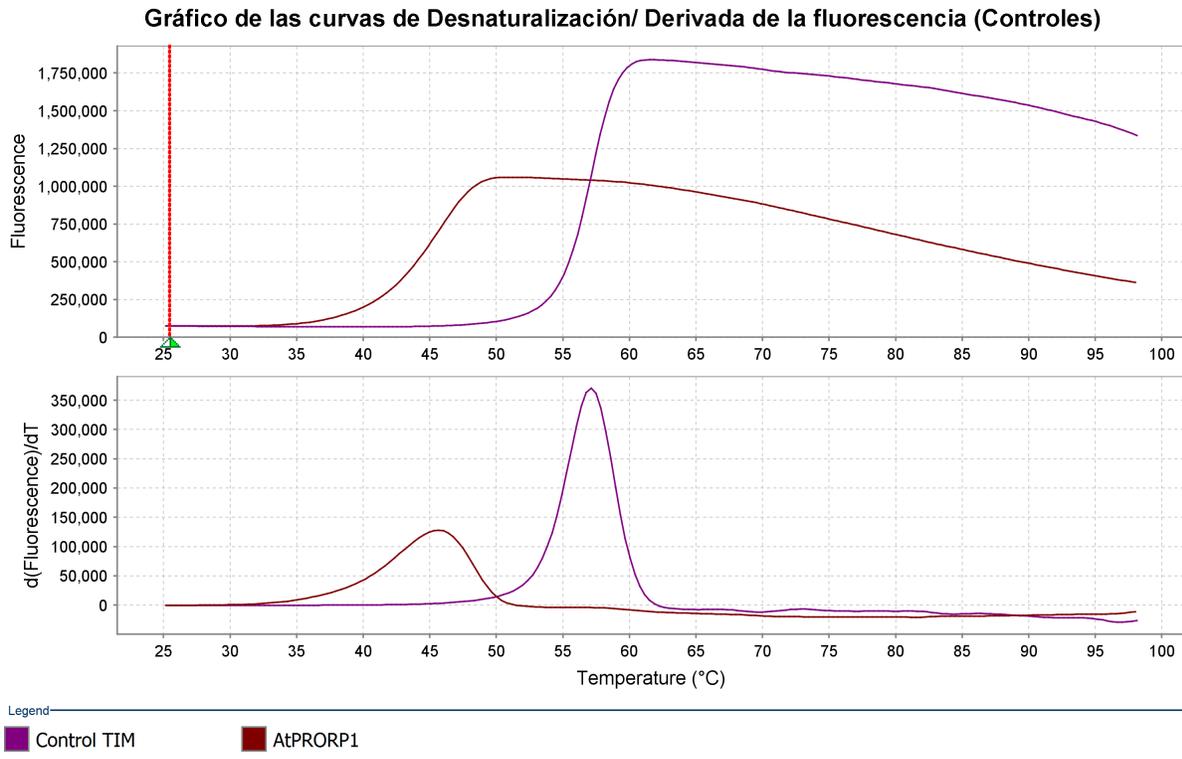


Figura 24. Curvas de desnaturalización térmica de las proteínas modelo AtPRORP1Δ-61 y HsTIM. Gráficas de fluorescencia (superior) y su derivada (inferior) en un gradiente de temperatura. Las curvas de desnaturalización muestran una T_m de ≈ 57 °C para la proteína HsTIM y de ≈ 45 °C para la proteína purificada AtPRORP1Δ-61 en el amortiguador de purificación final (NaCl 25 mM, Tris pH 8.0 50 mM, 2 β-mercaptoetanol 5 mM, ZnSO₄ 10 μM y 10% de glicerol).

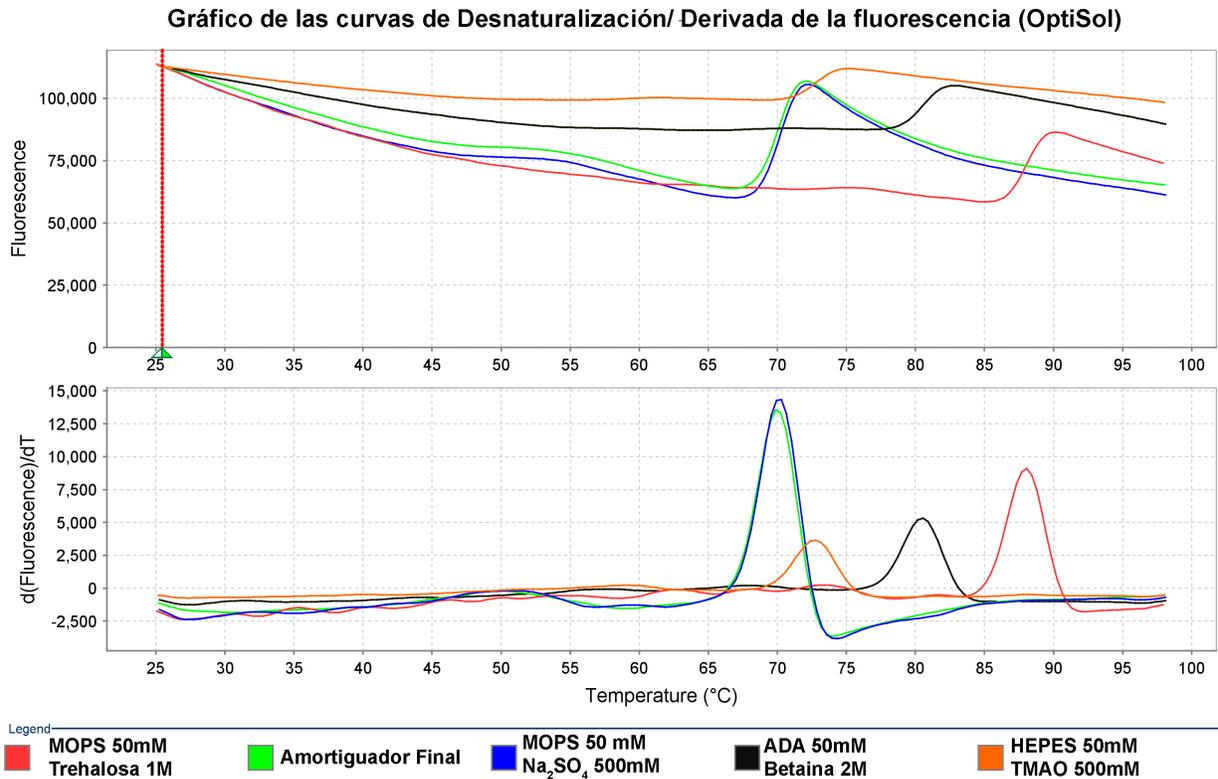


Figura 25. La proteína TcPRORP2Δ-29 es estable a altas temperaturas. Gráficas de fluorescencia (superior) y su derivada (inferior) en un gradiente de temperatura. Las curvas de desnaturalización muestran una T_m para TcPRORP2Δ-29 de ≈70°C en el amortiguador final o en presencia de MOPS 50 mM y Na₂SO₄ 500 mM, ≈73°C en HEPES 50 mM y TMAO 500 mM, ≈80°C en ADA 50 mM y betaina 2 M y de ≈88°C en MOPS 50 mM y trehalosa 1 M.

7. El protocolo de purificación de cinco pasos permite la obtención de una proteína libre de RNasas

Para constatar que la proteína purificada TcPRORP2Δ-29 estuviera libre de RNasas para realizar los ensayos de actividad, se incubó proteína purificada TcPRORP2Δ-29 con pre-tRNA por 24 horas y se analizó el RNA por una PAGE en un gel de acrilamida al 18% en condiciones desnaturalizantes (Figura 26).

Control 15µg pre-tRNA^{Phe}
pre-tRNA^{Phe} +
15 µg 20µg TcPRORP2
Δ-29

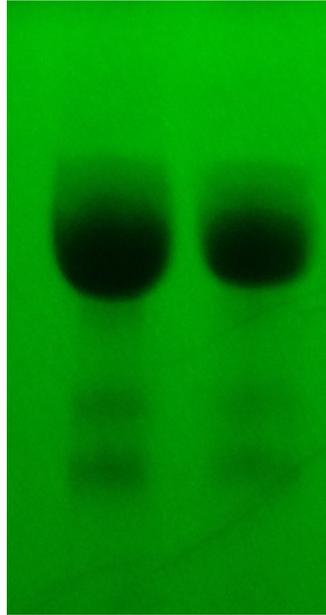


Figura 26. La proteína purificada TcPRORP2Δ-29 parece estar libre de RNasas. PAGE / urea 7 M en un gel de acrilamida al 18% visualizado con luz UV sobre una pantalla de fluoruro (Ambion), se muestra la integridad del RNA después de haberse incubado 15 µg de pre-tRNA con 20 µg de proteína purificada TcPRORP2Δ-29 por 24 horas.

Los resultados no muestran ningún cambio aparente en la integridad del RNA tratado con el extracto purificado de TcPRORP2Δ-29, comparado con el no tratado, lo que indica que la proteína obtenida después de cinco pasos de purificación se encuentra libre de RNasas.

8. La proteína TcPRORP2Δ-29 parece no mostrar actividad de RNasa P sobre un sustrato canónico.

Una vez verificada la identidad de la proteína y constatado que estuviera libre de RNasas, se realizaron ensayos de actividad de RNasa P según lo reportado por Pavlova L. V. *et al.*, 2012. con el pre-tRNA^{Phe} de *T. marítima* (Figura 27).

