



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Expresión en *Escherichia coli* de un probable receptor
ionotrópico de *Crocospaera watsonii*

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

Néstor Nivardo Jiménez Vargas

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

INB-UNAM, Campus *Juriquilla*
Querétaro, Noviembre 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RESUMEN:

El estudio de los canales iónicos ha contribuido en gran medida con el entendimiento de muchas de las funciones cerebrales, sin embargo no se cuenta con imágenes de alta resolución que permitan conocer su estructura en eucariontes. Esto por la complejidad de purificar y cristalizar proteínas de membrana. La existencia de homólogos procariontes de los canales iónicos activados por ligando (LGICs) ha permitido la obtención estructuras a alta resolución por difracción de rayos X de receptores procarióticos, utilizando modelos heterólogos para su expresión y purificación, permitiendo un mayor entendimiento de la estructura, conformación y mecanismos de apertura durante el paso de iones a través del poro.

En este trabajo presentamos la expresión en *E. coli* de una proteína de de la cianobacteria *Crocospaera watsonii* (Cwii) probando tres sistemas de plásmidos: pET28b, el cual favorece la expresión nativa de proteínas, pCold-1 proporcionando un sistema de expresión a bajas temperaturas y pGEX-5X-1, basado en la fusión de la proteína GST. Se logró la expresión de Cwii utilizando este último plásmido, lo que presenta la posibilidad para obtener suficiente material para lograr su purificación y posterior reconstitución en bicapas lipídicas con el fin de realizar estudios estructurales y funcionales.

ABSTRACT:

The study of ion channels has contributed greatly to the understanding of several brain functions, however high resolution images of these channels, which allows to know their structure in eukaryotes, are not available; this is due to the complex process to purify and crystallize membrane protein. The existence of ligand-gated ion channels (LGICs) in prokaryotes has permitted obtaining high resolution structures by using heterologous models for expression and purification, leading to a further understanding of structure, conformation and gating mechanisms during the ion flux through the pore.

In this work we present the expression in *E. coli* a *Crocospaera watsonii* protein similar to a ionotropic receptor (Cwii) by testing three different plasmid: pET28b, which permits the native expression of proteins, pCold-1 whose expression is induced by low temperature, and pGEX-5X-1, based in the fusion with glutathione S-transferase (GST) to the amino terminal region. These results showed the expression of Cwii in the system, but not in the native form. This will make feasible the purification and reconstitution in lipidic bilayers for structural and functional assays.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II bajo la dirección del Dr. Ataúlfo Martínez Torres a quien agradezco sinceramente su dedicación, así como su tiempo y paciencia para enseñarme y asesorarme, al igual que las facilidades para la realización de este proyecto, de igual modo agradezco el apoyo y consejo técnico de Edith Espino, Efrén Ruiz y a cada uno de los compañeros del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II por su paciencia, consejos y enseñanzas durante mi formación.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, a la familia Cruz Figueroa por su motivación, al Dr. José Luis Quintanar Stephano por seguir impulsando mi deseo de superación y a todos mis amigos, que siempre han velado por mí, muchas gracias.

Mi agradecimiento al programa de Financiamiento Educativo de la Dirección de Becas y Financiamiento Educativo del Instituto de Educación de Aguascalientes, por el crédito-beca otorgado.

El presente estudio fue realizado con fondos para la investigación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 101851, Fondo Amine SHEDID y PAPIIT-UNAM IN202609. Así mismo agradezco el apoyo y colaboración del personal de:

Biblioteca

Bib. Pilar Galarza Barrios y Bib. Rafael Silva Cruz.

Biología Molecular

Dra. Anaid Antaramian Salas.

Enseñanza

M. en C. Leonor Casanova Rico.

Videoconferencia

Psic. Lourdes Lara Ayala

“Una nación que gasta más dinero en armamento militar que en programas sociales se acerca a la muerte espiritual...”

Martin Luther King (1929-1968)

DEDICATORIAS:

Dedico cada esfuerzo, a mi familia, a mis padres Francisco Jiménez Rodríguez y Bertha Vargas Sandoval a mis hermanos Mariela, Josué y Franbert que han confiado y me han apoyado siempre y que junto con migo han finalizado esta etapa, y a todos aquellos que verdaderamente me han ayudado.

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatorias	iv
Índice	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
A. Generalidades de los canales iónicos activados por ligando (LGICs)	2
B. Estudios estructurales en los canales iónicos activados por ligando	3
C. Canales iónicos activados por ligando en procariontes	5
III. Hipótesis	14
IV. Objetivos	14
V. Estrategia experimental	15
VI. Materiales y métodos	16
A. Reactivos	16
B. Soluciones	16
C. Transformación bacteriana con los plásmidos pET28b-Cwii, pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii	16
D. Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina	17
E. Caracterización del plásmido pET28b-Cwii	17
F. Caracterización de los plásmidos pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii	18
G. Secuenciación del DNA plasmídico	19

H. Expresión de la proteína Cwii en <i>E. coli</i> por inducción con IPTG	19
1. pET28b-Cwii	19
2. pCold-1-Cwii	19
3. pGEX-5X-1-Cwii	20
I. Lisis Celular	20
J. PAGE-SDS y Western Blot	20
1. Electroforésis	20
2. Tinción de geles	21
3. Inmunodetección	21
VII. Resultados	23
VIII. Discusión	28
IX. Conclusiones	30
X. Perspectivas	31
XI. Referencias	32
XII. Lista de tablas y figuras	36
XIII. Lista de abreviaturas	37

I. INTRODUCCIÓN:

El estudio de los receptores ionotrópicos ha permitido conocer y entender muchas de las funciones cerebrales; sin embargo hasta la fecha no se tiene una imagen de alta resolución completa de alguno de ellos que permita conocer con detalle su estructura en organismos eucariontes. Esto es debido a la dificultad para expresarlos en sistemas heterólogos y por la complejidad de cristalizar proteínas que están embebidas en las membranas lipídicas.

Se sabe de la existencia de genes bacterianos que codifican para homólogos de los receptores de vertebrados (Tasneem, Iyer, Jakobsson, y Aravind, 2005). El papel funcional de estos genes no es conocido, sin embargo la estructura de las proteínas para las que codifican es muy similar a los receptores para neurotransmisores de vertebrados. Por tanto, se podrían aprovechar las facilidades de manipulación genética que presentan los organismos procariotes, para expresar, purificar y obtener suficiente material para realizar ensayos de cristalización que permitan obtener imágenes de alta definición de la estructura de proteínas homólogas a neuroreceptores (Bocquet et al., 2009; Hilf y Dutzler, 2008; Hilf y Dutzler, 2009). En este trabajo planteamos la expresión en *Escherichia coli* de una proteína de la cianobacteria *Crocospaera watsonii*, esta proteína es similar en su estructura predicha a los neuroreceptores ionotrópicos. Con el fin de alcanzar este objetivo se utilizaron tres plásmidos: pET28b (Novagen), pCold-1 (Takara) y pGEX-5X-1 (Pharmacia).

pET28b permite la expresión de proteínas en condiciones nativas, agregando una etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal para su identificación y purificación por cromatografía de afinidad, dejando libre el péptido señal nativo de la proteína para lograr su inserción en la membrana. pCold-1 favorece la expresión de proteínas que son inestables a 37°C, permitiendo su expresión a bajas temperaturas al disminuir la actividad de proteasas, además se añade una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal para su identificación y purificación. pGEX-5X-1, favorece la expresión de aquellas proteínas que resultan inestables o tóxicas para *E. coli* al fusionarlas en el extremo amino terminal de la glutatión S transferasa (GST), además de permitir su reconocimiento por inmunoensayos dirigidos a GST.

II. ANTECEDENTES:

A. Generalidades de los canales iónicos activados por ligando (LGICs)

Las funciones cerebrales dependen de una red de células nerviosas, las cuales se comunican muy rápidamente unas con otras a través de millones de sinapsis. La transmisión sináptica está mediada en buena parte por la familia génica de canales iónicos activados por ligando (LGICs), también conocidos como receptores “Cys-Loop”. Éstos son activados por la unión de un neurotransmisor (glicina, acetilcolina, ácido gama aminobutírico) que produce un cambio conformacional en la estructura del receptor, que generalmente está formado por un arreglo de cinco subunidades homólogas que forman un canal iónico (Keramidas, Moorhouse, Schofield y Barry, 2004). La diversidad de las subunidades de LGIC resulta de en un amplio espectro de distintos receptores funcionales formados por múltiples combinaciones de subunidades y que generan diferentes especificidades farmacológicas y propiedades biofísicas del canal iónico (Keramidas, et al., 2004).

Los receptores ionotrópicos GABA_A, acetilcolina (nAChR), glicina, serotonina (5-HT₃), histamina y Zn²⁺ son receptores para neurotransmisores que pertenece a los LGICs (Olsen y Sieghart, 2009). La familia de LGICs, está formada por subunidades estructuralmente similares entre ellas, lo que sugiere que están relacionados evolutivamente. Todas las subunidades de esta familia tienen dominios estereotipados (Figura 1A): un dominio de unión a ligando amino terminal extracelular y un dominio carboxilo terminal también extracelular, tienen cuatro dominios α hélice que pasan por la membrana (M1-M4) (Le Novere y Changeux, 1999), modelo que es consistente con los estudios bioquímicos, electrofisiológicos y estructurales realizados en el receptor nAChR del órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (Méthot, Ritchie, Blanton y Baenziger, 2001; Miyazawa, Fujiyoshi y Unwin, 2003; Revah et al., 1991; Unwin, 1993).

B. Estudios estructurales en los canales iónicos activados por ligando

Se han obtenido imágenes generadas por microscopía electrónica de arreglos tubulares de las membranas del órgano eléctrico del *T. marmorata*, que revelaron a una resolución de 4 Å la estructura del receptor nicotínico (Figura 1C) (Unwin, 2005). Además por predicción de estructuras secundarias en combinación con ensayos electrofisiológicos se corroboró que la segunda hélice α transmembranal (M2) de cada subunidad contribuye a la formación de la pared del canal, permitiendo así el flujo de iones de un lado a otro de la membrana plasmática (Bertaccini y Trudell, 2002; Revah et al., 1991).

