



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis estructural del sitio de interacción de la
proteína periplásmica Atu4243 de unión a GABA**

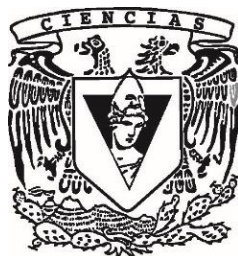
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

LAURA ANDREA PÉREZ GARCÍA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Víctor Manuel Valdés López

VOCAL: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

SECRETARIO: Dr. Alejandro Sosa Peinado

1er. SUPLENTE: Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

2do. SUPLENTE: M. en C. Sergio Romero Romero

LUGAR EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

**LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, TORRE
DE INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

“En el medio del odio, me pareció que había dentro de mí, un amor invencible. En medio de las lágrimas, me pareció que había dentro de mí, una sonrisa invencible. En medio del caos, me pareció que había dentro de mí, una calma invencible.

Me di cuenta, a pesar de todo, que...

En medio del invierno, había dentro de mí un verano invencible. Y eso me hace feliz. Porque no importa lo duro que el mundo empuje en mi contra, dentro de mí, hay algo más fuerte, algo mejor, empujando de vuelta”

Albert Camus – El verano- 1953

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme una formación académica de excelente calidad durante mis estudios de Licenciatura.

El desarrollo de este proyecto fue financiado por la Facultad de Medicina de la UNAM y por los proyectos de CONACyT 167838 y PAPIIT IN215612 por los insumos requeridos para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado, por tomarse el tiempo de revisar el presente trabajo que a continuación nombro:

- Dr. Víctor Manuel Valdés López
- Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
- Dr. Alejandro Sosa Peinado
- Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
- M. en C. Sergio Romero Romero

A los técnicos académicos del LFQIP, M. en C. Laura Álvarez y Dra. Isabel Velázquez, por su valioso trabajo técnico.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este trabajo se lo dedico especialmente a mi madre Rosa María “mi *Marcia*”, porque sin ella no sería posible que estuviera aquí, por brindarme toda la educación y herramientas necesarias para ser una mejor persona y por ayudarme a cumplir mis objetivos y mis sueños. Gracias por ser tan maravillosa, tan inteligente, tan persistente, tan asertiva pero, sobretodo, por ser una madre tan amorosa, mi mejor amiga pero, si fuera poco lo anterior: por ser una extraordinaria guerrera, permitiéndome luchar a tu lado y salir victoriosas en numerosas batallas, juntas de la mano. Sé que ahora te toca estar apoyándome desde cualquier plano energético aún indescriptible por la ciencia en el que te encuentres. Te dedico este primer logro y los que vienen, todo va por ti: ¡TE AMO y te echo de menos!

A mi padre Arturo mi *viejito*, por su paciencia, sus cuidados y su apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de la vida para que nunca me faltara nada.

A mis hermanas, *Pink* y *Pepete*, por los momentos compartidos, por su ayuda, su protección, sus chistes y sus caras divertidas, así como sus experiencias y enseñanzas transmitidas durante toda mi vida, pero, sobretodo por su apoyo y su amor incondicional que me fortalece y hace que sea un poco más viable esta etapa por la que estamos atravesando sabiendo que siempre estaremos juntas.

A mi *honniesposo*, por estar a mi lado y mantenerse conmigo en los momentos difíciles, por complementarme en todos los sentidos, por alentarme a ser mejor y no derrumbarme ante la adversidad de las circunstancias, por guiarme, por ayudarme y sacarme de dudas en innumerables ocasiones: Carlos, aprecio todo tu apoyo, amor y dedicación para terminar esta etapa de mi vida. HXS

A mis hijos adoptivos: Ticos “*mi ojos*”, Daffy “*mi loquita*”, Chumy “*mi alma gemela*” y Taniki “*mi piojito*” por estar conmigo, por tratar de entenderme y ayudarme dentro de sus posibilidades. Saben que desde siempre han sido un gran motor en mi vida. También a Nan “*mi hermanito*” por su preocupación, su apoyo, su extraña forma de quererme y su interés a que todo saliera de la mejor forma y concluyera satisfactoriamente esto.

A mi *bro*, por su interés en que terminara este capítulo y siguiera adelante: gracias hermano. De igual modo a Ángel, Amira y Alonso por ser parte de mi historia.