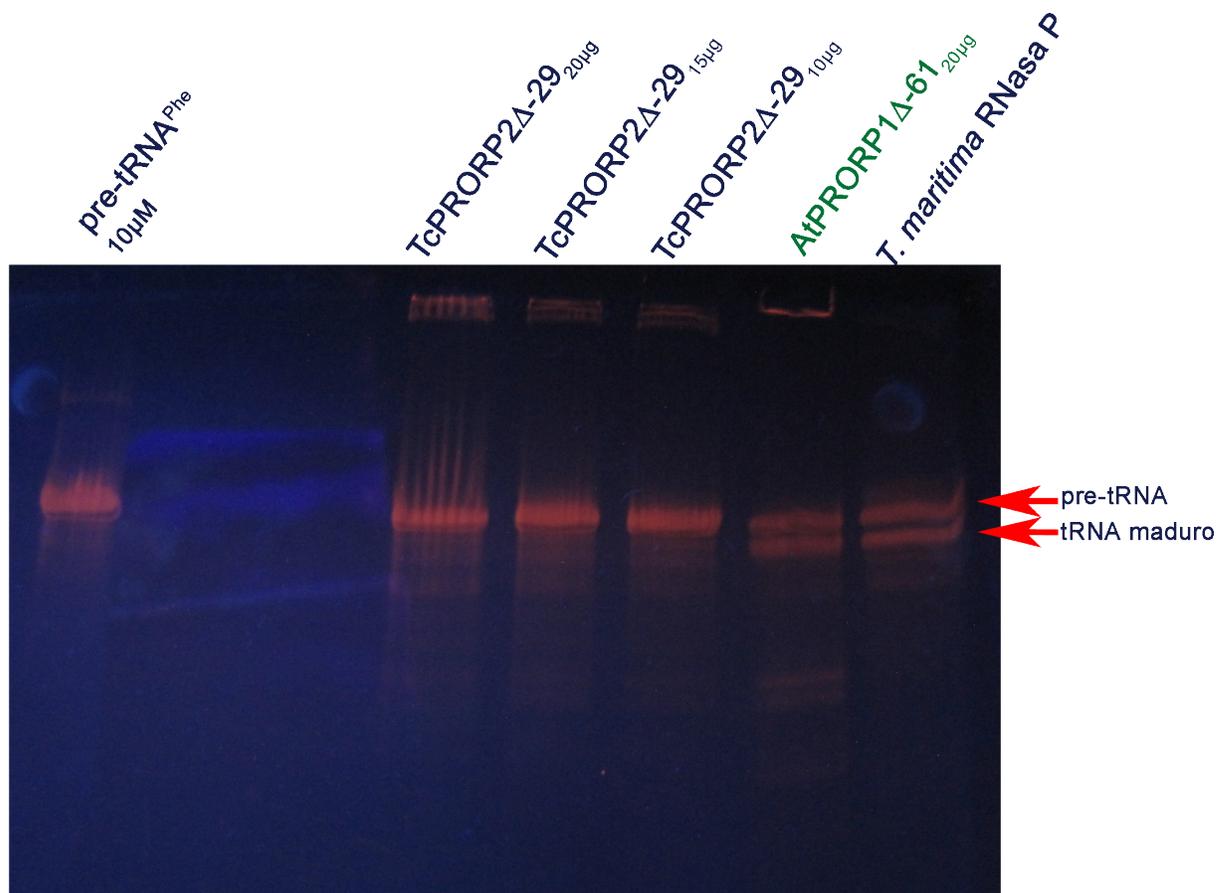


Figura 27. La TcPRORP2Δ-29 parece incapaz de realizar el corte del extremo 5' del pre-tRNA^{Phe} a diferencia de AtPRORP1Δ-61 y la RNasa P de *T. maritima*. PAGE / urea 7 M en un gel de acrilamida al 18% mostrando las reacciones de actividad de RNasa P. La aparición de una banda enriquecida de menor peso molecular por debajo de la banda del pre-tRNA es considerada como una molécula de tRNA sin la extensión terminal 5', es decir el producto de la reacción de RNasa P.

Los resultados del experimento de actividad de RNasa P muestran que, a diferencia del pre-tRNA tratado con la RNasa P canónica de *T. maritima* o con la RNasa P Proteica presente en mitocondria y cloroplastos de *A. thaliana*, donde se observa la aparición de una banda enriquecida de menor peso molecular por debajo de la banda de pre-tRNA, la muestra tratada con TcPRORP2Δ-29 parece conservar el mismo patrón de visualización que la muestra no tratada con ningún tipo de RNasa. Esto último indica que no está habiendo ningún evento de escisión endonucleolítica del extremo 5' del pre-tRNA por parte de la TcPRORP2Δ-29, es decir: la RNasa P Proteica mitocondrial de *T. cruzi* parece incapaz de llevar a cabo la maduración del extremo 5' de las moléculas de pre-tRNA en las condiciones utilizadas.

9. La proteína TcPRORP2Δ-29 parece unir al tRNA de acuerdo a Ensayos de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA)

Debido a que no se observó un corte en las moléculas de pre-tRNA, se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética (Figura 28), con el fin de constatar si dicha falta de actividad se debía a que la enzima no estaba uniendo el pre-tRNA, o si había unión pero no hidrólisis del extremo 5'.

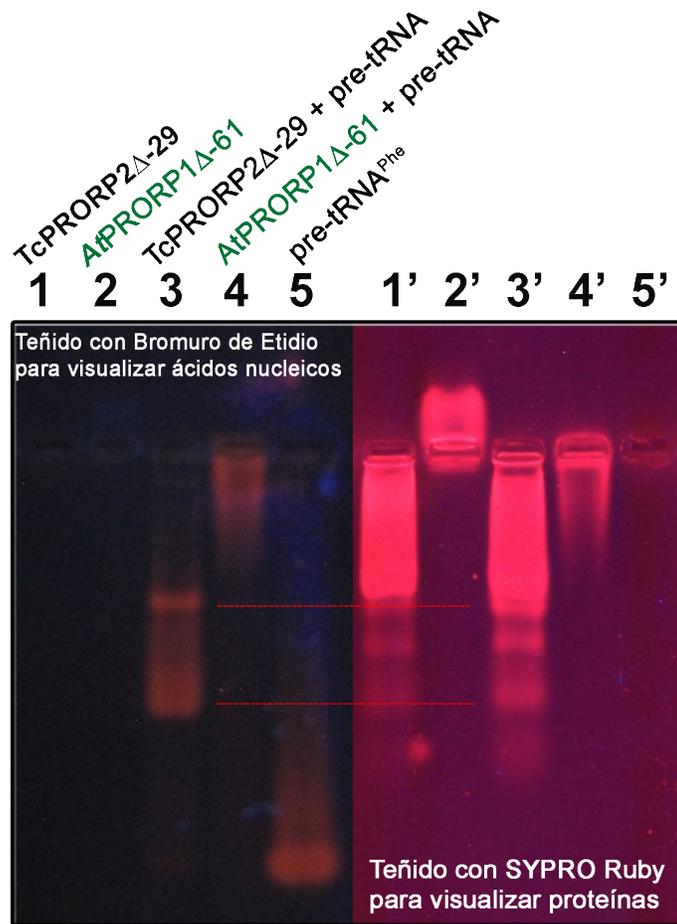


Figura 28. El experimento de cambio de movilidad electroforética muestra la unión de TcPRORP2Δ-29 con el pre-tRNA. Electroforesis en un gel de agarosa al 5%. donde se observa un cambio en la movilidad electroforética del pre-tRNA tratado con la proteína contra el no tratado, lo que indica que la proteína TcPRORP2Δ-29 está uniendo las moléculas de pre-tRNA.

Los resultados del ensayo de cambio de movilidad electroforética, muestran un cambio en el desplazamiento de los ácidos nucleicos en la muestra tratada con la proteína TcPRORP2Δ-29, comparada con la no tratada. A su vez, la proteína AtPRORP1 muestra un cambio en la dirección

del desplazamiento en la presencia de RNA, lo que puede estar reflejando un cambio en el punto isoeléctrico (Pi) del complejo tRNA-proteína tras la adición del tRNA, dado que el punto isoeléctrico calculado de la proteína AtPRORP1Δ-61 es 8.45 y la adición del tRNA lo debe desplazar a un pH más bajo. También el mismo experimento muestra bandas de proteína purificada de distintos tamaños moleculares que se co-localizan con las bandas más intensas de ácidos nucleicos.

Discusión

1. La expresión en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) resultó en proteína expresada de manera insoluble

La obtención de altas cantidades de proteína correctamente plegada en el laboratorio requiere la optimización de distintas condiciones, desde el crecimiento de los cultivos hasta la búsqueda de amortiguadores y osmolitos que estabilicen a la proteína durante los pasos de purificación. El plegamiento de las proteínas es un proceso fisicoquímico complejo mediante el cual, un polímero de aminoácidos que puede adoptar múltiples conformaciones distintas, es plegado para adoptar una estructura específica bien empaçada (Ignatova, Z. y Gierasch, L., 2007). El incorrecto plegamiento de una proteína limita la cantidad de proteína soluble disponible. En nuestro caso, la expresión de la proteína TcPRORP2 Δ -29 en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) parecía llevar a la expresión de proteína de forma insoluble, por lo que no era viable continuar la sobre-expresión de la proteína bajo las condiciones empleadas en principio.