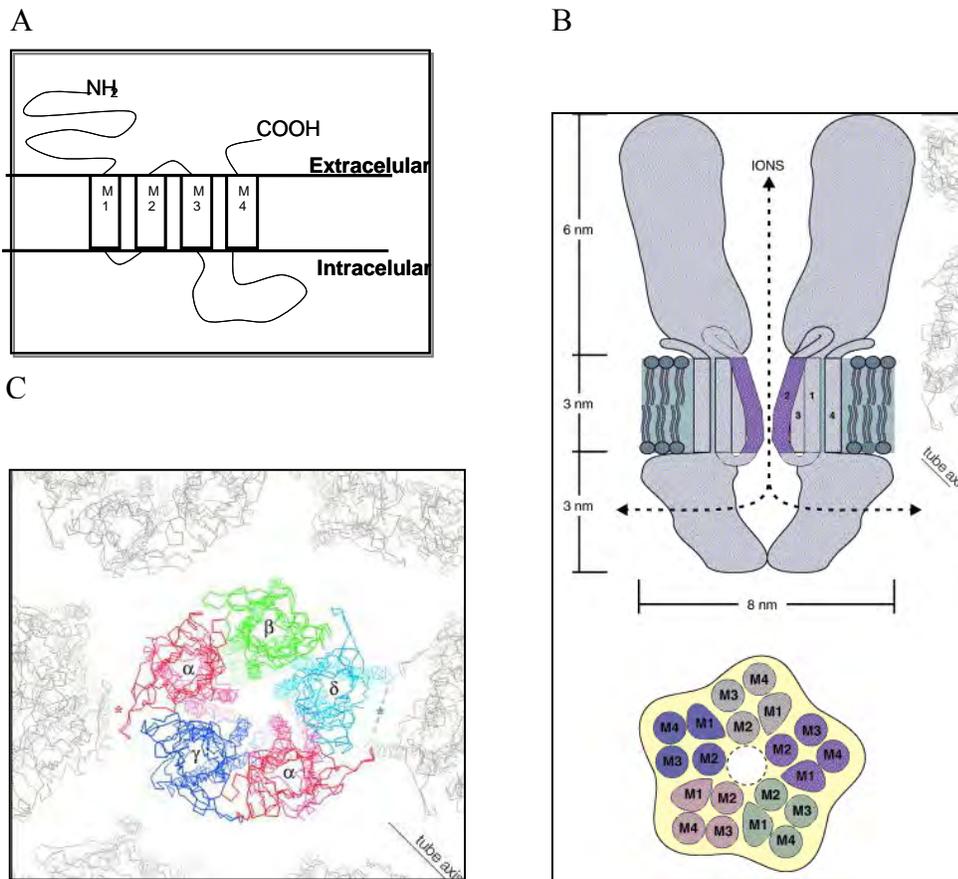


Figura 1. Modelo estructural de un LGIC. A, Modelo topológico de una subunidad característica de los receptores LGICs, M1-M4 refiere a los cuatro segmentos transmembranales; B, representación esquemática de la constitución pentamérica de un receptor LGI en corte longitudinal (arriba) y transversal (abajo) (Keramidas et al., 2004); C, imagen generada por reconstrucción de microscopía electrónica de un receptor nAChR a 4 Å de resolución, α , β , γ y δ se refiere a las subunidades que forman el receptor (Unwin, 2005).

La selectividad aniónica o catiónica del canal está dictada principalmente por la distribución de las cargas en el dominio M2. El análisis electrofisiológico de mutantes de los residuos que forman este dominio indica que éste forma parte de la estructura del poro y determinan la selectividad iónica de cada receptor. Estos estudios se han realizado en varios receptores incluyendo aquellos que responden a ACh, glicina y GABA, y se obtuvieron conclusiones similares por lo que se sugiere que los mecanismos moleculares para la selectividad de las cargas del poro se encuentran bien conservados en esta familia (Cascio, 2004; Gunthorpe y Lummis, 2001; Leonard, Labarca, Charnet, Davidson y Lester, 1988). Los canales aniónicos como GABA y glicina usualmente tienen un residuo de alanina y un residuo básico participando en la selección del anión; mientras que los canales catiónicos normalmente tienen un motivo de glutamato, arginina y lisina, donde el glutamato juega un papel importante en la selección del catión (Imoto et al., 1998; Keramidas, Moorhouse, French, Schofield y Barry, 2000; Gunthorpe y Lummis, 2001)..

Existen varios obstáculos para el estudio de la estructura de los LGIC y de las proteínas de membrana en general, entre ellos se encuentran que no son solubles en agua y la dificultad que presentan para producirlas a gran escala en sistemas celulares heterólogos. Ello a llevado a la realización de estudios estructurales con el uso de la bioinformática a partir de bases de datos (<http://www.pasteur.fr/recherche/banques/LGIC/LGIC.html>) las cuales proveen la posibilidad de realizar estudios filogenéticos que permitan la búsqueda de los antecesores evolutivos, así como la predicción de estructuras secundarias (Le Novère y Changeux, 2001; Bertaccini y Trudell, 2002). Sin embargo el estudio a partir de la cristalografía de rayos X permitiría determinar con mayor detalle los aspectos estructurales de estas proteínas, por ello la búsqueda de un modelo experimental adecuado el cual permita la sobreexpresión y posterior purificación de proteínas de membrana.

En varios casos las proteínas de membrana de origen procariótico han logrado ser expresadas en huéspedes como *E.coli*. Por ejemplo, el transportador de magnesio MgtE de *Thermus thermophilus* fue expresado en *E.coli*, y después de ser aislado de ésta fue exitosamente cristalizado y su estructura se obtuvo a una resolución de 3.5 Å (Hattori, Tanaka, Fukai, Ishitani y Nureki, 2007). También se determinó la estructura de los canales de cloro CIC de *Salmonella*

typhimurium y de *E. coli*, los cuales fueron expresados, cristalizadas y su estructura resuelta a 3.0 y 3.5 Å respectivamente (Dutzler, Campbell, Cadene, Chait y MacKinnon, 2002). Sin embargo la complejidad de los lípidos que conforman la propia membrana plasmática además de otros constituyentes de la misma dificultan el estudio de muchas de estas proteínas.

La incorporación de proteínas de membrana purificadas en vesículas fosfolipídicas es también una poderosa herramienta para elucidar los aspectos funcionales y estructurales de las proteínas asociadas a membranas (Rigaud, Pitard y Levy, 1995). Estudios electrofisiológicos en ovocitos *Xenopus laevis* han mostrado la viabilidad de estudiar funcionalmente canales de la membrana de bacterias. Estos trabajos lograron determinar la conductancia del canal *OmpA* de *E. coli*, el cual fue aislado embebido en vesículas de la misma bacteria y “transplantado” a la del ovocito (Lin et al; 2006).

C. Canales iónicos activados por ligando en procariontes

De forma interesante la búsqueda de perfiles de secuencias en genomas bacterianos identificó quince homólogos putativos de LGICs. Algunos de los marcos de lectura abierto (*orf's*) predichos muestran gran diversidad en su estructura predicha pero básicamente conservan las características estereotipadas de los receptores de eucariotes. Estas observaciones sugieren que la diversificación de las formas procariontes preceden al surgimiento de las formas eucarióticas. Los *orf's* de *Crocospaera watsonii*, *Gloeobacter violaceus*, *Erwinia chrysanthemi* y *Rhodopseudomonas palustris* son las versiones bacterianas mas similares en secuencia a las formas eucarióticas (Tasneem et al., 2005).

Tomando como base estas homologías de secuencia aminoacídica se han realizado estudios en la proteína GLIC de *Gloeobacter violaceus*, de la cual se demostró que es activada por protones y forma canales con selectividad a cationes monovalentes (Bocquet et al., 2007). Además, estudios electrofisiológicos mostraron que después de su activación GLIC prácticamente no desensibiliza. Estos estudios también apoyan la organización pentamérica de esta familia de proteínas, ya que al separarse la proteína por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, el complejo sedimenta alrededor del peso molecular predicho para un ensamble

compuesto de cinco subunidades. Estos complejos, al ser observados por microscopía electrónica forma un complejo en forma de rosetas pentaméricas parecidas a las presentadas por el receptor nAChRs del órgano eléctrico de *T. marmorata* (Bocquet et al., 2007).

Debido a su estructura compacta y origen procariótico, estos nuevos pLGICs podrían ser buenos modelos experimentales para realizar investigaciones estructurales. Hace unos años en nuestro laboratorio se inició el esfuerzo de obtener los orf's predichos para LGIC de las bacterias *R. palustris*, *C. watsonii* y *E. chrysanthemi*. De todas estas *E. chrysanthemi* y *C. watsonii* generaron el orf predicho en las bases de datos genómicas. Por tanto, este trabajo se centrará en la caracterización del orf de *C. watsonii*. Esta bacteria pertenece a un género de cianobacterias diazotróficas cuyo hábitat son las aguas oceánicas cálidas mayores a 24°C, han sido aisladas de aguas tropicales del océano Atlántico occidental y del océano Pacífico donde puede alcanzar densidades superiores a las 1000 células por mililitro de agua en la zona eufótica, contribuyendo significativamente con el ciclo del carbono y nitrógeno en los océanos (Zher et al., 2001).

El análisis de la secuencia aminoacídica de *C. watsonii* (Cwii) sugiere que esta tiene un péptido líder en el amino extremo terminal y cuatro segmentos hidrofóbicos que pueden formar parte de pases transmembranales, similares a los formados por los receptores de la familia “Cys-Loop” (Figura 2 y 3).

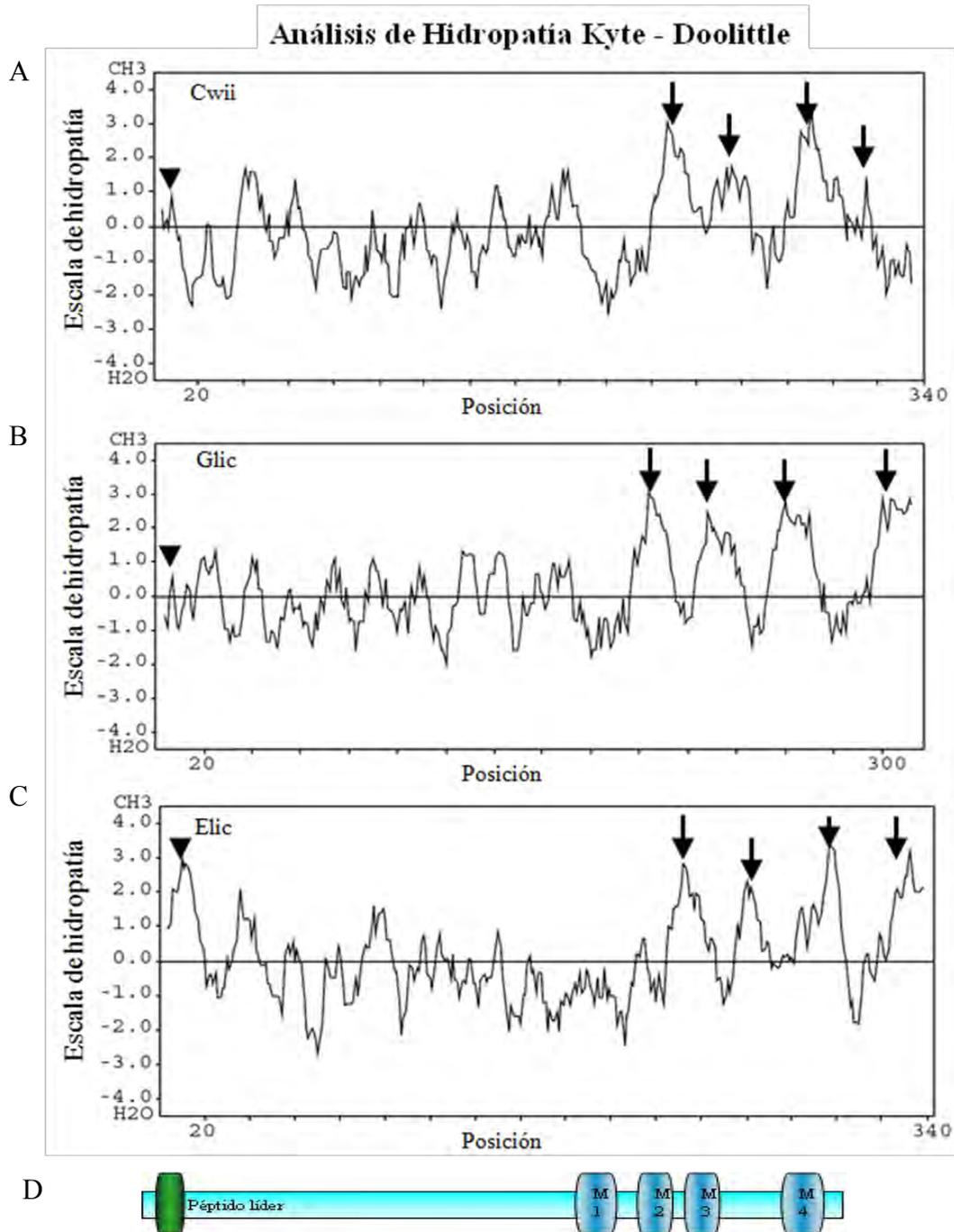


Figura 2. Análisis de hidropatía Kyte Doolittle de los orf's de *C. watsonii* (A), *G. violaceus* (B) y *E. chrysantemi* (C) homólogos a los de proteínas de la familia "Cys-Loop". (D) Esquema que representa las posiciones del péptido líder y de M1-M4, señaladas en A, B y C con cabezas de flecha y flechas respectivamente.