A Dios por permitirme estar aquí, por darme una familia maravillosa, por coincidir en esta vida con mi *honniesposo*, pero especialmente por dejarme conocer a un ser extraordinario que me enseñó a ser lo que soy, día tras día sin dudar un sólo segundo en mí y aunque ya no este conmigo aprecio que me haya permitido conocerlo por estos 26 años.

A todos los miembros demás miembros de mi familia y mi mejor amiga *Minnie* porque en algún momento de este camino me apoyaron y me compartieron buenos consejos.

A mi compañero de experiencias y excelente mejor amigo: Juanchito Banana Split que supo estar en las buenas y en las malas, que pese a que nos conocimos en relativamente poco tiempo, te convertiste en un gran apoyo, una persona con la que sé que puedo contar y confiar siempre.

A mi “madre adoptiva”, por ser un excelente guía en este proceso y enseñarme a trabajar en el laboratorio, por su ayuda para resolver mis dudas y por la paciencia al explicarme lo que no entendía: Sergio, te agradezco todo.

A mis amigos y hermanitos adoptivos Susanita, Bryan, Richie, Jules y Rodrigo, por brindarme su amistad y sus experiencias. Por darme una mano en lo que necesitara, por ser grandes compañeros de laboratorio y por hacerlo un mejor lugar de trabajo. A mi jefe, porque a pesar de las diferentes formas de trabajar que tenemos, este proyecto salió de la mejor forma posible con su ayuda, apoyo y paciencia. Gracias, Sosa.

A mis compañeros del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas y de la Facultad de Ciencias, por las experiencias y aprendizajes que tuvimos juntos a lo largo de la carrera.

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	16
Relación Proteína–Ligando	19
Biosensores	20
Transportadores ABC	21
Proteínas periplásmicas de unión	22
Proteína periplásmica de unión a ácido γ-aminobutírico Atu4243	25
METODOLOGÍA ESPECTROSCÓPICA PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS	34
Dispersión dinámica de luz (DLS)	34
Fluorescencia intrínseca	35
Dicroísmo Circular	36
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	39
Objetivo general	39
Objetivos particulares	39
MATERIAL Y MÉTODOS	40
Gen de Atu4243	40
Transformación de células quimio-competentes y electro-competentes	42
Sobrexpresión de Atu4243	43
Purificación de Atu4243	44
Precipitación de la proteína Atu4243 con sulfato de amonio	45
Desnaturalización de la proteína Atu4243 por urea y cloruro de guanidinio	45
Purificación de Atu4243 por cromatografía de columna de afinidad a níquel	46
Cuantificación de proteína Atu4243	47
Electroforesis	47
Dispersión dinámica de luz (DLS)	48
Fluorescencia intrínseca	49
Dicroísmo circular	50
Estudio de proteínas homólogas de Atu4243	50

RESULTADOS	53
Expresión y purificación de Atu4243	53
Purificación de Atu4243	55
Cuantificación de proteína Atu4243	58
Dispersión dinámica de Luz	59
Espectroscopia de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243 con GABA	62
Correlación entre el cambio de la fluorescencia intrínseca y la concentración de GABA	65
Dicroísmo circular	67
Estudio de proteínas homólogas a la proteína Atu4243	69
DISCUSIÓN	74
Protocolo de expresión y purificación	74
Estabilidad y homogeneidad de la proteína evidenciado a través de DLS, fluorescencia y DC	78
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	82
REFERENCIAS	83
ANEXO	87

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
A.I.	Antes de inducir
CME	Centro de masa espectral
D.I.	Después de inducir
D.O.	Densidad óptica
DC	Dicroísmo circular
DLS	Dispersión Dinámica de la luz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.T.	Extracto total
FPLC	Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
GABA	Ácido γ -aminobutírico
IB's	Cuerpos de inclusión
IF	Fluorescencia intrínseca
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IA	Intensidad de fluorescencia
Kd	Constante de disociación aparente
kDa	Kilo Dalton
LB	Lysogeny Broth
PBP's	Periplasmic Binding Protein (Proteínas periplásmicas de unión)
PDB	Protein Data Bank (Banco de Datos Estructurales de Proteínas)
pET-3	Plásmido-vector de subclonación
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
s	Sustrato
S.N.	Sobrenadante
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
λ_{max}	Longitud de onda máxima emisión
ΔF_{max}	Cambio máximo en la fluorescencia
ΔF_o	Cambio inicial en la fluorescencia

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación, estructuras covalentes y abreviaturas de los 20 aminoácidos.