2. El cambio de cepa de sobre-expresión, así como un cambio en la composición del amortiguador usado permitieron la obtención de la proteína TcPRORP2 Δ -29 en forma soluble

2.1. La expresión en forma soluble de la proteína TcPRORP2 Δ -29 se logró con el uso de la cepa de *E. coli* OrigamiB(DE3)pLacI

La cepa de *E. coli* OrigamiB(DE3)pLacI posee mutaciones en los genes que codifican a la tiorredoxina reductasa (trxB) y la glutatión reductasa (gor), mismas que facilitan la formación de puentes disulfuro en el citoplasma de la célula. Lo que nos llevó a la elección de esta cepa, fue la presencia de 15 cisteínas en la secuencia de TcPRORP2 (Figura 29) y el análisis del modelo de la estructura de TcPRORP2, obtenido a través de modelado por homología con el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) generado a partir de la estructura resuelta de la PRORP1 de *A. thaliana* (código PDB 4G26), el cual muestra la presencia de 3 cisteínas en el

dominio de coordinación a zinc expuestas al solvente y 2 cisteínas cercanas entre sí en el dominio NYN (Figura 30), por lo que la cepa de *E. coli* OrigamiB(DE3)pLacI permitió la obtención de una proteína soluble ayudando al correcto plegamiento de la proteína a través de la formación de puentes di-sulfuro.

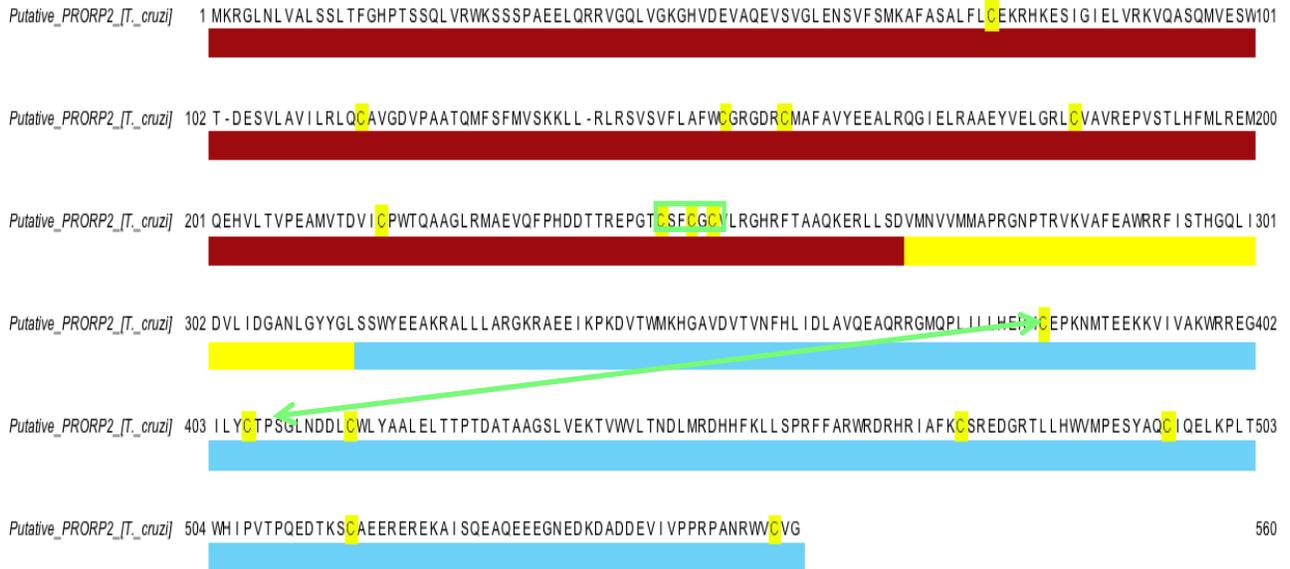


Figura 29. Secuencia de amino ácidos de la TcPRORP2 donde se muestran las cisteínas. Las cisteínas se muestran en amarillo, la flecha verde indica las cisteínas lejanas que podrían formar puentes di-sulfuro entre sí, el recuadro verde señala cisteínas cercanas en el dominio de unión a zinc que podrían estar formando puentes di-sulfuro, las barras de colores muestran los dominios identificados en la estructura de AtPRORP1 (Figura 4).

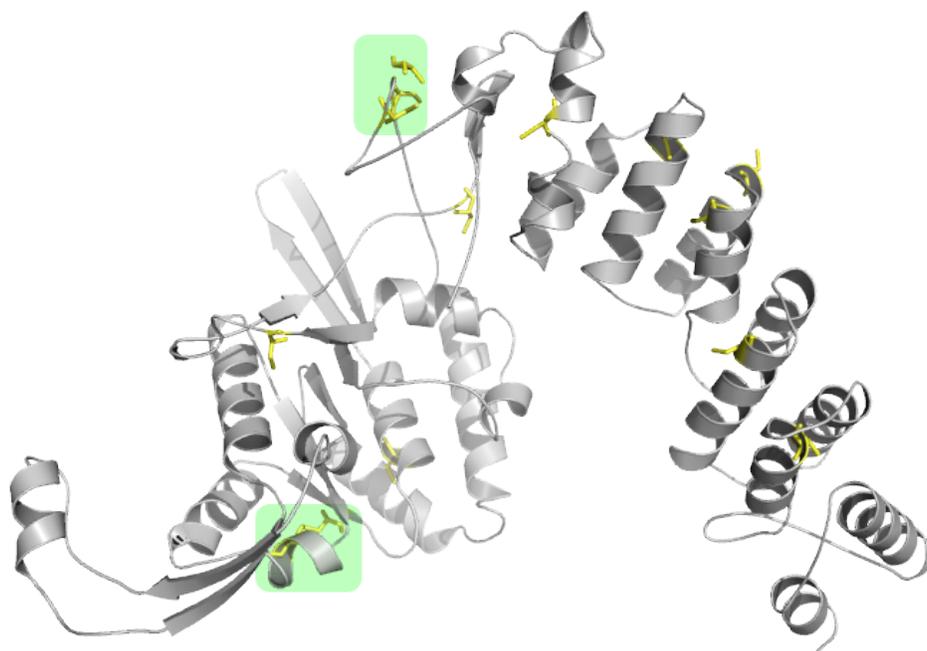


Figura 30. Modelo de la TcPRORP2 obtenido a través de modelado por homología con el servidor SWISS-MODEL generado a partir de la estructura resuelta de la PRORP1 de *A. thaliana* (código PDB 4G26). Las cisteínas se muestran en amarillo, en verde se marcan los sitios donde se asume se podrían estar formando puentes di-sulfuro.

2.2.1. El uso de un amortiguador con 1.5 M de NaCl permitió la solubilización de la proteína

Por otro lado, un paso importante para lograr la solubilización de la proteína fue el cambio del amortiguador usado. Pensados como sustratos inocuos, los amortiguadores tienen efectos profundos en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas (Arakawa, T. y Timasheff, S. N., 1985). Es importante hacer notar que los amortiguadores perturban la estabilidad conformacional debido a una compleja interacción entre varios efectos, más que un mecanismo único y la combinación de mecanismos mediante los cuales el buffer puede causar la estabilización (o des-estabilización) de las proteínas, no son del todo comprendidos (Ugwu S. O. y Apte S. P., 2004). Al problema se suma la inhabilidad para diferenciar definitivamente entre varios mecanismos que estabilizan las proteínas (Sadeghi, M. *et al.*, 2006). La estabilidad conformacional se refiere no sólo a desplegamiento, agregación o desnaturalización, sino también a cambios sutiles en dominios localizados de las proteínas y la alteración de la actividad catalítica de la enzima, que puede ser resultado de la unión de componentes del buffer,

transferencia de protones y efectos mediados directa o indirectamente por el buffer que afecten la unión a cofactores o al sustrato, o debido a que el amortiguador se encuentre actuando como pseudo-sustrato (Ugwu S. O. y Apte, S. P., 2004).

En este sentido, la adición de 1.5 M de NaCl al amortiguador de lisis puede afectar la conformación de la proteína en la medida en que los aniones o cationes de la sal a altas concentraciones se vuelven los componentes potenciales del amortiguador. Se ha reportado que cuando la concentración de la sal excede por mucho a la del amortiguador, ésta se convierte en el amortiguador efectivo en la mezcla. Los aniones caotrópicos desestabilizan la red de moléculas de agua y, por lo tanto, desestabilizan a las proteínas. Los aniones kosmotrópicos ayudan a la formación de la red de moléculas de agua por lo que, de manera general, estabilizan a las proteínas (Ugwu S. O. y Apte, S. P., 2004).

2.2.2. Uso de arginina 40 mM en el amortiguador

El uso de arginina en el amortiguador de extracción ayudó a obtener una proteína soluble, a pesar de la falta de evidencia para determinar un mecanismo de acción específico; la evidencia existente indica que la afinidad de la arginina por algunas de las cadenas laterales de las proteínas puede ser la responsable de inhibir la agregación de las proteínas. Se ha reportado que el grupo guanidina de la arginina, interactúa con los electrones π de los anillos aromáticos de las cadenas laterales, por lo que se cree que la arginina puede interactuar con este tipo de residuos en las cadenas laterales que se encuentran ocultos en proteínas nativas, pero que pueden ser las responsables de la agregación de estructuras proteicas mal plegadas o no plegadas en solución. Esta interacción puede ser suficiente para suprimir la agregación de intermediarios del plegamiento o desagregar complejos proteicos formados (Tsumoto, K. *et al.*, 2004).

3. La proteína TcPRORP2 Δ -29 tiene una baja afinidad por la resina de níquel, por lo que la cantidad de proteína purificada permanece baja

Bajo condiciones de estrés, *E. coli* puede producir quelantes fuertes de bajo peso molecular llamados metalóforos, los cuales se encuentran principalmente en el espacio periplasmático y que reducen la capacidad de unión de la columna de Ni-NTA (Kaplow, I. *et al.*,

2009). Por lo que la eliminación del material periplasmático antes del paso de lisis puede ayudar a incrementar la cantidad de proteína recombinante obtenida del paso de purificación por IMAC.