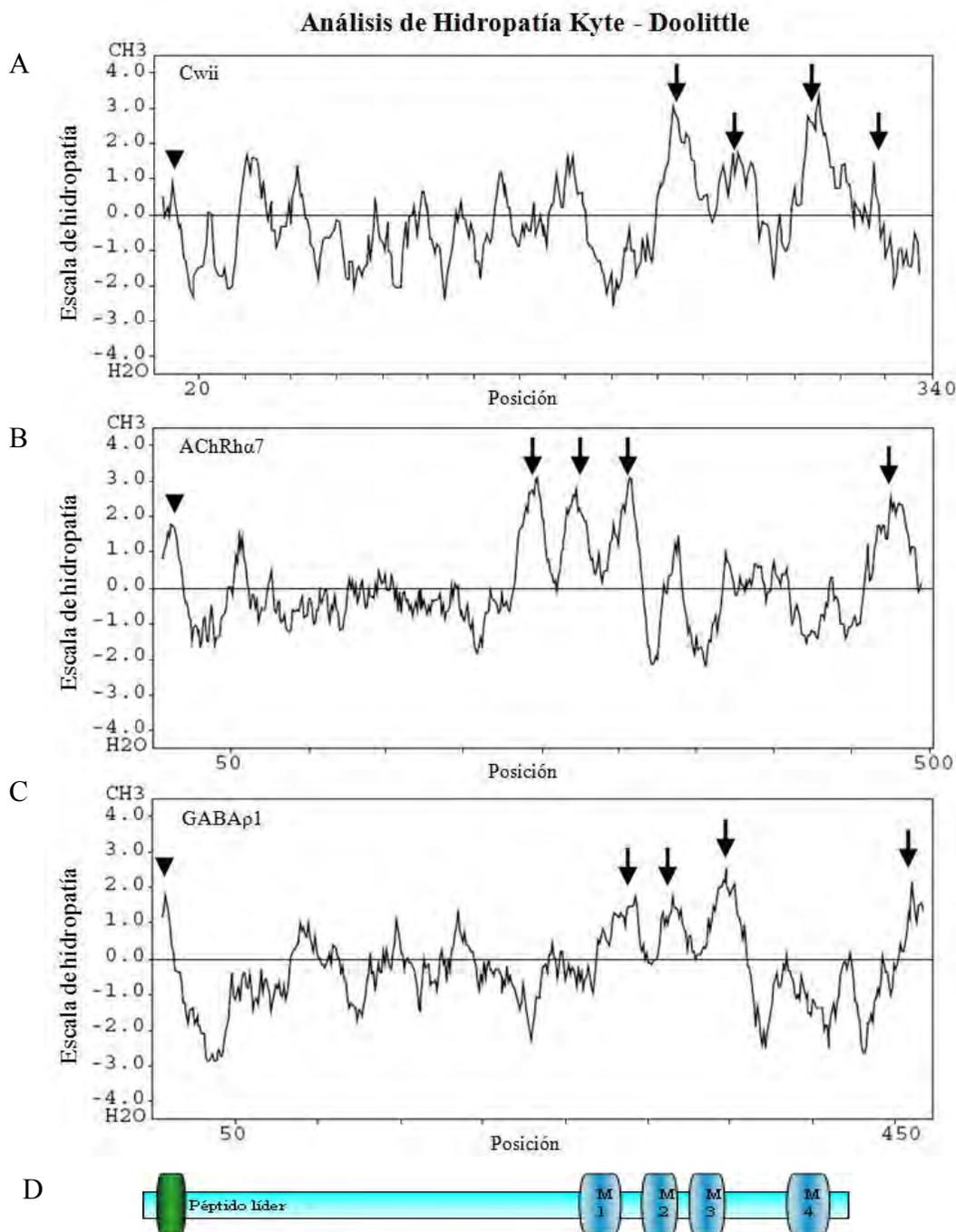


Figura 3. Análisis de hidropatía Kyte Doolittle de los orf's de *C. watsonii* (A), nAChRa7 (B) y GABA ρ 1 (C). (D) Esquema que representa las posiciones del péptido líder y de M1-M4, señaladas en A, B y C con cabezas de flecha y flechas respectivamente.

Al hacer un alineamiento de los residuos que forman el segundo segmento transmembranar, es decir aquel que forma el canal iónico, se puede observar que la leucina (L9') está bien conservada en todos estos receptores. Este residuo forma la compuerta del canal del

receptor, por lo que su papel es determinante para la función del mismo (Miyazawa et al., 2003; Revah et al., 1991; Unwin, 1993). Sin embargo, la presencia de otros residuos clave como el ácido aspártico y ácido glutámico sugieren que esta proteína es selectiva a cationes (Figura 4).

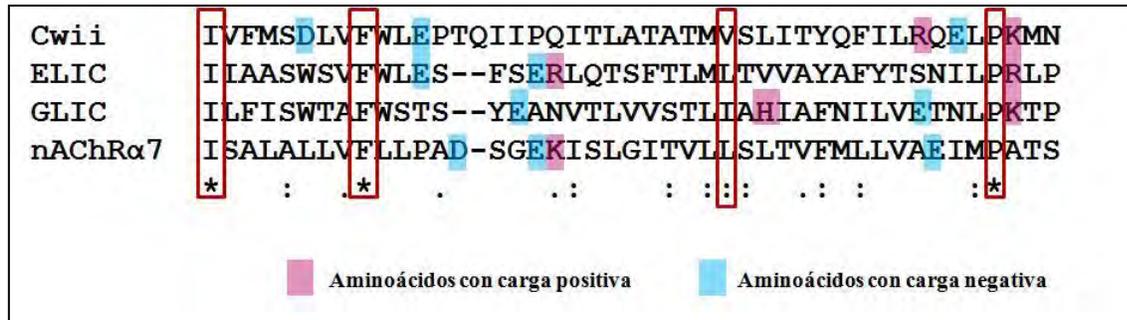


Figura 4. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del dominio (M2) y comparación de los residuos que dictan la selectividad iónica de *C. watsonii* (Cwii), *E. chrysanthemii* (ELIC) y *G. violaceus* (GLIC). nAChRα7 es permeable a cationes.

Estas semejanzas plantean la posibilidad de estudiar al receptor de *C. watsonii* y comprobar si pertenece a un canal ionotrópico en un modelo que facilite la expresión y purificación de la proteína. Además se podría determinar con métodos bioquímicos su estado oligomérico pudiendo corroborarse con estudios de microscopía electrónica, así como determinar la ubicación del receptor en los compartimentos de la bacteria.

En nuestro laboratorio se ha explorado el diseño y modelado de la estructura de Cwii, de la cual se ha generado el siguiente modelo estructural (Estrada Mondragón, tesis en proceso) (Figura 5). El modelo fue construido usando el software de ESyPred3D basado en los algoritmos de MODELLER © (University of Namur, Belgium), y usando como molde la estructura cristalográfica generada del canal iónico de *G. violaceus* obtenido a una resolución de 2.90 Å, PDB ID: 3EAM. El pentámero fue reconstruido usando el software: ICM v3.5 ©, MolSoft L.L.C y se realizó una minimización de energía usando GROMOS96 como parte del software DeepView/Swiss-Pdb Viewer v4.0.1. Los dominios conservados fueron confirmados a partir de la estructura secundaria usando el software: Jpred3 (The Barton Group, University of Dundee). La imagen fue rasterizada usando el software: PyMOL v0.99 DeLano Scientific LLC.

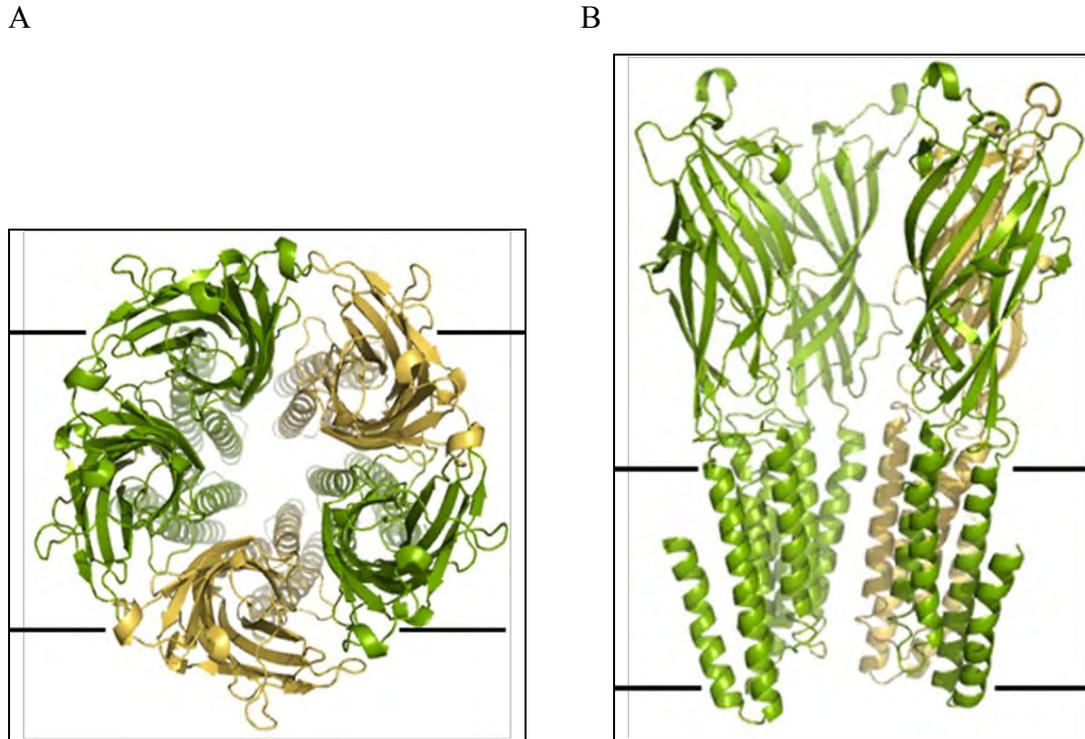


Figura 5. Representación en listones del modelo pentamérico de la proteína homóloga a la familia de neuroreceptores “cys-loop” tipo Acetilcolina nicotínico, perteneciente a la cianobacteria: *Crocospaera watsonii*. A, Vistas transversal y B, longitudinal respecto al plano de la membrana (Estrada 2009, tesis en proceso).