Figura 2. Los diferentes niveles estructurales de las proteínas.

Figura 3. Mecanismo de transportadores ABC.

Figura 4. Modelo del mecanismo de una proteína periplásmica de unión con su ligando.

Figura 5. Los cambios conformacionales con presencia y ausencia de ligando de la proteína periplásmica LAO.

Figura 6. La proteína periplásmica de unión Atu4243 (A) y Atu2422 (B), ambas con el ligando GABA.

Figura 7. Molécula de GABA.

Figura 8. El sitio de unión de la proteína Atu4243.

Figura 9. El sitio de unión de la proteína Atu2422.

Figura 10. Alineamiento estructural entre las dos proteínas periplásmicas de unión Atu4243 y Atu2422.

Figura 11. Alineamiento entre las dos secuencias de proteínas periplásmicas de unión Atu4243 y Atu2422

Figura 12. Cladograma de la relación de la proteína periplásmica Atu4243 conservando los residuos clave sitio de unión.

Figura 13. Las diferentes curvas del espectro de DC para las diferentes estructuras secundarias de las proteínas.

Figura 14. Secuencia de nucleótidos.

Figura 15. Mapa del vector pET-3a y sus sitios de restricción.

Figura 16. Perfil electroforético SDS-PAGE de la proteína sin utilizar el amortiguador con arginina.

Figura 17. Perfil electroforético SDS-PAGE de la proteína Atu4243 utilizando el amortiguador de la arginina.

Figura 18. Se muestran los cromatogramas de la purificación de la proteína Atu4243 después de la columna acopladas a un equipo FPLC ÄKTA.

Figura 19. Perfil electroforético SDS-PAGE con las fracciones de purificación de la proteína Atu4243

Figura 20. Perfil electroforético SDS-PAGES con las purificaciones de la proteína Atu4243 soluble, desnaturizada con GndCl 5 M y renaturalizada, desnaturizada con urea 5 M y renaturalizada.

Figura 21. Se muestra el comparativo de los gráficos de radio hidrodinámico medidos por DLS de la proteína Atu4243.

Figura 22. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243 y su ligando GABA.

Figura 23. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243 y su ligando GABA (Datos normalizados).

Figura 24. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243 por desnaturización con urea y GndCl 5 M.

Figura 25. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243 por desnaturización con urea y GndCl 5 M (Datos normalizados).

Figura 26. Espectro de fluorescencia intrínseca de la titulación de la proteína Atu4243.

Figura 27. Gráfico de la proteína Atu4243 en el cual se representa el ajuste a un modelo de un sitio de unión.

Figura 28. Espectros de Dicroísmo Circular nativo de Atu4243 en sus diferentes condiciones a una temperatura de 25°C.

Figura 29. Árbol filogenético con la base de datos Uniref90 90% de redundancia para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a Atu4243.

Figura 30. Acercamiento del árbol filogenético con la base de datos Uniref90 90% de redundancia para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a Atu4243.

Figura 31. Árbol filogenético con la base de datos de secuencias no redundante (nr) para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a Atu4243.

Figura 32. Acercamiento del árbol filogenético con la base de datos de secuencias no redundante (nr) para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a Atu4243.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de la proteína Atu4243 en sus diferentes métodos de obtención.

Tabla 2. Comparativo de radio hidrodinámico entre las diferentes condiciones en el que se trató la proteína al momento de la purificación y se muestran los siguientes datos obtenidos de las mediciones en el DLS.

Tabla 3. Parámetros de los espectros de emisión de la proteína Atu4243

Tabla 4. Deconvolución de los espectros DC para las diferentes muestras de la proteína Atu4243. Se muestran los porcentajes de estructura secundaria para cada una.