En ocasiones, la etiqueta de histidinas se puede encontrar parcial o completamente escondida en la estructura de la proteína, lo que puede causar un perfil de elución temprana de la proteína o la completa inhibición de unión a la resina de níquel, por lo que se puede utilizar un paso de desnaturalización para exponer la etiqueta al solvente; si la desnaturalización de la proteína no es un paso deseable, la etiqueta puede ser cambiada al extremo terminal opuesto de la proteína. (Crowe, J. *et al.*, 1994). Sin embargo en nuestro caso, la experiencia experimental derivada del trabajo con otras proteínas PRORP (AtPRORP1, AtPRORP1mut, AtPRORP2, AtPRORP2mut) nos ha demostrado que la etiqueta terminal en el extremo N-terminal de la proteína, como la utilizada en este caso, suele llevar a la obtención de mayores cantidades de proteína durante los pasos de purificación por IMAC.

4. La purificación de TcPRORP2 Δ -29 se logró a través de un protocolo de cinco pasos; sin embargo, la proteína muestra restos de contaminantes

Los geles desnaturalizantes de poliacrilamida muestran que la proteína purificada TcPRORP2 Δ -29 no se encuentra del todo pura, se puede observar la presencia de una banda de proteína con un peso menor a 36 kDa; a su vez, los resultados del análisis del experimento de espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS), muestran la presencia de otra proteína con un peso molecular de 57.3 kDa. Es sabido que el primer paso de purificación es crucial para la obtención de una proteína pura; sin embargo, el primer paso de IMAC brinda una baja cantidad de proteína TcPRORP2 Δ -29 aún con restos de contaminantes, por lo que no es inesperado que los mismos que persistan a lo largo del protocolo de purificación.

5. La identidad de la proteína TcPRORP2 Δ -29 fue comprobada por espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS)

Como se ha mencionado, los resultados del experimento de espectrometría de masas (LTQ-FT LC/MS/MS), además de identificar la identidad de la proteína purificada como la RNasa P Proteica mitocondrial de *T. cruzi*, muestran la presencia de otra proteína similar a una

chaperonina groEL – Weevil (número de registro gil7443844) que se purifica junto con la TcPRORP2.

Las chaperoninas son grandes complejos proteicos en forma de cilindro. Las chaperoninas del grupo I, como GroEL endógena de *E. coli* o Hsp60 de la mitocondria y cloroplastos, funcionan en conjunción con los cofactores GroES o Hsp10 respectivamente. Se estima que cerca de 30% del total de proteínas de *E. coli* son auxiliadas en su plegamiento por GroEL. (Feldman, D. E. y Frydman J., 2000).

Aunque no es del todo claro porqué la chaperonina GroEL co-purifica con la TcPRORP2 Δ -29, el peso molecular observado corresponde con el peso molecular del monómero de GroEL (57.3 kDa); sin embargo, consideramos que la cantidad de proteína GroEL co-purificada es ínfima en relación a la cantidad de proteína TcPRORP2 Δ -29, esto debido a que la intensidad de la banda de proteína de \approx 57.3 kDa es menor en relación a la intensidad de la banda de \approx 60.3 kDa; más aún, el oligomero de GroEL en su forma activa está compuesto por catorce subunidades, por lo que los ensayos de actividad, cambio de movilidad electroforética y desplazamiento térmico, deben reflejar el comportamiento de la proteína TcPRORP2 Δ -29 y no así el de GroEL. A su vez, no parece probable que la TcPRORP2 Δ -29 esté siendo plegada por el complejo GroEL-GroES, ya que el tamaño promedio de los sustratos procesados por el mismo es de alrededor de 33 kDa (Weissman, J. S. *et al.*, 1994).

Si GroEL se está uniendo directamente o indirectamente a la proteína TcPRORP2 Δ -29, o si se co-purifica a lo largo del protocolo de cinco pasos, no es algo evidente, pero es probable que alguno(s) de los rastros de contaminantes, puedan ser proteínas que se mantengan unidas a la chaperonina GroEL durante el proceso de purificación.

Las identidades de las proteínas identificadas en el experimento de espectrometría de masas corresponden a: proteína hipotética PRORP2 de *T. cruzi*, chaperonina GroEL de *E. coli*, cadena A de tripsina de *Homo sapiens*, queratina tipo 1 de *Pan troglodytes*, queratina 1 de *Homo sapiens*, queratina tipo 2 de *Pan troglodytes* y queratina 14 de *Homo sapiens*.

6. La proteína TcPRORP2 Δ -29 muestra una estabilidad térmica inesperada

Los resultados del ensayo de desplazamiento térmico ligado a fluorescencia, indican que la proteína TcPRORP2 Δ -29 presenta una estabilidad térmica relativamente elevada ($T_m \approx 70^\circ\text{C}$

en el amortiguador final o en presencia de MOPS 50 mM y Na₂SO₄ 500 mM, T_m ≈88°C en MOPS 50 mM y trehalosa 1 M) para una proteína perteneciente a un organismo que habita ambientes mesófilos (37°C), y cuyo homólogo de *A. thaliana* presenta una T_m de ≈45 °C en el mismo amortiguador final. Esto es interesante debido a que los tripanosomátidos están expuestos a un choque térmico de al menos 10°C durante la transición entre el vector invertebrado y el hospedero vertebrado (Fernández-Moya *et al.*, 2010), lo que podría explicar la necesidad de una aparente estabilidad térmica de la proteína TcPRORP2Δ-29.

La estabilidad térmica de las proteínas en general y especialmente en la proteínas termoestables, ha sido objeto de amplio interés e investigación teórica y experimental. Las proteínas termofílicas no son sólo estables, sino también poseen una actividad óptima a temperaturas elevadas; un incremento en el número de los puentes salinos y puentes de hidrógeno pueden otorgar una rigidez tal, que la proteína sufre el riesgo de volverse inactiva. Aún así, a pesar de que una proteína termofílica puede ser rígida a temperatura ambiente es flexible a temperaturas mayores (Kumar, S. *et al.*, 2000).

6.1. El remplazo de lisina → arginina ayuda a incrementar la estabilidad térmica de las proteínas

Es posible que las diferencias observadas entre proteínas mesófilas y termófilas, se deban a diferencias filogenéticas en la distribución de los aminoácidos entre organismos mesófilos y termófilos. Por ejemplo, el remplazo de lisina → arginina se refleja en proteínas termoestables (Szilágyi, A. y Závodszk, P., 2000). Este ejemplo puede ser observado comparando las secuencias de la AtPRORP1 (T_m de ≈45°C) y la TcPRORP2 (T_m de ≈70°C), donde encontramos que este tipo de sustitución se repite 6 veces a lo largo de la secuencia de aminoácidos (Figura 31).

6.2. Las proteínas termoestables tienen mayor número de aminoácidos cargados que sus homólogos mesófilos

Es común encontrar en mayor número los aminoácidos cargados (lisina, arginina, ácido

aspártico, histidina o ácido glutámico) en una proteína termófila que en una proteína mesófila (Szilágyi, A. y Závodszk, P., 2000), en el caso de distintas proteínas termofílicas, la evidencia experimental muestra que los puentes salinos (enlaces iónicos) juegan un papel fundamental en la estabilización térmica de las proteínas (Sadeghi, M. *et al.*, 2006); (Kumar, S. *et al.*, 2000), por lo que es probable que los pares iónicos complejos aumenten la estabilidad a través de interacciones electrostáticas.

En el caso de las proteínas AtPRORP1 y TcPRORP2, se observa un incremento significativo en el uso de aminoácidos con cadenas laterales cargadas en la TcPRORP2, en comparación con la AtPRORP1 (Figura 31), donde la diferencia en el uso de aminoácidos cargados de la TcPRORP2, comparada con las mismas posiciones en la secuencia de AtPRORP1, es mayor al 10% del total de residuos presentes en la secuencia.