Estudios recientes mostraron la factibilidad de la aproximación experimental descrita anteriormente. Por ejemplo se obtuvo la estructura por difracción de rayos X de la proteína ERW 15453 (llamada ELIC) con una resolución de 3.3 Å (Figura 6) (Hilf y Dutzler, 2008), ELIC fue expresada en *E. coli* BL21(DE3) fusionada en el carboxilo terminal de la proteína de unión a maltosa (MBP). ELIC fue separada por proteólisis selectiva con el factor Xa y aislada por cromatografía de afinidad para entonces ser embebida en lípidos sintéticos y cristalizada por medio de la técnica de vapor-fusión. La estructura fue determinada por el método de SIRAS (Dispersión anómala por reemplazo de isoformas sencillas).

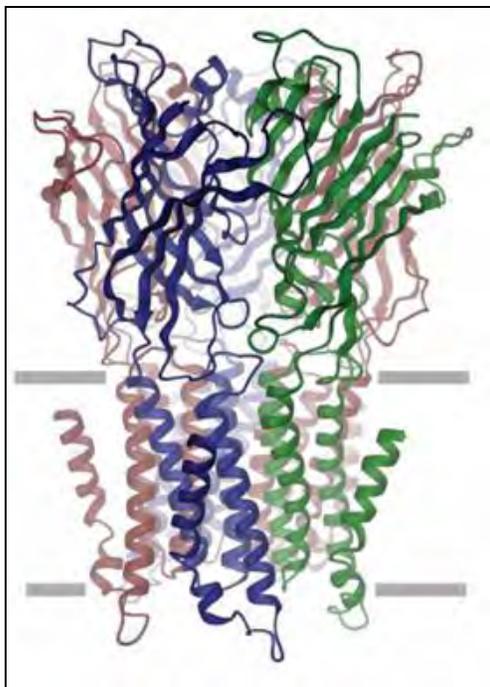


Figura 6. Representación en listones de la estructura de ELIC a una resolución de 3.3 Å, en un corte longitudinal indicando su posición respecto a la membrana (Hilf y Dutzler, 2008).

Por otro lado estudios funcionales en bicapas lipídicas mostraron que el canal es permeable a cationes monovalentes (Na^+ , K^+ y Cs^+); sin embargo estos estudios no revelan el agonista del receptor (Hilf y Dutzler, 2008). El ligando de ELIC podría ser tan pequeño como un protón, como se ha sugerido para la proteína homóloga GLIC (Bocquet et al., 2007). Además se observó que en ELIC los residuos en M2 forman una doble compuerta para el paso de iones por el poro (Hilf y Dutzler, 2008).

Como se mencionó la estructura obtenida por cristalografía de rayos X de la proteína GLIC se obtuvo a una resolución de 2.9 Å (Figura 7A) (Bocquet et al., 2009), la cual fue expresada en *E. coli* (C43) por medio de una fusión a la MBP y una etiqueta de seis histidinas (His6X) en el carboxilo terminal, para separar la MBP se utilizó una proteasa que reconoce el sitio de unión entre MBP y GLIC, fue purificada por cromatografía de afinidad en columnas de agarosa-amilosa y los cristales se formaron y crecieron en un sistema de gotas suspendidas, la estructura fue determinada por sustitución molecular basados en la estructura de ELIC y refinada utilizando el software Coot y Refmac.

Por otro lado (Hilf y Dutzler, 2009) mostraron el mismo cristal de GLIC a una resolución de 3.1 Å (Figura 7B), expresado y purificado bajo las mismas condiciones que ELIC, fusionando en el carboxilo terminal de MBP, una secuencia señal o péptido líder precedido por una etiqueta de 10 histidinas (His 10X) seguido por un sitio de reconocimiento de proteasas para separar a GLIC de MBP. Se generó el cristal y la estructura fue determinada por sustitución molecular usando como modelo la estructura de ELIC y refinada por estereoquímica y análisis de Ramachandra.

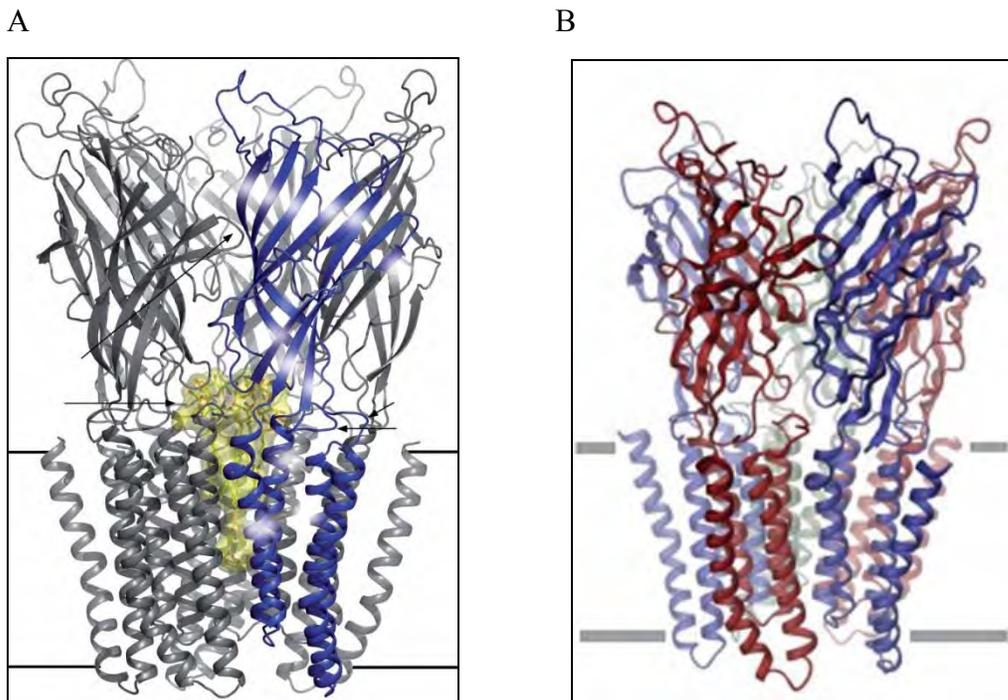


Figura 7. Representación en listones de la estructura de GLIC, probablemente en una conformación con el canal abierto: A. Representación a una resolución de 2.9 Å, en un corte longitudinal indicando su posición respecto a la membrana, además muestra partículas dodecil β-D- maltosido (DDM) en el interior de (Bocquet et al., 2009); B. Representación a una resolución de 3.1 Å, en un corte longitudinal indicando su posición respecto a la membrana (Hilf y Dutzler, 2009).

Los resultados de estos trabajos apoyan la idea de que el canal responda a protones, y plantearon mecanismos alternos de la apertura y cierre del mismo. Una propuesta (Bocquet et al, 2009) indica un giro en sentido contrario de las manecillas del reloj de cada una de las subunidades del receptor, el cual expone los residuos de ácido glutámico, además de serinas, treoninas y leucinas en M2. La segunda propuesta (Hilf y Dutzler, 2009) sugiere un

desplazamiento rígido de cada una de las subunidades el cual expone los residuos de glutámico en M2 que participan en la selectividad del poro. Ambas plantean un mecanismo de cierre y apertura basados en la conformación cerrada de ELIC y la aparente conformación abierta de GLIC los cuales presentan estructuras similares.

Por otro lado se observó que al empapar los cristales de GLIC en soluciones con cationes permeables (Cs^+ , Rb^+ y Zn^{2+}) se localiza una densidad electrónica perteneciente a los enlaces iónicos en la región intra y extra celular a la constricción del poro, lo que enfatiza el papel de este dominio en la conductancia y selectividad iónica; sin embargo la estrecha interacción de las cinco cadenas laterales que definen la constricción del poro pueden impedir el paso libre de iones. Debido a que en un contexto celular, la parte intracelular del canal se expone al pH fisiológico del citoplasma, es posible que en el estado de protonación de estos residuos pasen a un pH bajo y que las interacciones observadas en la densidad electrónica son consecuencia de las condiciones de cristalización (Hilf y Dutzler, 2009). Este hecho, plantea un posible problema en las condiciones de cristalización; sin embargo al compararse éstas se podría también sugerir un problema con el plegamiento de la proteína durante su procesamiento *in vitro*.

También se ha visto que la expresión de estas proteínas de manera individual inhibe el crecimiento de *E. coli* (Bocquet et al., 2007), por lo que se requiere fusionar a proteínas que generen mayor estabilidad al receptor, tales como MBP la cual se utilizó para la expresión y purificación en la cristalización tanto de ELIC como de los cristales de GLIC (Bocquet et al., 2007; Bocquet et al., 2009; Hilf y Dutzler, 2008; Hilf y Dutzler, 2009).

En resumen se han revelado con una alta resolución los aspectos estructurales de las proteínas ELIC y GLIC (Bocquet et al., 2009, Hilf y Dutzler, 2008; Hilf y Dutzler, 2009), aunque el método de expresión ha sido en ambos casos en fusión con MBP, por lo que no alcanza su conformación nativa y se recurrió a varias estrategias experimentales para embeberlas en membranas lipídicas para lograr su cristalización. Por lo que este trabajo plantea probar tres sistemas de expresión plasmídicos derivados de *E. coli* para producir la proteína de *C. watsonii* (Cwii) y tratar de determinar: a) si es posible su ubicación en la membrana plasmática o b) si se requiere de sistemas de expresión con proteínas fusión para lograr su expresión.

I. HIPÓTESIS:

La proteína Cwii de *C. watsonii* se expresará de manera heteróloga en *E. coli* localizándose en la membrana de este microorganismo formando complejos pentaméricos.

II. OBJETIVOS:

A. General:

Expresar la proteína Cwii de *C. watsonii* de forma recombinante en *E. coli*.

B. Específicos:

1. Analizar la expresión heteróloga de la proteína Cwii de *C. watsonii* en *E. coli* utilizando diversos vectores a) Expresar Cwii en condiciones nativas en *E. coli* con el uso de pET28b. b) Expresar Cwii en condiciones nativas en *E. coli* con el uso de pCold-1. c) Expresar Cwii fusionada a GST en *E. coli* con el uso de pGEX-5X-1.
2. Determinar la ubicación celular de la proteína Cwii en la membrana de *E. coli*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

- Transformación de la cepa de *E. coli* ER 2566 con los plásmidos de expresión (pET28b, pCold-1 y pGEX-5X-1) con el orf Cwii bajo la regulación transcripcional del promotor T7, cspA y Ptac respectivamente.