RESUMEN

Análisis estructural del sitio de interacción de la proteína periplásmica Atu4243 de unión a GABA

Las proteínas periplásmicas de unión (PBP's) pertenecen a una superfamilia de proteínas ampliamente distribuidas, ubicadas en el periplasma de las bacterias Gram-negativas. La capacidad que poseen de unir diversos ligandos, entre ellos aminoácidos, azúcares, vitaminas, iones, metabolitos, etc. Es probable que haya surgido esta capacidad de unión a diversos ligandos por la plasticidad del cambio conformacional que permite explorar diversas conformaciones para unir ligandos. Si tomamos en cuenta que éste cambio conformacional está mediado por la ausencia o presencia de ligando, es posible monitorear cambios en las propiedades fisicoquímicas que presenta el sitio de unión, así como de las regiones cercanas a este. En particular, en la ingeniería de proteínas se han aprovechado los cambios en las propiedades intrínsecas de proteínas durante la unión con el fin del diseño de biosensores o elementos de control, receptores y enzimas biológicamente activas con las PBP's.

En este trabajo se realizó la caracterización de la proteína periplásmica de unión Atu4243 la cual une al ácido γ -aminobutírico (GABA) que es el principal neurotransmisor inhibitorio y actúa como una señal en el desarrollo de los tejidos en mamíferos, su estudio es relevante por su alto potencial para el diseño de un biosensor para enfermedades neurológicas. Una de las ventajas de esta proteína es que es estereoespecífica a la unión de GABA y presenta una afinidad del orden de micromolar, además de ser potencial para la introducción de fluoróforos extrínsecos para generar un biosensor altamente sensible, por lo que se eligió la

proteína Atu4243 que se encuentra en el microorganismo *Agrobacterium tumefaciens*. En el estudio de esta proteína se tomaron dos caminos diferentes para su purificación: el primero fue la proteína que se recuperó del sobrenadante después de la lisis celular en frío y el segundo fue la obtenida de la desnaturalización de la proteína que se encontró en los cuerpos de inclusión con dos agentes (urea y cloruro de guanidinio). De cada una de las muestras se obtuvieron los espectros de fluorescencia en los cuales se observó que hay una diferencia al utilizar la proteína silvestre (soluble) con respecto a la proteína que se obtiene de los cuerpos de inclusión, así como en los espectros de dispersión dinámica de luz, en los cuales se observó agregación en ausencia de L-arginina de las muestras con la proteína extraída de los cuerpos de inclusión por medio de la desnaturalización de los mismos. En los espectros de dicroísmo circular de la proteína se apreció una diferencia en la estructura secundaria que aparentemente fue dependiente del proceso de purificación que se llevó a cabo.

De manera general se pudo concluir que se necesita mejorar el protocolo para obtener un mayor rendimiento de la proteína para probar distintas mutaciones en el sitio de unión buscando aumentar su afinidad por el ligando y que esta pueda ser viable para el diseño de un biosensor. Por otra parte, no se encontró una “cercanía” entre las proteínas Atu4243 y Atu2422 a pesar de que se asemejan en su estructura y unan GABA, por lo que se sugiere que ambas tuvieron un proceso evolutivo diferente a pesar de encontrarse en el mismo organismo, esto nos indica el importante papel de la evolución en todo lo que nos rodea.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes y se encuentran en todas las células. Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos que se unen por enlaces peptídicos y se sintetizan a partir de 20 aminoácidos esenciales que se muestran en la figura 1. Estas moléculas se conocen como α -aminoácidos que poseen un grupo amino primario y un ácido carboxílico sustituyente en el mismo átomo de carbono, con excepción de la prolina que tiene un grupo amino secundario.

Por lo general estos 20 aminoácidos son clasificados de acuerdo a las propiedades de sus cadenas laterales (grupo R). Existen tres tipos principales de aminoácidos: con grupos R no polares, con grupos R polares y con grupos R polares con carga. Debido a ello es que las proteínas se pliegan, adoptando sus conformaciones nativas, en gran medida como respuesta a la tendencia de separar sus cadenas laterales hidrofóbicas del contacto con el agua y al solvatar sus cadenas polares, permitiendo que las proteínas tengan diversas funciones. Las propiedades de las proteínas están determinadas, en gran medida, por su estructura tridimensional, dado que todas estas están compuestas por los mismos 20 aminoácidos, sus propiedades deberían ser similares; sin embargo, la estructura tridimensional de una proteína nativa (plegada desde un punto de vista fisiológico) está especificada por su estructura primaria, de modo que tiene un conjunto único de características (Voet, *et al.*, 2006). Lo más notable es que las células pueden producir proteínas con diferentes propiedades que les confiere una función distinta, a pesar de estar unidos a los mismos 20 aminoácidos y esto se debe a que la combinatoria es muy