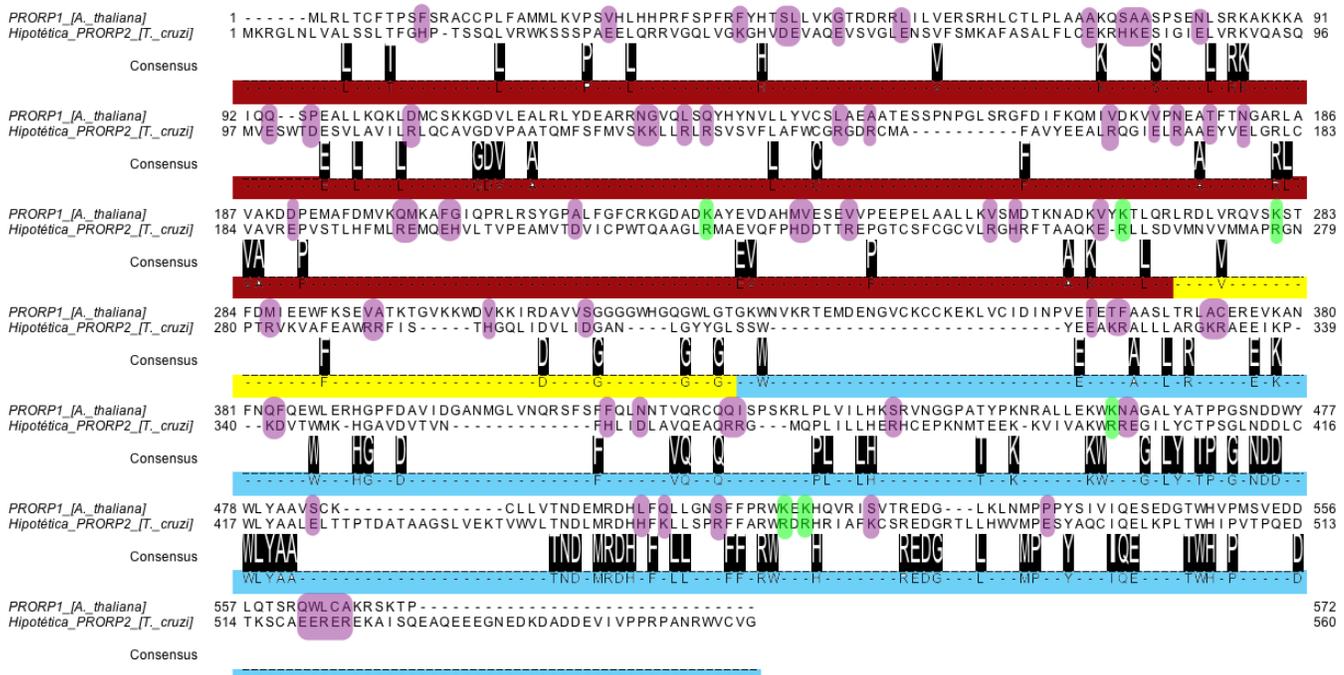


Figura 31. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos de AtPRORP1 y TcPRORP2 donde se indican las características que se cree pueden brindar estabilidad térmica a las proteínas. En magenta se muestran las sustituciones donde un residuo no cargado en AtPRORP1 cambia por un residuo cargado en TcPRORP2 y en verde las sustituciones de lisina → arginina. Las barras de colores muestran los dominios identificados en la estructura de AtPRORP1 (Figura 4).

Las proteínas termofílicas optimizan su estabilidad a través de distintos mecanismos no del todo claros. A pesar de que la secuencia de aminoácidos y los factores de estructura como: empacamiento, oligomerización, inserciones y deleciones, sustituciones de prolinas, contenido de alfa hélices, área de la superficie polar, puentes de hidrógeno y puentes salinos, han sido propuestos como los elementos que contribuyen a brindar estabilidad térmica a una proteína (Kumar, S. *et al.*, 2000), estas características no muestran una fórmula específica para incrementar la estabilidad en las distintas familias de proteínas que existen en la naturaleza.

6.3. El incremento en elementos de estructura secundaria ayuda a estabilizar las proteínas

Se puede observar un incremento ligeramente significativo en el contenido de elementos de estructura secundaria en las proteínas termofílicas que corresponde a una disminución de regiones desordenadas; también vale la pena mencionar que mientras que en proteínas moderadamente térmicas se observa la aparición de hélices α , en proteínas con mayor estabilidad térmica se observa la aparición de láminas β (Szilágyi, A. y Závodszk, P., 2000).

En este sentido, el modelo de la estructura de TcPRORP2 obtenido a través de modelado por homología (Figura 32), muestra la presencia de dos motivos estructurales no presentes en la estructura resuelta de la AtPRORP1, estos son: un motivo β - α - β cerca del sitio activo y un motivo β - β en la parte posterior del sitio activo, a su vez, el modelo teórico obtenido indica la falta de un elemento de estructura secundaria (una hélice α) en el dominio de unión a zinc de TcPRORP2 en comparación con la estructura resuelta de AtPRORP1, así como el cambio de dos láminas β en AtPRORP1 por una hélice α en TcPRORP2 también en el dominio de unión a zinc.

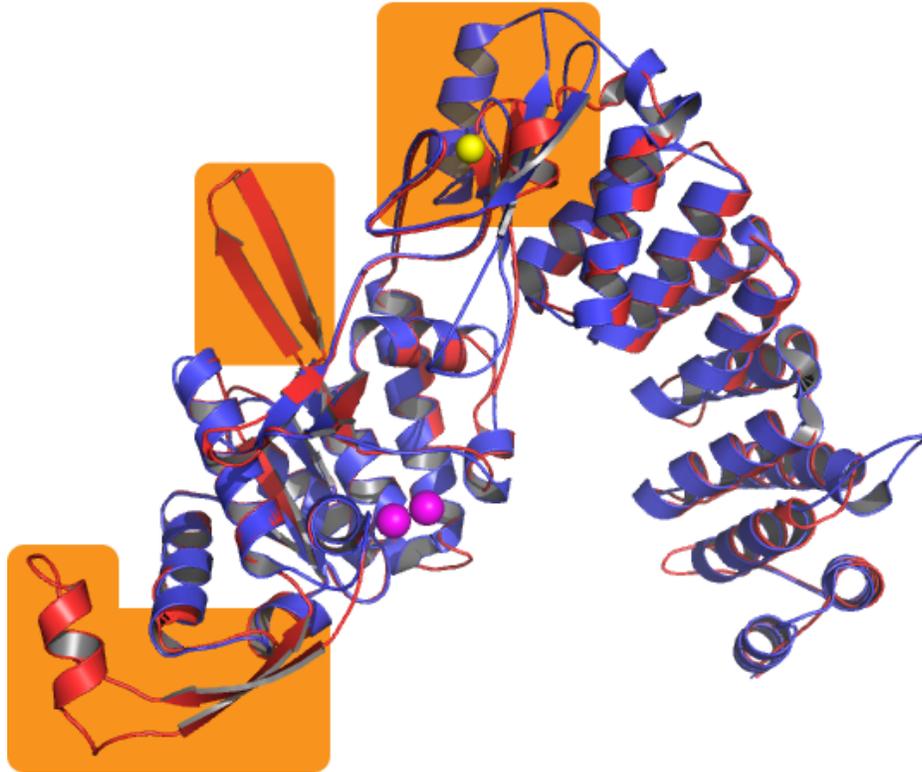


Figura 32. Comparación de las estructuras determinadas a partir de datos experimentales de AtPRORP1 (código PDB 4G26) y generadas a partir de modelado por homología de TcPRORP2. Se muestra a AtPRORP1 en azul y en una orientación similar que en la Figura 4 y el modelo generado para TcPRORP2 con SWISS-MODEL en rojo. El modelo teórico de la TcPRORP2 muestra diferencias en el contenido de estructuras secundarias marcadas con anaranjado: la presencia de 2 motivos ausentes en AtPRORP1 en el dominio NYN, el cambio de un elemento de estructura secundaria y la ausencia de una hélice α en el dominio de unión a zinc.

6.4. La mayoría de las diferencias en el modelo de TcPRORP 2 parecen ubicarse en regiones de la superficie

A pesar de la predilección por el uso de algunos aminoácidos en lugar de otros en la secuencia de las proteínas termofílicas (Szilágyi, A. y Závodszk, P., 2000); (Sadeghi, M. *et al.*, 2006), se ha sugerido, es una conjunción de los distintos factores que afectan la estabilidad térmica de una proteína, en lugar de algún fenómeno en específico. Por un lado, las proteínas termofílicas prefieren residuos con cadenas laterales grandes que sean capaces de formar puentes salinos, interacciones electrostáticas de corto o largo alcance e interacciones hidrofóbicas, las cuales estabilizan los elementos de estructura secundaria (Kumar, S. *et al.*, 2000), si extrapolamos algunas de las características que se cree brindan estabilidad térmica a nuestro

modelo teórico de la proteína TcPRORP2, podemos observar que la mayoría de estos cambios se producen en residuos que se encuentran en la superficie de la proteína (Figura 33).

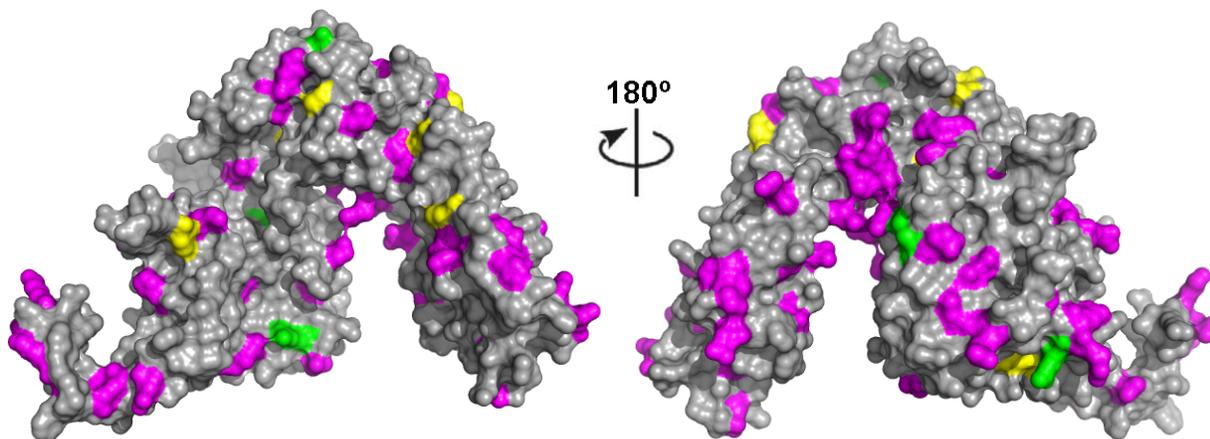


Figura 33. Modelo de la TcPRORP2 mostrando los aminoácidos expuestos al solvente que se cree pueden estar incrementando la estabilidad térmica de la proteína. A la izquierda se muestra TcPRORP2 en una orientación similar que la Figura 4 (AtPRORP1), en amarillo se muestran las **cisteínas** identificadas en la Figura 30; en verde los residuos identificados en la Figura 31 las **substituciones de lisina → arginina** y en magenta las **sustituciones por residuos cargados**.

De lo observado en los patrones de estabilización, es razonable asumir que las principales interacciones para lograr la estabilidad térmica son aquellas que se pueden formar relativamente rápido a la vista del proceso de evolución molecular. Por lo que las interacciones en la superficie de la proteína parecen ser las preferidas (Szilágyi, A. y Závodszk, P., 2000).