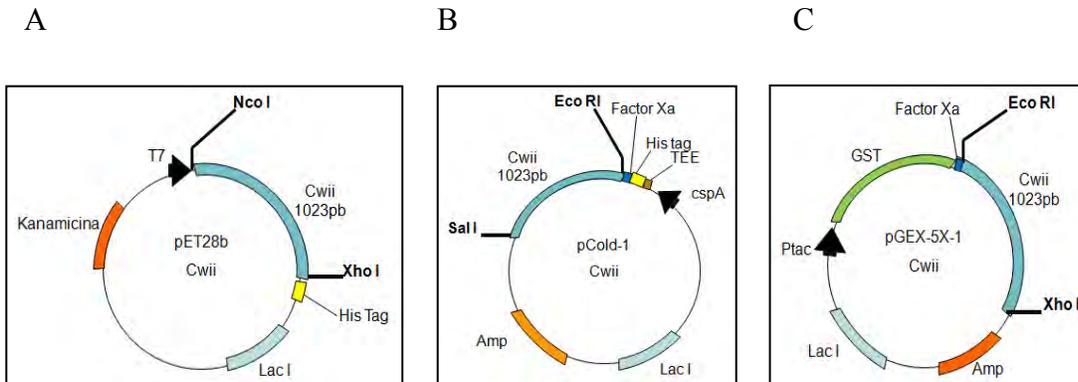


Figura 8. Mapas de los plásmidos a utilizar en la expresión de Cwii. A, plásmido pET28b-Cwii, la expresión es dirigida por el promotor T7. B, plásmido pCold-1-Cwii, la expresión es dirigida por el promotor cspA a bajas temperaturas y C, plásmido pGEX-5X-1-Cwii, su expresión es dirigida por el promotor Ptac, además de fusionar GST a la región amino terminal de Cwii.

- Identificación de la sobreexpresión en geles de poliacrilamida.
- Corroborar la identidad de la proteína por Western blot.
- Aislar membranas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa e identificar la ubicación de Cwii en las mismas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS:

A. Reactivos.

En la detección de proteínas con la etiqueta de histidinas provenientes de los plásmidos pET28b y pCold-1 se empleó un anticuerpo monoclonal específico que reconoce el epítipo 6XHis acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), y para la detección de la proteína GST acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) así como los reactivos DAB (3,3'- Diaminobencidina) y urea, fueron adquiridos de Milipore. Los estándares de peso molecular y las enzimas Eco RI, NcoI, y XhoI, se adquirieron de Invitrogen. La acrilamida y la leche descremada grado Western blotting, se adquirieron de Bio-Rad. El medio de cultivo para bacterias Luria Bertani (LB) se adquirieron de Sigma. El plásmido pET28b se adquirió de Novagen, pCold-1 de Takara y pGEX-5X-1 de Pharmacia. Los demás reactivos se adquirieron de JT Baker.

B. Soluciones.

Durante la extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina, se utilizaron las siguientes soluciones: Solución **I.** (Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM). Solución **II.** (NaOH 0.2 N, SDS 1%). Solución **III.** (Acetato de potasio 5M al 60%, ácido acético glacial 11.5%). La incubación con anticuerpos (Ab) se llevó a cabo en TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%). Las muestras de DNA para su separación se prepararon en la solución (azul de bromofenol 0.25% w/v, xileno cianol 0.25% w/v y glicerol en H₂O 30% v/v). Las muestras de proteína para su separación, se prepararon en condiciones desnaturalizantes en la solución (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.2% w/v, SDS -grado electroforesis- 2%, glicerol 10% v/v y β -mercaptoetanol 10%).

C. Transformación bacteriana con los plásmidos pET28b-Cwii, pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii.

Se transformaron 50 μ L de bacterias *E. coli* (cepas ER 2566 y XL1-blue) en estado competente con 100ng del plásmido correspondiente, generado cada uno previamente en nuestro laboratorio (pET28b-Cwii=1 clona, pCold-1-Cwii=4 clonas y pGEX-5X-1-Cwii=5 clonas). Se colocaron las bacterias en hielo durante 30 minutos y se dió un choque térmico a 42°C durante 90

seg. Posteriormente se pusieron en hielo durante 2 min y después, se colocaron en 250 μ L de medio LB incubándolas durante 2 h a 37°C. Se distribuyeron 200 μ L de la solución en una placa de agar LB con kanamicina [50 μ g/mL] para el plásmido pET28b-Cwii y ampicilina [100 μ g/mL] para los plásmidos pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii. Las placas se incubaron durante 15 y 12 horas respectivamente a 37°C.

D. Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina.

Se seleccionaron de las placas de cultivo de XL1-blue aquellas colonias de bacterias que crecieron después de ser transformadas. Se propagaron en 4mL de medio LB con kanamicina [50 μ g/mL], incubándolas durante 17 h a 37°C a 280 rpm. Concluido el tiempo de incubación, se recolectaron las bacterias por centrifugación a 9,299 g durante 3 min a 4°C. Posteriormente, se suspendieron en 200 μ L de la solución I (Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM), se adicionaron 200 μ L de la solución II de lisis alcalina (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se dejó por 10 min a 4°C. La mezcla se neutralizó adicionando 200 μ L de la solución III (acetato de potasio 5M al 60%, ácido acético glacial 11.5%). Los restos celulares de la reacción de lisis se precipitaron a 9,299 g durante 5 min a 4°C, y el sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf nuevo al que se le agregó un volumen de 600 μ L de fenol saturado. Se homogenizó la mezcla y se centrifugó a 9,299 g durante 6 min a 4°C; la fase acuosa se separó en un tubo nuevo y se añadieron 600 μ L de isopropanol frío al 100%, se incubó en hielo para favorecer la precipitación del DNA plasmídico y después se centrifugó a 9,299 g durante 8 min a 4 °C. El DNA se lavó con 200 μ L de etanol al 70% centrifugando a 9,299 g durante 4 min a 4°C. Se desechó el etanol y se dejó secar, después se resuspendió en 30 μ L de H₂O MQ esterilizada con RNAsa (20 μ g/mL). Posteriormente el DNA plasmídico obtenido se preparo un gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml), y el resto se almaceno a -30°C.

E. Caracterización del plásmido pET28b-Cwii.

Se obtuvo DNA plasmídico por lisis alcalina a partir de la transformación de *E. coli* con el plásmido pET28b-Cwii. La caracterización del plásmido se realizó primeramente mediante una digestión enzimática con las enzimas Nco I y Xho I, después se caracterizó por secuenciación. La reacción de digestión enzimática se llevó a cabo durante 1 h a 37°C y se prepararon 4 μ L del

DNA digerido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se analizó el tamaño de cada fragmento.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la reacción de doble digestión con las enzimas Nco I y Xho I, en la caracterización de Cwii en el plásmido pET28b-Cwii.

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen μl</u>
DNA plasmídico 0.5 μ g/ μ l	4
Amortiguador invitrogen 2 10X	1
Nco I 10 U/ μ l	0.5
Xho I 10 U/ μ l	0.5
H ₂ O MQ estéril	4
	<u>Vf=10</u>

F. Caracterización de los plásmidos pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii.

Se obtuvo DNA plasmídico por lisis alcalina a partir de la transformación de *E. coli* con el plásmido pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii respectivamente. La caracterización de los plásmidos se realizó primeramente mediante una digestión enzimática con las enzimas Eco RI y Xho I, después se caracterizó por secuenciación. La reacción de digestión enzimática se llevó a cabo durante 1 h a 37°C y se prepararon 4 μ L del DNA digerido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se analizó el tamaño de cada fragmento.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la reacción de doble digestión con las enzimas Eco RI y Xho I, para la caracterización de los plásmidos pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii.

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen μl</u>
DNA plasmídico 0.5 μ g/ μ l	4
Amortiguador invitrogen 2 10X	1
Eco RI 10 U/ μ l	0.5
Xho I 10 U/ μ l	0.5
H ₂ O MQ estéril	4
	<u>Vf=10</u>

G. Secuenciación del DNA plasmídico.

Con el DNA plasmídico obtenido se determinó la secuencia del orf en la unidad de Proteogenómica para su secuenciación la cual se llevó a cabo por el método de terminación con el Big Dye de **Applied Biosystems**, en un secuenciador **ABI PRISM 310** Genetic Analyzer.

H. Expresión de la proteína Cwii en *E. coli* por inducción con IPTG.

1. pET28b Cwii ER2566

Se seleccionaron de las placas de cultivo de ER2566 aquellas colonias de bacterias que crecieron después de ser transformadas. Se propagaron en 4mL de medio LB con kanamicina [50µg/mL], incubándolas durante 17 h a 37°C a 280 rpm. Después se realizó una dilución 1:10 ajustando a un volumen de 20 ml de medio LB y 2YT (0.5g/100ml LB) con kanamicina [50µg/mL] respectivamente, incubándolas a temperaturas de 37°C a 280 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) (Absorbancia) de 0.5 a una longitud de onda (λ) de 600nm, una vez alcanzado este punto se agregó IPTG (Isopropil- β -D-Tio-Galactósido) a una concentración final de 0.3, 0.6 y 1 mM, incubándolas durante 3, 6, 12, 18 y 24 h a 20 , 25, 30 y 37°C a 280 rpm, para cada medio en las combinaciones siguientes.

Tabla 3. Relación tiempo temperatura para la expresión de la proteína Cwii en el plásmido pET28b.

Temp °C \ Tiempo h	3	6	12	18	24
20				X	X
25			X	X	X
30		X	X	X	
37	X	X	X		

2. pCold-1 Cwii ER2566

Se seleccionaron de las placas de cultivo de ER2566 aquellas colonias de bacterias que crecieron después de ser transformadas. Se propagaron en 20 ml de medio LB y 2YT

(0.5g/100ml LB) con ampicilina [20µg/mL] para cada medio, incubándolas a 37°C a 280 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) (Absorbancia) de 0.5 a una longitud de onda (λ) de 600nm, una vez alcanzado este punto se llevaron a 15°C durante una hora a 280 rpm, concluido el tiempo se agregó IPTG (Isopropil- β -D-Tio-Galactósido) a una concentración final de 1 mM, incubándolas durante 24, 36, 48 y 60 h a 15°C a 280 rpm.

3. pGEX-5X-1 Cwii ER2566

Se seleccionaron de las placas de cultivo de ER2566 aquellas colonias de bacterias que crecieron después de ser transformadas. Se propagaron en 20mL de medio LB2YT (0.5g/100ml LB) con Ampicilina [20µg/mL], incubándolas a 37°C a 280 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) (Absorbancia) de 0.5 a una longitud de onda (λ) de 600nm, una vez alcanzado este punto se agregó IPTG (Isopropil- β -D-Tio-Galactósido) a una concentración final de 1 mM, incubándolas durante 3 h a 37°C a 280 rpm.

I. Lisis Celular.

Concluido el tiempo de inducción se recolectaron las bacterias por centrifugación a 9,299 g durante 5 min a 4°C, se decantó y se agregó al paquete bacteriano 10 ml de Tris (0.5M pH 8.0), lisozima (10mg/mL) y Triton X-100, DNAsa y RNAsa a una concentración final de 1%, 5µg/mL y 5µg/mL respectivamente; y se incubo por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se paso la muestra por una prensa francesa a 10,342.11 kPa. Se centrifugó a 7000 g durante 5 min, se separó una alícuota de trabajo y se congelo lo demás a -80°C.

J. PAGE-SDS y Western Blot

1. Electroforesis.

Se colocaron 30µL de la solución con las membranas purificadas en un gel de poli(acrilamida)-SDS al 15.0% para separar las proteínas según el método de Laemmli (1970). Las muestras se diluyeron 1:1 con buffer de carga (Tri-Cl 50 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.2% w/v, SDS -grado electroforesis- 2%, glicerol 10% v/v y β -mercaptoetanol 10%) y se incubaron durante 5 min a 96 °C. Los minigeles se prepararon al 15.0% y 12% en placas de vidrio de 10 cm x 12 cm separadas 1.0 mm en un equipo vertical Hoeffer, como se muestra a continuación:

Tabla 4. Soluciones para la preparación de geles de poliacrilamida-SDS al 15 y 12%.