grande, además se conoce que la información necesaria que determina el plegamiento se encuentra contenida en la secuencia de las proteínas únicamente. Gracias a esto los organismos pueden sintetizar productos tan ampliamente diversos como enzimas, hormonas, anticuerpos, transportadores, antibióticos y otras sustancias que tienen diversas actividades biológicas (Nelson, *et al.*, 2008).

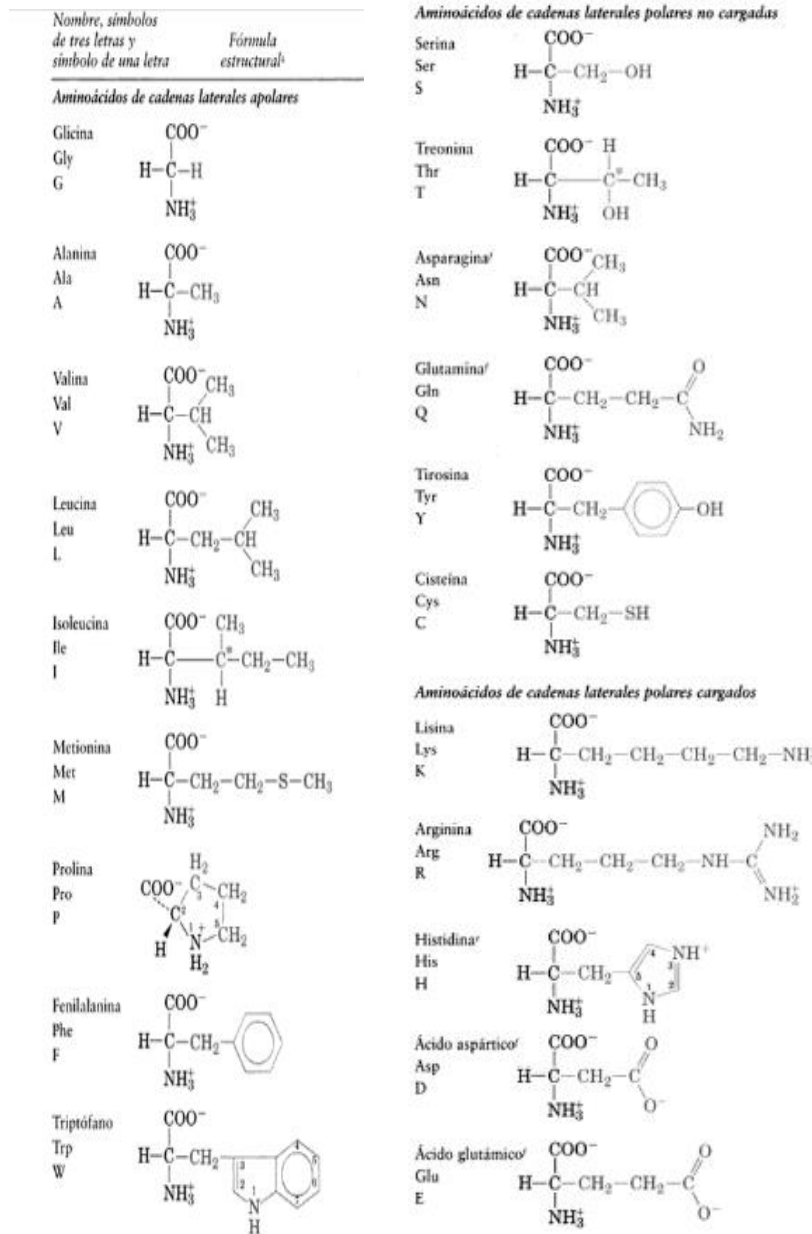


Figura1. Clasificación, estructuras covalentes y abreviaturas de los 20 aminoácidos (Voet, *et al.*, 2008).