7. El protocolo de purificación de cinco pasos permite la obtención de una proteína libre de RNasas

Aunque no se utilizaron inhibidores de RNasas durante el protocolo de purificación de la proteína, las correctas prácticas de laboratorio nos permitieron la obtención de una proteína purificada aparentemente libre de RNasas.

8. Los ensayos de actividad de RNasa P muestran que la TcPRORP2Δ-29 parece incapaz de realizar la maduración del extremo 5'

Los resultados de los ensayos de actividad de RNasa P indican que, al menos en las condiciones en las que una RNasa P canónica y una RNasa P Proteica presentan actividad, la proteína TcPRORP2Δ-29 posee la capacidad de unir moléculas de pre-tRNA, pero a diferencia de otras RNasas P Proteicas caracterizadas al día de hoy, parece incapaz de realizar la maduración del extremo 5' del pre-tRNA.

Lo anterior discrepa con lo reportado en *T. brucei*, donde se menciona la presencia de 2 enzimas PRORP, una en núcleo y la otra en mitocondria y que ambas poseen actividad de RNasa P (Taschner A. *et al.*, 2012) sobre los pre-tRNAs^{Phe} y ^{His} de *T. brucei*, el pre-tRNA^{Tyr} de *E. coli* y el pre-tRNA^{Gly} de *Thermus thermophilus*. Como se puede apreciar de la Figura 27, nuestras reacciones control están aún lejos de ser completas, por lo que estudios posteriores requerirán la optimización de los parámetros utilizados para ser concluyentes en este aspecto.

9. Los experimentos de EMSA confirman que la TcPRORP2Δ-29 es capaz de unir al pre-tRNA y revelan la presencia de distintos estados de oligomerización

Los experimentos de Cambio de Movilidad Electroforética, muestran que la RNasa P Proteica mitocondrial de *T. cruzi*, está uniendo las moléculas de pre-tRNA, lo que indica que es capaz de unir moléculas de RNA con una estructura similar a los tRNAs.

Los mismos experimentos muestran que en condiciones nativas, la proteína purificada TcPRORP2Δ-29 presenta un patrón de desplazamiento electroforético diferencial, lo que sugiere la presencia de múltiples tamaños moleculares, mismo que se co-localiza con las distintas intensidades de ácidos nucleicos observadas en el mismo experimento, lo que parece indicar la presencia de distintos estados de oligomerización de la TcPRORP2; esta incógnita podría ser resuelta con la adición de un paso más de cromatografía de exclusión molecular al final de los cinco pasos de purificación.

9.1. Posible diversidad de sustratos de TcPRORP2

Es importante apreciar la estructura de las proteínas de unión a RNA y los dominios de unión a RNA que les permiten acoplarlo. Los dominios de unión a RNA tienen distintas propiedades versátiles: pueden unir RNA de cadena sencilla (ssRNA) o RNA de cadena doble (dsRNA), pueden reconocer secuencias específicas (a nivel de estructura primaria de RNA) o alternativamente pueden reconocer estructuras de RNA a nivel tridimensional. Las proteínas de unión de RNA pueden actuar combinando distintos dominios de unión a RNA, a menudo asistidos por dominios auxiliares (partes de la proteína que ayudan a la unión del RNA al brindar sitios extra de unión o la habilidad para promover interacciones de tipo proteína-proteína). Los contactos con el RNA y la proteína se pueden dar a través de las bases del RNA, el azúcar ribosa y/o los grupos fosfatos (Elliott, D. y Ladomery, M., 2011) En este sentido, dadas las diferencias en la superficie entre TcPRORP2 y AtPRORP1 (Figura 32), así como la evidencia que indica que la TcPRORP2 es capaz de unir moléculas de pre-tRNA pero parece incapaz de realizar la hidrólisis del extremo 5', es posible que dichas características estructurales puedan conferir a la proteína TcPRORP2 la capacidad de unir otros RNAs en lugar de los pre-tRNAs.

No obstante, a pesar de que ha sido demostrado que la gran mayoría de las enzimas PRORP poseen actividad de RNasa P y que, incluso, son capaces de reemplazar la actividad de RNasa P en organismos que si dependen de la ribozima para llevar a cabo la maduración del extremo 5' de los pre-tRNAs, no es evidente por qué en la mitocondria de tripanosomátidos la enzima PRORP debería tener actividad de RNasa P. Ya que como se ha mencionado, múltiples estudios demuestran que la mayoría de las moléculas de pre-tRNA presentes en la mitocondria de estos organismos, son importadas como moléculas maduras, al menos en términos de la longitud de sus extremos terminales 5' y 3' (Christoph E. Nabholz *et al.*, 1999); (Hauser, R., y A. Schneider., 1995); (Aphasizhev, R. *et al.*, 1998); (Kapushoc, S. T. *et al.*, 2000).

Por lo tanto, así como la RNasa P basada en RNA es responsable del procesamiento de múltiples sustratos, entre los que se incluyen rRNAs, mRNAs y cebadores para la replicación de DNA mitocondrial entre otros (Hernandez-Cid. *et al.*, 2012), nosotros sugerimos que: la RNasa P Proteica presente en la mitocondria de *T. cruzi* juega un papel distinto a la maduración del extremo terminal 5' de las moléculas de pre-tRNA, pudiendo desempeñar otro u otros roles en la biogénesis de RNA en estos organismos.

Conclusión

La identidad de la proteína expresada y purificada corresponde a la putativa RNasa P Proteica mitocondrial de *T. cruzi*; la proteína muestra la capacidad de unir moléculas de pre-tRNA, pero parece incapaz de realizar la hidrólisis del extremo 5' líder en las condiciones de reacción empleadas.

Perspectivas

a) Se logró sobre-expresar la proteína TcPRORP2 Δ -29 de manera soluble y el protocolo de cinco pasos de purificación, permitió la obtención de una proteína libre de RNasas; sin embargo, la cantidad de proteína pura sigue siendo baja (33.33 μ g / L de medio de cultivo). Es indispensable la optimización de las condiciones de expresión y purificación para la obtención de mayores cantidades de proteína pura por litro de medio de cultivo. En este sentido es probable que la co-expresión de la proteína TcPRORP2 Δ -29 junto con algún set de chaperonas como dnaK-dnaJ-grpE como los suministrados por la compañía TaKaRa Bio, pueda permitir la obtención de mayores cantidades de proteína pura por litro de medio de cultivo. También, el protocolo de purificación puede ser optimizado, tanto para obtener mayores cantidades de proteína expresada en *E. coli* con la adición de un paso para remover el periplasma celular, como para obtener una muestra más pura y homogénea con la adición de un paso de cromatografía de exclusión molecular.

b) Aunque *E. coli* es utilizado como uno de los sistemas de expresión de proteínas preferidos por muchos grupos de trabajo, en algunos casos, como en los de proteínas eucariotas con modificaciones post-transcripcionales, la expresión en *E. coli* puede resultar en agregación o degradación, llevando a un bajo rendimiento en la expresión de la proteína de interés. En algunos casos, se pueden obtener mayores rendimientos en la cantidad de proteína expresada con el uso de sistemas de expresión eucariotas, los cuales cuentan con la maquinaria necesaria para introducir modificaciones post-transcripcionales (Niimi, T., 2012). Entre los sistemas de expresión eucariotas, el uso del protozooario *L. tarentolae* ha demostrado ser de gran utilidad para la expresión de proteínas recombinantes; dicho sistema permite la expresión de proteínas complejas eucariotas en altos niveles comparado con otros sistemas de expresión, además, tiene la habilidad de introducir modificaciones post-traduccionales en la proteína expresada (Klatt, S. y Konthur, Z., 2012), por lo que sería interesante la expresión de la proteína TcPRORP2 Δ -29 en un sistema de expresión eucariota como el descrito, cuyo crecimiento y manejo, similar a los empleados con sistemas bacterianos, permite que sea viable trabajar con este microorganismo en el laboratorio, hemos montado ya en el laboratorio este sistema de expresión y esperamos lograr avances en este sentido.

c) Aunque fue posible sobre-exresar en forma soluble la TcPRORP2, no así la TcPRORP1. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias es menor al 30% (28.98); es decir, no son más similares entre ellas de lo que son con otras proteínas PRORP de plantas y animales. La obtención de la proteína TcPRORP1 puede ayudar a demostrar si el fenómeno de estabilidad térmica es propio de la TcPRORP2 por tratarse de una proteína mitocondrial, que se espera se encuentre activa cuando el parásito *T. cruzi* se encuentra en un estadio de ciclo de vida activo, esto es en el interior del hospedero, donde las temperaturas son más altas que en el estadio del ciclo de vida en el vector invertebrado, por lo que la obtención de la estructura de TcPRORP1 y TcPRORP2 a partir de datos experimentales, ofrece un modelo atractivo para analizar las determinantes que pueden brindar estabilidad térmica en esta familia de proteínas, por lo que también es importante la obtención de la RNasa P Proteica nuclear de *T. cruzi* (TcPRORP1) de forma pura, homogénea y en cantidad suficiente.

d) En tripanosomátidos siguen sin identificarse moléculas de edición de RNAs con funciones predichas como: un número de snoRNAs, telomerasas y homólogos de los RNAs U8, U14 y U22, los cuales se encuentran involucrados en el procesamiento de rRNA en otros eucariotas (Michaeli S. *et al.*, 2012). Lo que sugiere que los tripanosomátidos deben poseer una maquinaria distinta para llevar a cabo eventos ubicuos de procesamiento de RNAs. A la par, se ha reportado que en tripanosomátidos existen dos isoformas de los tRNA^{Trp} y tRNA^{Asp}, que cada una de las isoformas es aminoacilada por una enzima distinta y que estas enzimas son capaces de diferenciar entre las isoformas mitocondriales y citosólicas. Sugiriendo que las isoformas presentes en la mitocondria deben sufrir algún tipo de modificación en el interior de ésta (Schneider, A., 2011). Por lo tanto elucidar cuál o cuáles pueden ser los sustratos de la RNasa P Proteica presente en la mitocondria de *T. cruzi* y su papel en la edición de RNAs en estos organismos, revelará si esta proteína tiene un papel esencial en el ciclo de vida de tripanosomátidos y por tanto, si es o no, un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos, cuyo objetivo sea el tratamiento de enfermedades causadas por *T. cruzi*.