<u>Gel separador (1.0mm)</u>	<u>15% (mL)</u>	<u>12% (mL)</u>	<u>Gel concentrador (1.0 mm)</u>	<u>5% (mL)</u>
Acrilamida 29%- bisacrilamida 1%	5.0	4.0	Acrilamida 29 %- bisacrilamida 1%	0.33
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5	2.5	Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.25
Agua desionizada	2.3	3.0	Agua desionizada	1.40
SDS 10%	0.10	0.10	SDS 10%	0.02
Persulfato de amonio 10%	0.10	0.10	Persulfato de amonio 10%	0.02
TEMED	0.004	0.004	TEMED	0.002

Una vez polimerizado y montado el gel en la cámara, ésta se llenó con buffer de corrida 1X (Tris –HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%) y las muestras se colocaron en los pozos. Se aplicó un voltaje de 80 mV para llevar a cabo la electroforesis de las proteínas en el gel concentrador y 120 mV en el gel separador.

Concluida la electroforesis, el gel se colocó en un papel filtro humedecido en la solución para transferencia (Tris –HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) y sobre él la membrana de nitrocelulosa previamente humedecida en la misma solución procurando evitar la formación de burbujas entre el gel y la membrana. Enseguida se colocó otro papel filtro sobre la membrana y se montó cuidadosamente en la cámara de transferencia. Se aplicaron 300 mA durante 55 min, tiempo suficiente para obtener una transferencia completa de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.

2. Tinción de geles.

Los geles se tiñeron en la solución (azul de Coomassie R-250 0.125% en metanol al 40%, ácido acético al 10%) durante 30 min; se destiñeron en una solución similar pero sin colorante, durante 3h.

3. Inmunodetección.

Después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se colocó en una solución de TBS-T pH 7.6 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%), durante 1h después, para las proteínas con etiqueta de Histidinas provenientes de los plásmidos

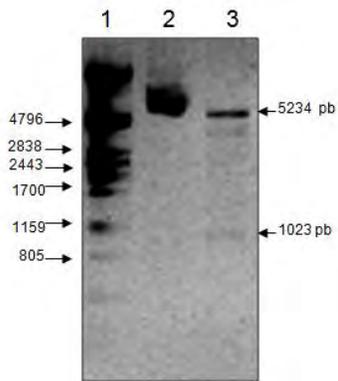
pET28b-Cwii y pCold-1-Cwii se incubó con el anticuerpo anti-His tag 15X monoclonal ligado a peroxidasa (dilución 1:1000) en TBS-T durante toda la noche, mientras que para las proteínas provenientes de la inducción del plásmido pGEX-5x-1-Cwii se incubó con el anticuerpo anti-GST monoclonal ligado a peroxidasa (dilución 1:2000) en TBS-T durante 1h. La membrana se lavó tres veces durante 10 min en una solución de TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo. El revelado se llevó a cabo incubando la membrana con 1 mL del reactivo de diaminobencidina y urea, hasta que apareció una marca de color marrón que es producto de la oxidación de la diaminobencidina, al entrar en contacto con el producto de la urea al ser usada como sustrato de la peroxidasa que está acoplada al anticuerpo anti-His tag 15X o anti-GST

VII. RESULTADOS:

Obtención del DNA plasmídico pET28b-Cwii, pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii.

Con la intención de comprobar la identidad de los tres plásmidos con el gen de Cwii, el cual fue previamente amplificado y subclonado en cada uno de ellos en nuestro laboratorio. Se realizó la obtención de DNA plasmídico por lisis alcalina y posteriormente secuenciado y caracterizado. Dicha caracterización se realizó con las enzimas Nco I y Xho I para el plásmido pET28b-Cwii (Figura 9).

A



B

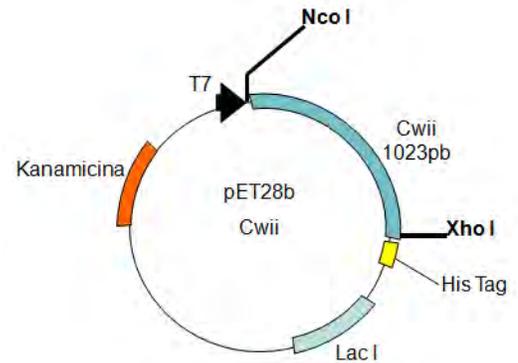
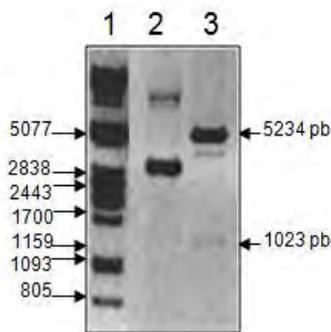


Figura 9. Caracterización del DNA plasmídico de la clona XL1-blue pET28b-Cwii cortado con Nco I y Xho I. A, Gel de agarosa mostrando los fragmentos resultantes de la digestión 1= Marcador de DNA λ Pst1, 2= pET28b-Cwii, 3= digestión pET28b-Cwii: B, Construcción pET28b-Cwii, señalando los sitios de corte en la restricción.

Mientras que para comprobar la identidad del plásmidos pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii, se realizó su caracterización con las enzimas Eco RI y Xho I (Figura 10 y 11). La secuenciación confirmó la identidad del gen de Cwii clonado en los tres plásmidos al coincidir con el DNA genómico secuenciado de *C. watsonii* (Cwat025718_Crwa_46118595)

A



B

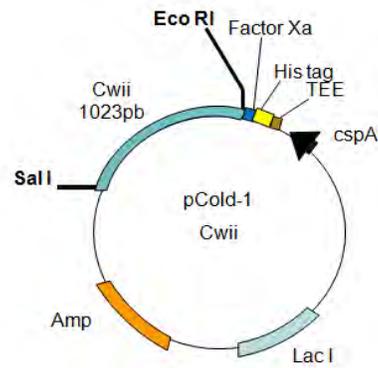
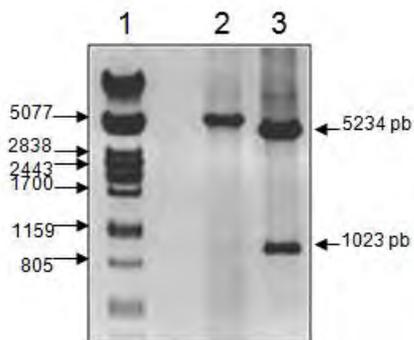


Figura 10. Caracterización del DNA plasmídico de la clona XL1-blue pCold-1-Cwii cortado con Eco RI y Xho I. A, Gel de agarosa mostrando los fragmentos resultantes de la digestión 1= Marcador de DNA λ Pst1, 2= pCold-1-Cwii, 3= digestión pCold-1-Cwii: B, Construcción pCold-1-Cwii, señalando los sitios de corte en la restricción.

A



B

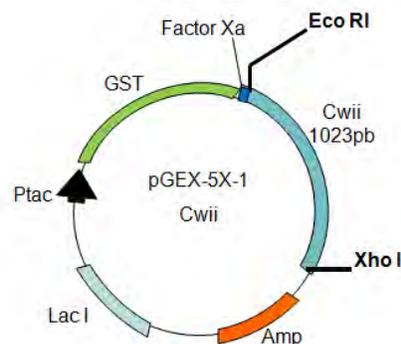


Figura 11. Caracterización del DNA plasmídico de la clona XL1-blue pGEX-5X-1-Cwii cortado con Eco RI y Xho I. A, Gel de agarosa mostrando los fragmentos resultantes de la digestión 1= Marcador de DNA λ Pst1, 2= pGEX-5X-1-Cwii, 3= digestión pGEX-5X-1-Cwii: B, Construcción pGEX-5X-1-Cwii, señalando los sitios de corte en la restricción.

Expresión.

Una vez demostrada la identidad de los plásmidos, se procedió a la expresión de la proteína en la cepa de *E. coli* ER2566 por inducción con IPTG.

pET28b. En la figura 12 se muestran los resultados de la tinción con azul de Coomassie y Western blot, correspondientes a 18h post-inducción a 25°C y una concentración final de IPTG de 1mM en medio 2YT. La tinción del gel con azul de Coomassie (Figura 12A) no mostró bandas con la movilidad relativa esperada (35kDa). En el Western blot (Figura 12B) no se logró la detección de la proteína Cwii en un peso molecular similar al esperado (35kDa) teniendo como control la detección de una proteína derivada de la cápside del virus de la gripe aviar (20kDa) la cual cuenta con una etiqueta de histidinas (6X His). De igual forma se observó el mismo resultado tras haber variado algunas condiciones como medio nutritivo (LB y 2YT), temperatura (20, 25, 30 y 37°C) y tiempo (3, 6, 12, 18 y 24 h) de inducción, así como las concentraciones de IPTG (0.3, 0.6 y 1mM) (resultados no mostrados).

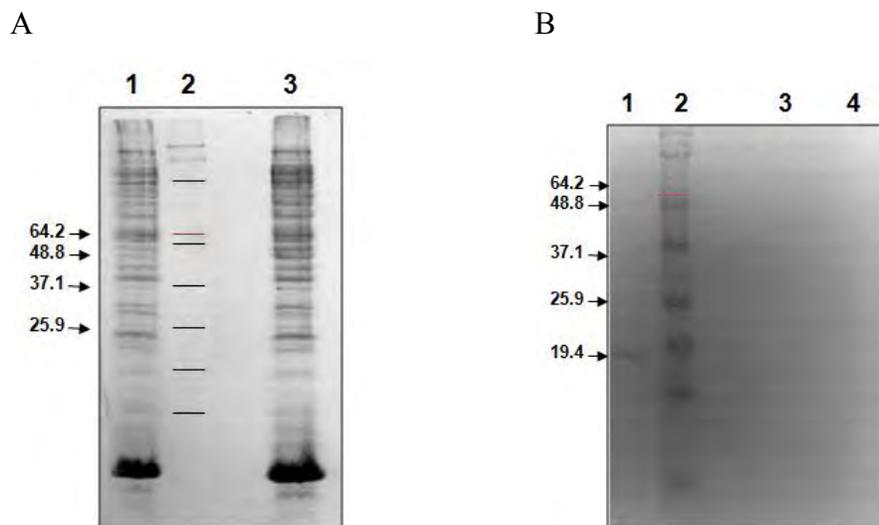


Figura 12. A, Tinción con azul de Coomassie de PAGE-SDS de Cwii, donde 1= expresión de pET28b, 2 = Marcador de proteínas, y 3= expresión de pET28b-Cwii; B, Western blot de Cwii (1=Proteína-6XHis (20 kDa), 2=Marcador, 3=pET28b, 4=pET28b-Cwii).

Cabe mencionar que al observar el marco de lectura por secuenciación del ADN plasmídico de la clona pET28b-Cwii se encontró que la fase de lectura es la adecuada, (Figura 13) lo que indica la correcta integridad del plásmido para la expresión de la proteína. Por otro lado existen mecanismos moleculares en la bacteria que pueden generar una proteólisis parcial que impida su detección por la etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal.