Existen cuatro niveles estructurales para las proteínas. La estructura primaria es la secuencia de diferentes aminoácidos que contiene una proteína la cual es directamente determinada por la secuencia de nucleótidos en el código genético, esto a su vez determina el plegamiento de la proteína en un nivel estructural más alto (figura 2-A). La estructura secundaria del polipéptido puede adoptar formas de hélices α o hebras β , formando interacciones entre grupos N-H y C=O en las partes invariables de los aminoácidos en la cadena principal del polipéptido (figura 2-B). La estructura terciaria es en donde la proteína se encuentra de forma globular con cualquiera de los elementos, ya sea hélices α , hebras β o ambos (figura 2-C). Por último, la estructura cuaternaria (figura 2-D) es cuando dos o más subunidades polipeptídicas se asocian en un mismo espacio por asociación de sus cadenas principales. (Sosa, *et al.*, 2004).

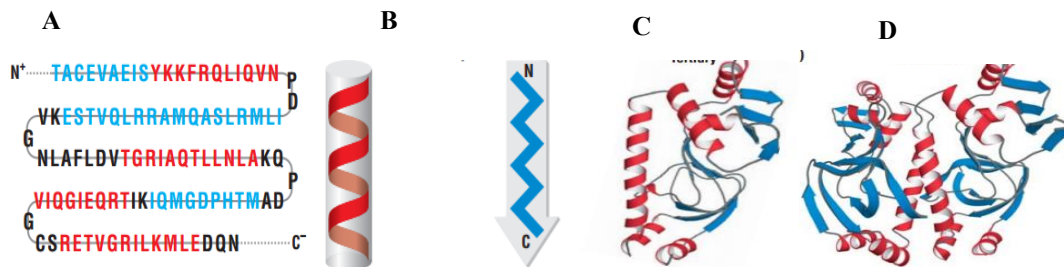


Figura 2. Los diferentes niveles estructurales de las proteínas. A) La estructura primaria es donde se muestra la secuencia de aminoácidos que contiene la información de la especificidad de la proteína. B) La estructura secundaria es donde los patrones regulares estructurales repetitivos de enlaces de hidrogeno conformado por hélices α (rojo) y hebras β (azul). C) así como la forma en la que estos elementos se acomodan juntos para formar la estructura terciaria. D) la estructura cuaternaria en donde se unen más de dos cadenas polipeptídicas (Sosa, *et al.*, 2004).

Las asas son estructuras aperiódicas, esto quiere decir que los aminoácidos que los conforman no pueden llegar a tener una estructura secundaria. En una familia de proteínas dada, la variabilidad estructural es el resultado de sustituciones,

inserciones y deleciones de residuos entre distintas proteínas, estos cambios con frecuencia corresponden a las regiones de asas expuestas que conectan elementos de la estructura secundaria (sea hélices α o hebras β) de una proteína. Por lo tanto las asas pueden ayudar a determinar la especificidad funcional de algunas proteínas, así como también pueden contribuir estructuralmente a los sitios activos o de unión de algunas proteínas (Fiser, *et al.*, 2000).

Relación Proteína–Ligando

Las proteínas son moléculas dinámicas cuyas funciones invariablemente dependen de interacciones con otras moléculas. Estas interacciones son importantes en funciones tales como: el transporte de oxígeno, la función inmune, la contracción de músculos, etc. Las funciones de muchas proteínas implican la unión reversible de un ligando. Un ligando puede ser cualquier tipo de molécula, la naturaleza de la interacción proteína-ligando es fundamental para la vida, lo que permite a un organismo responder con rapidez y de forma reversible a cambios ambientales y circunstancias metabólicas. El ligando se une en a un lugar específico de la proteína llamada sitio de unión, que se complementa con el ligando en tamaño, forma, carga y en carácter hidrofóbico o hidrofílico. Por otra parte, la interacción es tan específica que la proteína puede discriminar entre miles de moléculas diferentes en su entorno y de forma selectiva interactuar con una o unas pocas moléculas. También hay proteínas las cuales tienen más de un sitio de unión que se encuentran separados y a su vez pueden reconocer varios ligandos (Nelson, *et al.*, 2008).