Bibliografía

- Aphasizhev, R., Karmarkar U., y Simpson, L. **Are tRNAs imported into the mitochondria of kinetoplastid protozoa as 5'-extended precursors?** (1998) *Molecular and Biochemical Parasitology* 93: 73–80
- Arakawa, T. y Timasheff, S. N. **Stabilization Of Proteins By Osmolytes.** (1985) *Biophys. J.* Vol. 47 411-414
- Christoph E. Nabholz, Elke K. Horn, y Andre Schneider **tRNAs and Proteins Are Imported into Mitochondria of Trypanosoma brucei by Two Distinct Mechanisms** (1999) *Molecular Biology of the Cell* Vol. 10, 2547–2557
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. y Henco, K. **6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression and Purification.** (1994) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 31 *Protocols for Gene Analysis*
- Doudna J. A. y Cech T. R. **The chemical repertoire of natural ribozymes.** (2002) *Nature* Vol 418
- Elliott, D y Ladomery, M. *Molecular Biology of RNA.* Chapter 4 **The RNA Binding-Proteins** (2011) Oxford Press
- Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., DeTitta, G. T., Dekker, N. y Nordlund, P. **Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies** (2006) *Analytical Biochemistry* 357 289–298
- Evans D., Marquez S., M. y Pace N., R. **RNase P: interface of the RNA and protein worlds** (2006) *Trends in Biochemical Sciences* Vol.31 No.6 June
- Feldman, D. E. y Frydman J. **Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones.** (2000) *Current Opinion in Structural Biology*, 10:26–33
- Fenton, W. y Horwich, A. L. **GoEL-mediated protein folding.** (1997) *Protein Science* 6743-760.
- Frank D. N. y Pace N. R. **Ribonuclease P: Unity and Diversity in a tRNA Processing Ribozyme.** (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67:153–180
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., y Altman, S. **The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme.** (1983) *Cell* 35, 849–857
- Gobert A., Gutmann B., Taschner A., Gößringer M., Holzmann J., Hartmann R. K., Rossmannith W. y Giegé P. **A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity.** (2010) *Nature and Structural Biology* Vol. 17, 740-744
- Gobert A., Pinker F., Fuchsbaauer, O., Gutmann, B., Boutin, R., Roblin, P., Sauter, C., y Giegé P. **Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA.** (2013) *Nature Communications* 4:1353.
- Goldfarb K. C., Borah S. y Cech T. R. **RNase P branches out from RNP to protein: organelle-triggered diversification?** (2012) *Genes Dev.* 26: 1005-1009
- Gutmann B., Gobert A. y Giegé P. **PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in Arabidopsis.** (2012) *Genes & Dev.* 26: 1022-1027
- Hartmann, Enno y Hartmann, K. Roland. **The enigma of ribonuclease P evolution.** (2003) *TRENDS in Genetics* Vol.19 No.10 October
- Hauser, R., y A. Schneider. **tRNAs are imported into mitochondria of Trypanosoma brucei independent of their genomic context and of their genetic origin.** (1995) *EMBO J.* 14:4212–4220.
- Hernandez-Cid A., Aguirre-Sampieri S., Diaz-Vilchis A. y and Torres-Larios A. **Ribonucleases P/MRP and the Expanding Ribonucleoprotein World.** (2012) *IUBMB Life*, 64: 521–528
- Holzmann, J., Frank P, Löffler E., Bennett K. L., Gerner C. y Rossmannith W. **RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme.** (2008) *Cell* 135, 462–474
- Howarda M. J., Limb W. H., Fierke C. A., y Koutmosd M. **Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5'**

processing. (2012) PNAS 109: 16149–16154

Ignatova, Z. y Gierasch, L. **Effects of Osmolytes on Protein Folding and Aggregation in Cells** (2007) *Methods in Enzymology*, Volume 428 355-372

Kaplow, I., Singh, R., Friedman, A., Bakal, C., Perrimon, N. y Berger, B. **Enabling IMAc purification of low abundance recombinant proteins from E. coli lysates** (2009) *Nature Methods* Vol. 6 477-478

Kapushoc, S. T., Alfonzo J. D., Rubio, M. A. T. y Simpson, L. **End Processing Precedes Mitochondrial Importation and Editing of tRNAs in Leishmania tarentolae.** (2000) *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 275, No. 48, Issue of December 1, pp. 37907–37914

Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. y Aebersold, R. **Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search** (2002) *Anal. Chem.* 74, 5383-5392

Klatt, S. y Konthur, Z. **Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in Leishmania tarentolae** (2012) *Microbial Cell Factories* 11:97

Klatt, S., Rohe, M., Alagesan, K., Kolarich, D. Konthur, Z. y Hartl, D. **Production of Glycosylated Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha (sAPPalpha) in Leishmania tarentolae** (2013) *J. Proteome Res.* 2013, 12, 396–403

Kumar, S., Tsai C.-J. y Nussinov, R. **Factors enhancing protein thermostability.** (2000) *Protein Engineering* vol.13 no.3 179–191

Lai L. B., Bernal-Bayard P., Mohannath G., Lai S. M., Gopalan V. y Vioque A. **A functional RNase P protein subunit of bacterial origin in some eukaryotes.** (2011) *Mol. Genet. Genomics*

Michaeli S., Doniger T., Gupta S. K., Wurtzel O., Romano M., Visnovetzky D., Sorek R., Unger R. & Ullu E. **RNA-seq analysis of small RNPs in Trypanosoma brucei reveals a rich repertoire of non-coding RNAs.** (2012) *Nucleic Acids Research*, 40, 3: 1282–1298

Ming-Juan Luo y Robin Reed. **Identification of RNA Binding Proteins by UV Cross-Linking** (2003) *Current Protocols in Molecular Biology* 27.2.1-27.2.10

Liudmila V. Pavlova, Markus Gcßringer, Christoph Weber, AurØlie Buzet, Walter Rossmann, y Roland K. Hartmann. **tRNA Processing by Protein-Only versus RNA-Based RNase P: Kinetic Analysis Reveals Mechanistic Differences** (2012) *ChemBioChem* 2012, 13, 2270 – 2276

Nakanishi, K. y Nureki, O. **Recent Progress of Structural Biology of tRNA Processing and Modification.** (2005) *Mol. Cells*, Vol. 19, No. 2, pp. 157-166

Niimi, T. **Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite Leishmania tarentolae : A Review** (2012) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*, Third Edition, *Methods in Molecular Biology* vol. 824 Chapter 15

O'Toole N., Hattori M., Andres C., Iida K., Lurin C., Schmitz-Linneweber C., Sugita M. y Small I. **On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants.** (2008) *Mol. Biol. Evol.* 25 (6): 1120–8.

Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P. y Salemme F. R. **High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery** (2001) *Journal of Biomolecular Screening* vol. 6, no. 6 429-440

Randau L., Schröder I. y Söll D. **Life without RNase P.** (2012) *Letters to Nature.* 453: 120-124

Reiter N. J., Osterman A., Torres-Larios A., Swinger K. K., Pan T. y Mondragón A. **Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA.** (2010) *Nature* 468

Rosalind Kim. **Native Agarose Gel Electrophoresis of Multiprotein Complexes** (2011) *Cold Spring Harb Protoc*; 2011; doi:10.1101/pdb.prot4558

Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M. y Ranjbar, B. **Effective factors in thermostability of thermophilic proteins.** (2006) *Biophysical Chemistry* vol. 119 256-270

Schneider, A. **Mitochondrial tRNA Import and Its Consequences for Mitochondrial Translation**

(2011) *Annu. Rev. Biochem.* 80:1033-1053

Simpson L., Frech G. C. y Maslov D. **RNA Editing in Trypanosomatid Mitochondria** (1996) *Methods in enzymology*, vol. 264, 99-121

Sola-Penna, M. y Meyer-Fernandes J. R. **Stabilization against Thermal Inactivation Promoted by Sugars on Enzyme Structure and Function: Why Is Trehalose More Effective Than Other Sugars?** (1998) *Archives Of Biochemistry And Biophysics* vol. 360, 10-14

Szilágyi, A. y Závodszyk, P. **Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey.** (2000) *Structure*, 8:493-504

Tan, T. H. P., Pach, R., Crausaz, A., Ivens, A. y Schneider, A. **tRNAs in Trypanosoma brucei: Genomic Organization, Expression, and Mitochondrial Import.** (2002) *Molecular and Cellular Biology*, June, p. 3707-3716

Taschner A., Weber C., Buzet A., Hartmann R. K., Hartig A. y Rossmann W. **Nuclear RNase P of Trypanosoma brucei: A Single Protein in Place of the Multicomponent RNA-Protein Complex** (2012) *Cell Reports* 2, 19-25

Torres-Larios A., Swinger K. K., Pan T. y Mondragón A. **Structure of ribonuclease P, a universal ribozyme.** (2006) *Current Opinion in Structural Biology* 16:327-335

Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S. y Arakawa, T. **Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification** (2004) *Biotechnol. Prog.* vol. 20, 1301-1308

Ugwu S. O. y Apte, S. P. **The Effect of Buffers on Protein Conformational Stability** (2004) *Pharmaceutical Technology*. March

Weissman, J. S., Kashi, Y., Fenton, W. A. y Horwich A. L. **GroEL-Mediated Protein Folding Proceeds by Multiple Rounds of Binding and Release of Nonnative Forms** (1994) *Cell*, Vol. 78, 893-702,

Anexos

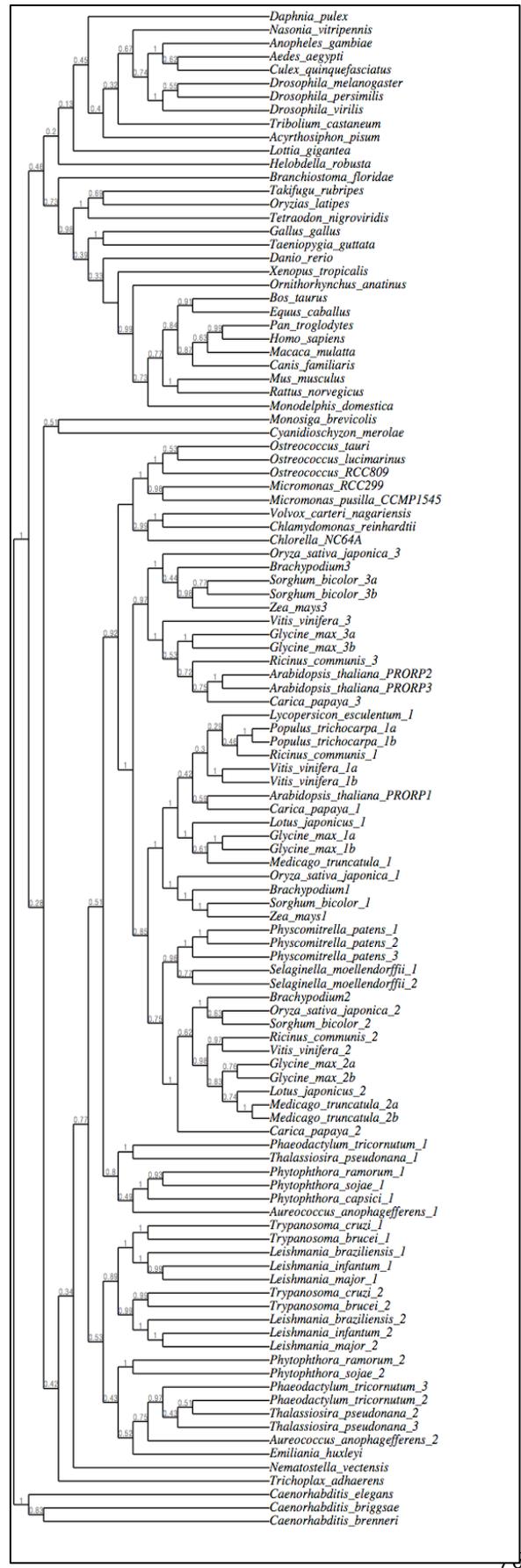


Figura S1. Los genes PRORP

Tabla S1.

Combinaciones de antibióticos utilizados con las distintas cepas de E. coli.

Cepa Antibiótico	BL21 DE3	BL21 DE3 pLys	BL21 DE3 Codon Plus	Rosetta-gami (DE3)pLacI	Origami (DE3)pLacI
Kanamicina 25µg/ml				✓	✓
Cloramfenicol 34µg/ml		✓	✓	✓	✓
Tetraciclina 12µg/ml				✓	✓
Ampicilina 50µg/ml	✓	✓	✓	✓	✓

Tabla S2.

Composición final del medio complejo auto inducible ZYM-5052.

Reactivo	Concentración Final
N-Z-amine AS	1%
Extracto de levadura	0,5%
Na ₂ HPO ₄	25 mM
KH ₂ PO ₄	25 mM
NH ₄ Cl	50 mM
Na ₂ SO ₄	5 mM
MgSO ₄	2 mM
Metales	0,2X
0.5% glicerol	54 mM
0.05% glucosa	2.8 mM
0.2% α-lactosa	5.6 mM

Tabla S3.

Composición final del medio mínimo auto inducible MDA-5052 (50 mM fosfatos) suplementado con aminoácidos.

Reactivo	Concentración Final
Na₂HPO₄	25 mM
KH₂PO₄	25 mM
NH₄Cl	50 mM
Na₂SO₄	5 mM
MgSO₄	2 mM
Metales 2X	10µM Fe + 9
0.5 % glicerol	54mM
0.05 % glucosa	2.8mM
0.2 % α-lactosa	5.6mM
0.1 % aspartato	18.8mM
18aa (no C,Y)	200 µg/ml de cada amino ácido

Tabla S4.

Composición de la mezcla de metales usados con el medio mínimo auto inducible MDA-5052

Metal	Concentración 1X
FeCl₃	50μMFe
CaCl₂	20μM
MnCl₂-4H₂O	10μM
ZnSO₄-7H₂O	10μM
CoCl₂-6H₂O	2μM
CuCl₂-2H₂O	2μM
NiCl₂-6H₂O	2μM
Na₂MoO₄-2H₂O	2μM
Na₂SeO₃-5H₂O	2μM
H₃BO₃	2μM

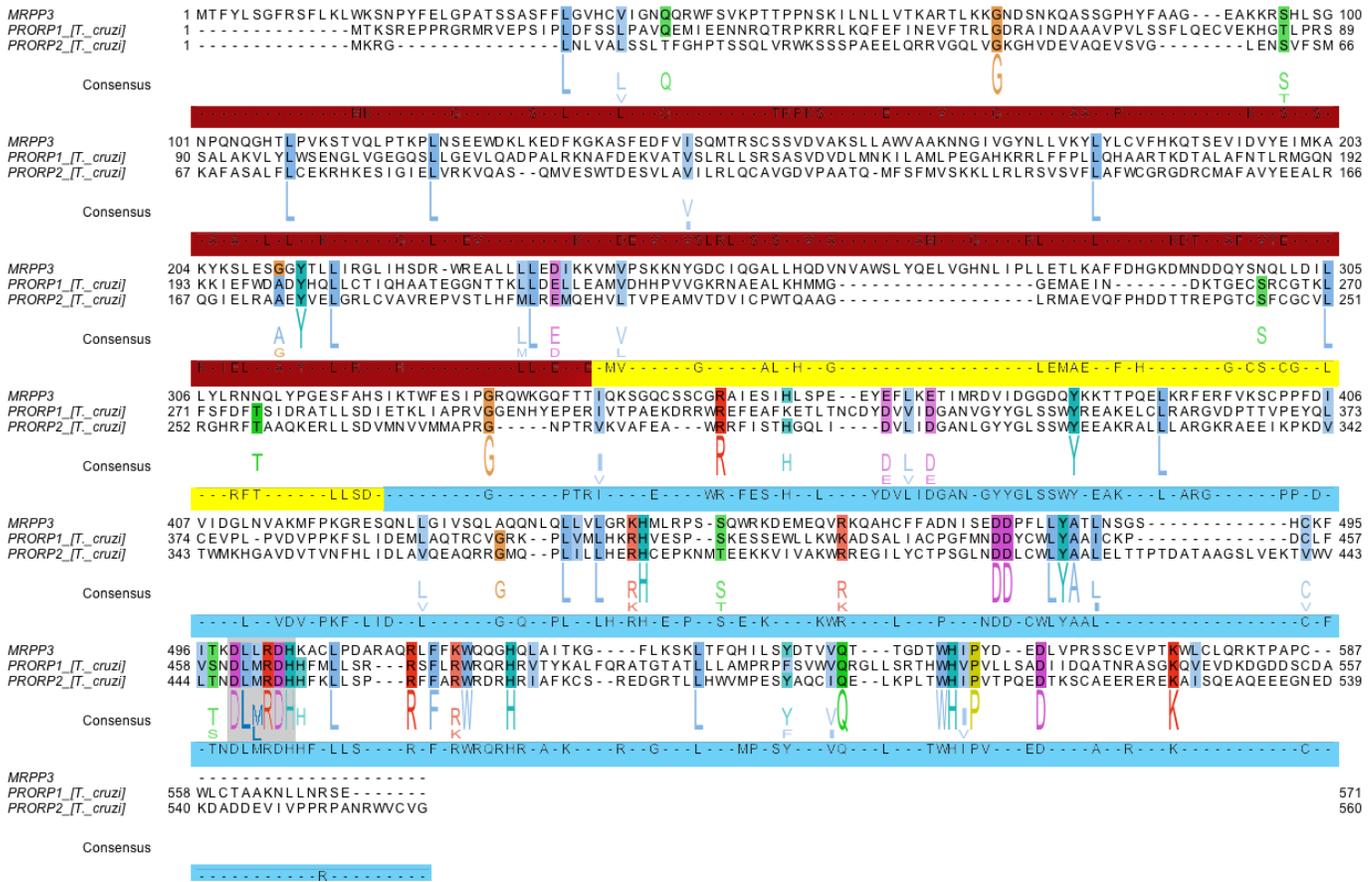


Figura S3. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos de la RNasa P Proteica Mitochondrial Humana 3 (MRPP3) y las proteínas PRORP de T. cruzi. Dos aspartatos seguidos rio abajo por una etiqueta DXMRDH (en gris) cerca del extremo C-terminal se pueden encontrar la mayoría de las secuencias homólogas de los genes PRORP. Las barras de colores muestran los dominios identificados en la estructura (Figura 4).