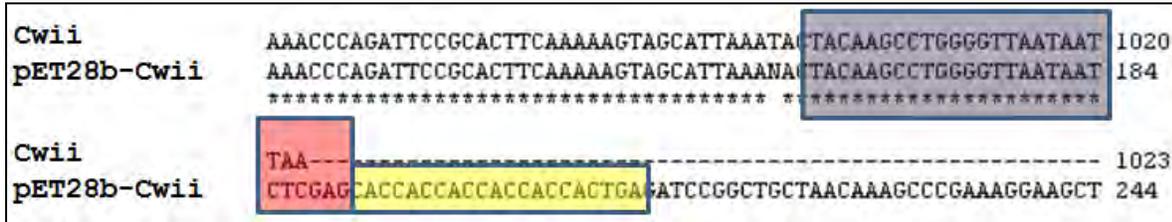
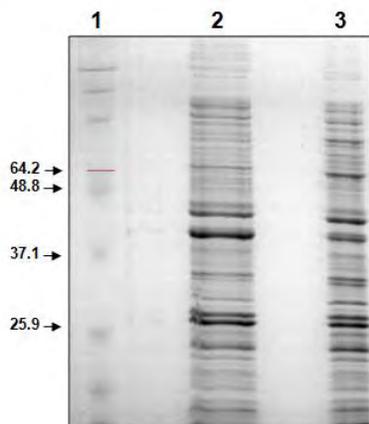


Figura 13. Alineamiento de la región 5' del orf que codifica para Cwii y la región 5' del vector pET28b-Cwii. El recuadro morado señala un segmento de ambas secuencias idénticas, el recuadro rojo indica el codón de paro en el orf de Cwii y su sustitución por un sitio XhoI en pET28b-Cwii, el recuadro amarillo denota la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas y su codón de paro.

pCold-1. Los resultados de la expresión se muestran en la figura 14. Estos corresponden a extractos de células 24h post-inducción, en medio 2YT. Como se muestra, no se observan bandas del peso molecular predicho para la proteína Cwii recombinante al analizar los extractos totales mediante PAGE y tinción con azul de Coomassie. Además se probaron varios tiempos de inducción (24, 36, 48 y 60 h) en cuatro clonas diferentes, los cuales no evidenciaron expresión de Cwii (resultados no mostrados). Así como tampoco se observaron bandas por la detección del anticuerpo dirigido contra la etiqueta de histidinas, mientras que el control derivado de la cápside del virus de la gripe aviar (20kDa) la cual cuenta con una etiqueta de histidinas (6X His) si se detectó.

A



B

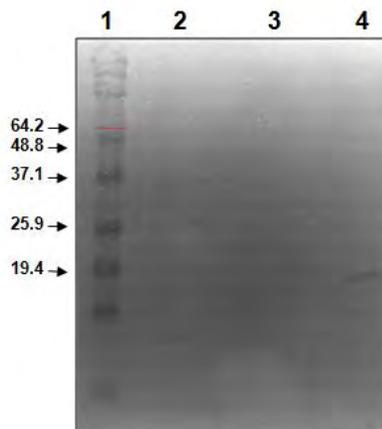


Figura 14. A, Tinción con azul de Coomassie de PAGE-SDS de Cwii, donde 1= Marcador de proteínas, para la expresión en la cepa ER2566: 2= pCold-1 y 3= pCold-1-Cwii; B, Western blot de Cwii (1=Marcador, 2=pCold-1, 3=pCold-1-Cwii, 4= Proteína-6XHis (20kDa).

pGEX-5X-1. En este plásmido se fusionó Cwii a GST, una proteína soluble que se expresa a altos niveles en *E. coli*. Se generaron 5 clonas con el inserto de Cwii en pGEX-5X-1 las cuales fueron transformadas en *E. coli* e inducida su expresión para identificar la presencia de Cwii (Figura 14).

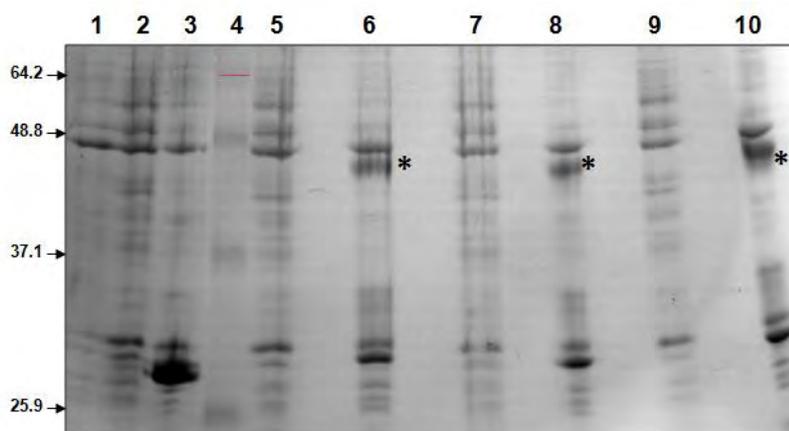


Figura 14. Tinción con azul de Coomassie de PAGE-SDS de Cwii. 1= expresión en pET28b, 4=Marcador de proteínas, para la expresión en la cepa ER2566: 2=pGEX-5X-1 no inducida, 3=pGEX-5X-1 inducida con IPTG, los carriles 5, 7 y 9 contienen las clonas pGEX-5X-1Cwii 2, 4 y 5 respectivamente, sin inducir la expresión; los carriles 6, 8 y 10 contienen las clonas pGEX-5X-1Cwii 2, 4 y 5 respectivamente, inducidas con IPTG (El asterisco indica la banda de expresión).

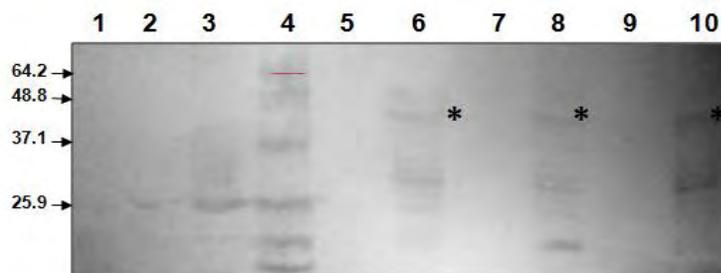


Figura 15. Western blot de Cwii: 1=expresión en pET28b, 4=Marcador de proteínas, para la expresión en la cepa ER2566: 2=pGEX-5X-1 no inducida, 3=pGEX-5X-1 inducida con IPTG, los carriles 5, 7 y 9 contienen las clonas pGEX-5X-1Cwii 2, 4 y 5 respectivamente, sin inducir la expresión; los carriles 6, 8 y 10 contienen las clonas pGEX-5X-1Cwii 2, 4 y 5 respectivamente, inducidas con IPTG (El asterisco indica la banda de expresión).

Al analizar cada una de las 5 clonas pGEX-5X-1-Cwii, se observa en la tinción con azul de Coomassie la presencia de una banda a una movilidad relativa cercana a 50kDa, para las clonas 2, 4 y 5 al ser inducida la expresión con IPTG (Figura 14, Carriles 6, 8 y 10) la cual se aproxima a la suma de los pesos moleculares de GST y Cwii. Por otro lado en el western blot (Figura 15) se logró la identificación de la proteína GST, así como la banda correspondiente a la fusión de GST-Cwii al inducir la expresión con IPTG en estas mismas clonas y la ausencia de bandas en los controles sin inducir. Debido a que este modelo impide la expresión nativa no es posible observar su presencia en membranas; sin embargo si es posible reincorporar a bicapas lipídicas para posteriores estudios tanto funcionales como estructurales.

VIII. DISCUSIÓN:

Como se mencionó, el estudio de los receptores ionotrópicos ha permitido conocer y entender muchas de las funciones cerebrales; de los cuales no se tiene una imagen de alta resolución que permita conocer con detalle su estructura en organismos eucariontes. Esto debido a la dificultad para expresarlos en sistemas heterólogos y por la complejidad de cristalizar proteínas de membranas. Los estudios más cercanos a elucidar la estructura de alguno de los miembros de esta familia han resuelto la estructura del receptor nicotínico a una resolución de 4 Å (Unwin, 2005), por otro lado a partir de reportes de los orf's en genomas bacterianos se encontró homólogos de los miembros de la familia de los LGIC's (Tasneem et al., 2005), los cuales mostraron la posibilidad para ser expresados y cristalizados, tal es el caso de las proteínas ELIC y GLIC (Bocquet et al., 2009; Hilf y Dutzler, 2008; Hilf y Dutzler, 2009), permitiendo realizar estudios comparativos de dinámica molecular que contribuyen a elucidar los mecanismos de apertura y cierre del canal, así como su conformación y estados de hidratación durante el paso del ion, con algunos miembros de los LGIC's (Cheng, Ivanov, Wang, Sine y McCammon, 2009).

El presente trabajo se enfocó en la expresión de la proteína Cwii en tres vectores plasmídicos diferentes: pET28b, pCold-1 y pGEX-5X-1, con el fin de explorar si esta proteína puede ser expresada en su forma nativa en *E. coli* o si es necesaria la participación de una proteína fusionada a Cwii que facilite su producción

El plásmido pET28b contiene el promotor del fago T7 para la expresión de proteínas en *E.coli*. Este no resultó favorable para lograr la expresión de Cwii en las condiciones y clona utilizadas, a diferencia de lo reportado para otras proteínas de membrana en condiciones nativas (Dutzler et al., 2002; Hattori et al., 2007; Singh, Somvanshi, Rathore, Kapoor, y Mishra, 2009). Se ha observado que el sistema de expresión basado en el promotor T7 suele tener decrementos en los niveles de expresión atribuidos a mutaciones en el DNA genómico de las cepas huésped (Vethanayagam y Flower, 2005), una de las alternativas para mejorar estos inconvenientes es utilizar variaciones en las condiciones de expresión las cuales pueden controlar mejor la inducción del represor *lac I*. Por ejemplo, se ha observado que al modificar las concentraciones de fuentes de carbono en el medio de cultivo se incrementa el rendimiento de la expresión de proteínas (Deacon, et al. 2008).

Cabe destacar que en nuestros experimentos el crecimiento de las bacterias no se vio inhibido al inducir la expresión de Cwii, lo que contrasta con la inhibición y muerte de *E. coli* por la expresión de GLIC (Bouquet et al. 2007). El problema de la inhibición del crecimiento fue resuelto por estos autores al fusionar GLIC con la proteína de unión a maltosa. Esto sugiere que existen limitantes propias de la bacteria para lograr la sobreexpresión de proteínas-canal de esta familia, bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

La expresión de Cwii en pCold-1 tampoco fue lograda. Por lo que la disminución de la acción de proteasas durante la inducción a bajas temperaturas no favoreció la producción de Cwii en las condiciones utilizadas para su expresión. En otros casos, como fue observado para la expresión de EnvZ-B y la calmodulina de *X. laevis* (Qing et al., 2004; Xia, Etchegaray e Inouye, 2001) esta estrategia si ha dado resultados. Pese a que esta estrategia de expresión bloquea la función del péptido señal, al insertarse una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal (Dougana, Mogka, y Bukaua, 2002), resultaba interesante explorarlo ya que esto descartaría la formación de estructuras secundarias en el extremo 5' no traducible del RNAs que pudiesen interferir con su traducción y la disminución de la posibilidad de proteólisis inducidos por la presencia del péptido líder nativo de Cwii (Drew et al, 2003).