Las proteínas son muy flexibles y los cambios conformacionales pueden ser sutiles, lo que refleja las vibraciones moleculares y pequeños movimientos de los aminoácidos a través de la proteína. Estos cambios conformacionales son frecuentemente esenciales para dar la función de proteína. La unión de una proteína con su ligando a menudo está acoplado a un cambio conformacional que permite que el sitio de unión esté libre para la entrada del ligando, permitiendo así una unión muy precisa. Ser capaz de identificar los cambios de rigidez y flexibilidad en la estructura de una proteína debido a cambios en su ambiente como la temperatura o cambios en el solvente, resulta esencial para poder entender las bases que rigen la relación estructura-función. Desde un punto de vista práctico, el tener este tipo de información nos permite buscar alternativas para optimizar las características estructurales y funcionales de las proteínas mediante métodos de ingeniería con fines biotecnológicos (Krüger, *et al.*, 2013).

Biosensores

Un biosensor es un receptor biológico capaz de monitorear la concentración de un analito específico o más de uno; debe ser selectivo para interactuar solamente con una conformación particular de una macromolécula. Este evento de proteína-ligando está típicamente asociado a las proteínas alostéricas que presentan cambios en la conformación de proteínas acopladas a cambios en la afinidad por su ligando u otras proteínas. En cualquier caso, para el diseño del biosensor se requiere un transductor adecuado y la naturaleza de éste puede ser diversa como óptico, mecánico-químico, electro-químico, acústico, etc. Para la selección del

biosensor, primero se elige el componente biológico; por lo general, es una proteína que facilita la estereoespecificidad requerida para la interacción deseada. En el caso ideal se utiliza una proteína que sólo une al analito para monitorear. De acuerdo con ello, una familia de proteínas en el espacio periplásmico de la bacteria cumple este requisito, ya que estas proteínas presentan un cambio conformacional tras la unión del ligando: los transportadores ABC, (Sosa, *et al.*, 2010).

Transportadores ABC

Los transportadores ABC se encuentran en especies eucariontes tanto como en procariontes, usando la hidrólisis del ATP para translocar los solutos a través de la membrana celular. También se le conoce como el sistema de transporte dependiente de proteínas periplásmicas de unión en las bacterias clasificadas como Gram-negativa y el sistema de transporte dependiente de unión a lipoproteínas en las bacterias Gram-positivas. El transportador muestra una organización global común con tres tipos de componentes moleculares. Por lo general, se compone de dos proteínas integrales de membrana (permeasas) que tienen cada uno seis segmentos transmembranales, dos proteínas de membrana periféricas que se unen e hidrolizan ATP y otra proteína periplásmica de unión al sustrato o lipoproteínas, como se muestra en la figura 3 (Tomii, *et al.*, 1998). Los transportadores ABC de procariontes que están implicados en la absorción de un soluto en la célula emplean una proteína de unión a ligando específico para capturar el sustrato (Heide, *et al.*, 2002).

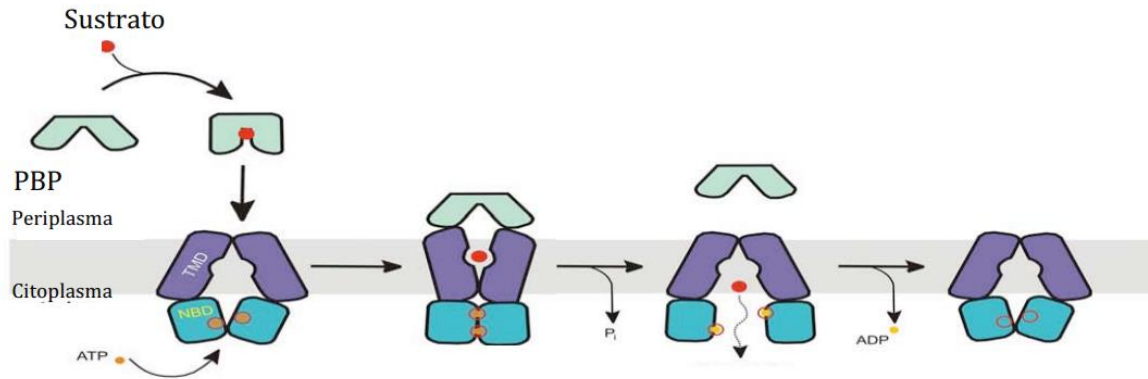


Figura 3. Mecanismo de transportadores ABC. LA PBP (verde) se une a su sustrato (rojo) ocasionando un cambio conformacional de su estructura abierta a su estructura cerrada. La proteína en su conformación cerrada reconoce el complejo transmembranal (morado) y este reconocimiento ocasiona un cambio conformacional en el componente de membrana. Posteriormente se acopla la hidrólisis de AYP por las subunidades de la ATPasa (turquesa) para la translocación del sustrato del periplasma al citoplasma (Guzmán, 2015).