Finalmente, sí resultó eficiente la expresión en el sistema pGEX-5X-1 el cual se basa en la fusión de la proteína GST. Otras proteínas que son difíciles de expresar en su forma nativa en *E. coli* también han sido producidas usando este plásmido, por ejemplo la proteína MglA, toxinas como AplPV y el péptido LfcinB-W10 (Feng et al., 2009; Jia y Pérez, 2009; Thomasson et al., 2002). Este sistema se basa en una estrategia similar a la aplicada para la expresión y obtención de los cristales de las proteínas ELIC y GLIC (Bocquet et al, 2009, Hilf y Dutzler, 2008; Hilf y Dutzler, 2009), lo que parece ser la forma más favorable para su expresión, si bien este modelo impide la expresión nativa y por tanto observar su presencia en membranas, es posible reincorporar a bicapas lipídicas para posteriores estudios tanto funcionales como estructurales.

IX. CONCLUSIONES:

- 1- No se logró la expresión de Cwii nativa en *E. coli*, utilizando los plásmidos pET28b y pCold-1 con las condiciones utilizadas durante este trabajo, por lo que su inserción en la membrana no fue posible

- 2- Se expresó la proteína Cwii por medio de la fusión con GST utilizando el plásmido pGEX-5X-1.

X. PERSPECTIVAS:

- 1- Optimización de la expresión.
- 2- Purificación del complejo GST-Cwii en columnas de afinidad y separación de Cwii por acción enzimática.
- 3- Determinar el estado oligomérico de la proteína.
- 4- Reconstitución en bicapas lipídicas artificiales y cristalización.
- 5- Resolver la estructura de la proteína a alta resolución por difracción de rayos X.

XI. REFERENCIAS CONSULTADAS:

1. Bertaccini E y Trudell JR. 2002. Predicting the transmembrane secondary structure of ligand-gate ion channels. *Protein Engineering* 15, 6, 443-453.
2. Bocquet N. Prado de Carvalho L. Cartaud J. Neyton J. Poupon CL. Taly A. Grutter T. Changeux JP. Corringer PJ. 2007. A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature* 445,117-119.
3. Bocquet N. Nury H. Baaden M. Le Poupon C. Changeux JP. Delarue M. Corringer JP. 2009. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457,111-114.
4. Cheng X. Ivanov I. Wang H. Sine S. M. McCammon JA. 2009. Molecular-Dynamics Simulations of ELIC—a Prokaryotic Homologue of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biophys J* 96, 4502–4513.
5. Cascio M. 2004. Structure and Function of the Glycine Receptor and Related Nicotinicoid Receptors. *J Biol Chem* 279, 19, 19383–19386.
6. Deacon SE. Roach PCJ. Postis VLG. Wright GSA. Xia X. Phillips SEV. Knox PJ. Henderson PJF. Mcpherson MJ. Baldwin SA. 2008. Reliable scale-up of membrane protein over-expression by bacterial auto-induction: From microwell plates to pilot scale fermentations. *Molecular Membrane Biology* 25, 8, 588-598.
7. Dougana DA. Mogka A. Bukau B. 2002. Protein folding and degradation in bacteria: To degrade or not to degrade? That is the question. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1607–1616.
8. Drew D. Fröderberg L. Baars L. L de Gier JW. 2003. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1610, 3 – 10.

9. Dutzler R. Campbell EB. Cadene M. Chait BT. MacKinnon R. 2002. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287-294.
10. Estrada AR. 2009. Caracterización de una proteína homóloga a un neuroreceptor de la cianobacteria *C. watsonii*. Tesis en proceso.
11. Feng X. Liu C. Guo J. Bi C. Cheng B. Li Z. Shan A. Li Z. 2009. Expression and Purification of an Antimicrobial Peptide, Bovine Lactoferricin Derivative LfcinB-W10 in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, in press.
12. Gunthorpe MJ. y Lummis SC. 2001. Conversion of the ion selectivity of the 5-HT(3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem* 276, 10977-10983.
13. Hattori M. Tanaka Y. Fukai S. Ishitani R. Nureki O. 2007. Crystal structure of the MgtE Mg21 transporter. *Nature* 448, 1072-1175.
14. Hilf R. y Dutzler R. 2008. X-ray structure of a prokaryotic pentamérica ligand-gated ion channel. *Nature* 452, 375-379.
15. Hilf R. y Dutzler R. 2009. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457, 115-119.
16. Imoto K. Busch C. Sakmann B. Mishina M. Konno T. Nakai J. Bujo H. Mori Y. Fukuda K. Numa S. 1998. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335, 645-648.
17. Jia Y. y Pérez JC. 2009. Recombinant expression and affinity purification of snake venom gland parvalbumin in *Escherichia coli*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 153, 303-308.

18. Keramidas A. Moorhouse AJ. French CR. Schofield PR. Barry PH. 2000. M2 pore mutations convert the glycine receptor channel from being anion- to cation-selective. *Biophys J* 79, 247-259.
19. Keramidas A. Moorhouse AJ. Schofield P. Barry PH. 2004. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol* [86](#), 161-204.
20. Le Novère N. y Changeux JP. 1999. The ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Res* 27, 340–342.
21. Le Novère N. y Changeux JP. 2001. LGICdb: the ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Res* 29, 1, 294-295.
22. Leonard RJ. Labarca CG. Charnet P. Davidson N. Lester HA. 1988. Evidence that the M2 Membrane-Spanning Region Lines the Ion Channel Pore of the Nicotinic Receptor. *Science* 242, 1578-1581.
23. Lin BR. Gierasch LM. Jiang C. Tai PC. 2006. Electrophysiological Studies in *Xenopus* oocytes for the Opening of *Escherichia coli* SecA-Dependent Protein-Conducting Channels. *J Membr Biol* 214, 103–113.
24. Méthot N. Ritchie BD. Blanton MP. Baenziger JE. 2001. Structure of the Pore-forming Transmembrane Domain of a Ligand-gated Ion Channel. *J Biol Chem* 276, 23726-23732.
25. Miyazawa A. Fujiyoshi Y. Unwin N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-955.
26. Olsen RW. y Sieghart W. 2009. GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141–148.
27. Qing G. Ma LC. Khorchid A. Swapna GVT. Mal TK. Takayama M M. Xia B. Phadtare S. Ke H. Acton T. Montelione GT. Ikura M. Inouye M. 2004. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22, 877-882.

28. Revah F. Bertrand D. Galzi JL. Devilles-Thiéry A. Mulle C. Hussy N. Bertrand S. Ballivet M. Changeux JP. 1991. Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* 353, 846-849.
29. Rigaud JL. Pitard B. Levy D. 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 123, 223-246.
30. Singh V. Somvanshi P. Rathore G. Kapoor D. Mishra BN. 2009. Gene cloning, expression and homology modeling of hemolysin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Protein Expr Purif* 65, 1-7.
31. Tai PC. Tian G. Xu H. Lian JP. Yu JN. 1991. In vitro protein translocation into *Escherichia coli* inverted membrane vesicles. *Methods Cell Biol* 34, 167-187.
32. Tasneem A. Iyer LM. Jakobsson E. Aravind L. 2005. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol* 6, 1-12.
33. Thomasson B. Link J. Stassinopoulos AG. Burke N. Plamann L. Hartzell PL. 2002. MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 46, 1399-1413.
34. Unwin N. 1993. Nicotinic Acetylcholine Receptor an 9 Å Resolution. *J Mol Biol* 229, 1101-1124.
35. Unwin N. 2005. Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4 Å Resolution. *J Mol Biol* [346](#), 967-989.
36. Vethanayagam JGG. y Flower AM. 2005. Decreased gene expression from T7 promoters may be due to impaired production of active T7 RNA polymerase. *Microb Cell Fac* 4,3.
37. Xia B. Etcheagaray JP. Inouye M. 2001. Nonsense Mutations in *cspA* Cause Ribosome Trapping Leading to Complete Growth Inhibition and Cell Death at Low Temperature in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 38, 35581-35588.
38. Zher JP. Waterbury JB. Turner PJ. Montoya JP. Omerigie E. Steward GF. Hensen A. Karl DM. 2001. Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 412, 635-638.

XII. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:

Tabla 1. Reactivos utilizados para la reacción de doble digestión con las enzimas Nco I y Xho I, en la caracterización de Cwii en el plásmido pET28b-Cwii.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la reacción de doble digestión con las enzimas Eco RI y Xho I, para la caracterización de los plásmidos pCold-1-Cwii y pGEX-5X-1-Cwii.

Tabla 3. Relación tiempo temperatura para la expresión de la proteína Cwii en el plásmido pET28b en medio LB y 2YT.

Tabla 4. Soluciones para la preparación de geles de poliacrilamida-SDS al 15 y 12%.

Figura 1. Estructura de un LGIC.

Figura 2. Comparación del análisis de hidropatía Kyte Doolittle de los orf's de *C. watsonii*, *G. violaceus* y *E. chrysantemi*

Figura 3. Comparación del análisis de hidropatía Kyte Doolittle de los orf's de *C. watsonii*, nAChR α 7 y GABA ρ 1.

Figura 4. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del dominio (M2).

Figura 5. Representación en listones del modelo pentamérico de la proteína Cwii.

Figura 6. Representación en listones de la estructura por rayos X de ELIC.

Figura 7. Representación en listones de la estructura por rayos X de GLIC en una conformación probablemente abierta.

Figura 8. Mapas de los plásmidos a utilizar en la expresión de Cwii.

Figura 9. Caracterización del DNA plasmídico de la clona XL1-blue pET28b-Cwii cortado con Nco I y Xho I.

Figura 10. Caracterización del DNA plasmídico de la clona XL1-blue pCold-1-Cwii cortado con Eco RI y Xho I.

Figura 11. Caracterización del DNA plasmídico de la clona XL1-blue pGEX-5X-1-Cwii cortado con Eco RI y Xho I.

Figura 12. Resultado de la expresión con el plásmido pET28b-Cwii.

Figura 13. Alineamiento de la región 5' del orf que codifica para Cwii y la región 5' del vector pET28b-Cwii.

Figura 14. Resultado de la expresión con el plásmido pCold-1-Cwii.

Figura 15. Tinción con azul de Coomassie de PAGE-SDS de la expresión con el plásmido pGEX-5X-1-Cwii.

Figura 16. Western blot de la expresión con el plásmido pGEX-5X-1-Cwii.

XIII. LISTA DE ABREVIATURAS:

Ab.- Anticuerpo

ACh.- Acetil colina

DAB.- 3,3' - Diaminobencidina tetrahidrocloruro

DDM.- Dodecil β -D-maltosidasa

DNA.- Ácido desoxirribonucleico

DO.- Densidad óptica

GABA.- Ácido γ -aminobutírico

GST.- Proteína glutatión S-transferasa

HRP.- Peroxidasa de rábano

INB.- Instituto de Neurobiología

IPTG.- Isopropil- β -tiogalactosido

LB.- Medio Luria Bertoni

LB2YT.- Medio Luria Bertoni enriquecido con extracto de levadura y triptona

LGIC.- Canales iónicos activados por ligando

MBP.- Proteína de unión a maltosa

nAChR.- Receptor nicotínico acetilcolinérgico

Orf.- Marco de lectura abierto

PBD.- Base de datos de proteínas

RNA.- Ácido ribonucleico

SDS.- Duodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio

SIRAS.- Dispersión anómala por remplazo de isoformas sencillas

TEMED.- N,N,N,N'-tetrametilnediamina

UNAM.- Universidad Nacional Autónoma de México