Proteínas periplásmicas de unión

Las proteínas periplásmicas de unión (PBP's por sus siglas en inglés) son miembros representativos de una superfamilia de proteínas ampliamente distribuidas, ubicadas en el periplasma entre las dos membranas lipídicas externas de las bacterias Gram-negativas. Las PBP's unen un espectro de sustratos y median su transporte en las células o inician la quimiotaxis activando el movimiento flagelar. También las PBP's pueden servir como chaperonas para el repliegue de proteínas desnaturizantes (Felder, *et al.*, 1999). Se han identificado PBP's con una amplia variedad de ligandos, incluyendo hidratos de carbono, aminoácidos, aniones, iones metálicos, dipéptidos y oligopéptidos. La diversidad de secuencias que les confiere una estructura distinta dentro de esta superfamilia es alta, sin embargo el plegamiento estructural general se conserva. Las PBP's consisten en dos dominios unidos por una región de bisagra, con un sitio de unión a ligando que está situado

en la intercara entre los dos dominios (figura 4). Las PBP's pueden adoptar al menos dos conformaciones diferentes que están mediadas por ligandos específicos, una es la forma abierta libre de ligando y otra es la forma cerrada cuando la proteína está unida a su ligando.

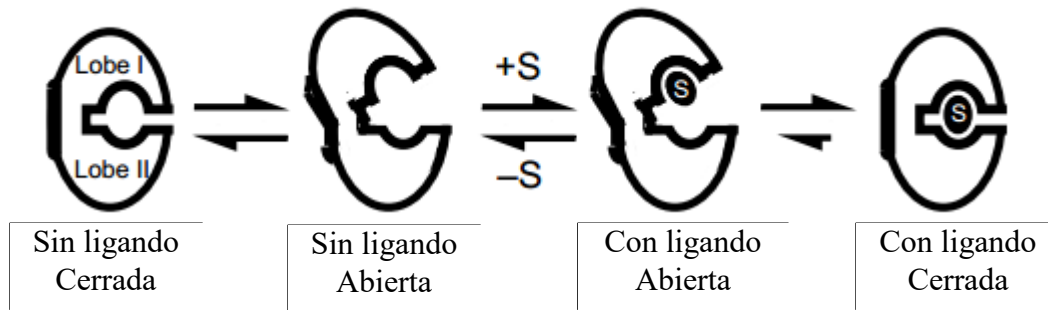


Figura 4. Modelo del mecanismo de una proteína periplásmica de unión con su ligando mostrando sus diferentes estados conformacionales en presencia y ausencia de ligando (Paas, 1998).

Las PBP's se clasifican topológicamente en tres grupos basándose en el número de cruces o bisagras entre los dominios globulares: las PBP del grupo I tienen tres conexiones y cuentan con 6 hebras betas β en cada dominio; el grupo II tiene dos conexiones y tiene 5 hebras betas β en cada dominio, y el grupo III tiene sólo una conexión entre ambos dominios por una hélice α . Aunque se conocen un gran número de estructuras para las PBP del grupo I o II, se han caracterizado estructuralmente menos PBP del grupo III. Las PBP de los grupos I y II muestran más movimientos de dominio durante la transición de su estado de no unión a su ligando; sin embargo, no se han observado grandes cambios conformacionales hasta la fecha en las PBP's del grupo III (Shi, *et al.*, 2009). La conformación cerrada predomina en presencia del ligando y acomoda a este ligando dentro del sitio de unión (figura 5). Esta acción mecánica de las PBP's motiva su uso como un sensor a nanoescala. Las PBP's se han incorporado ampliamente en los sensores

electroquímicos y se utilizan para inducir una respuesta de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia a los fluoróforos, sin embargo las PBP's permanecen inexploradas como actuadores directos, es decir como biosensores de dispositivos a nanoescala, (Yoon, *et al.*, 2011).

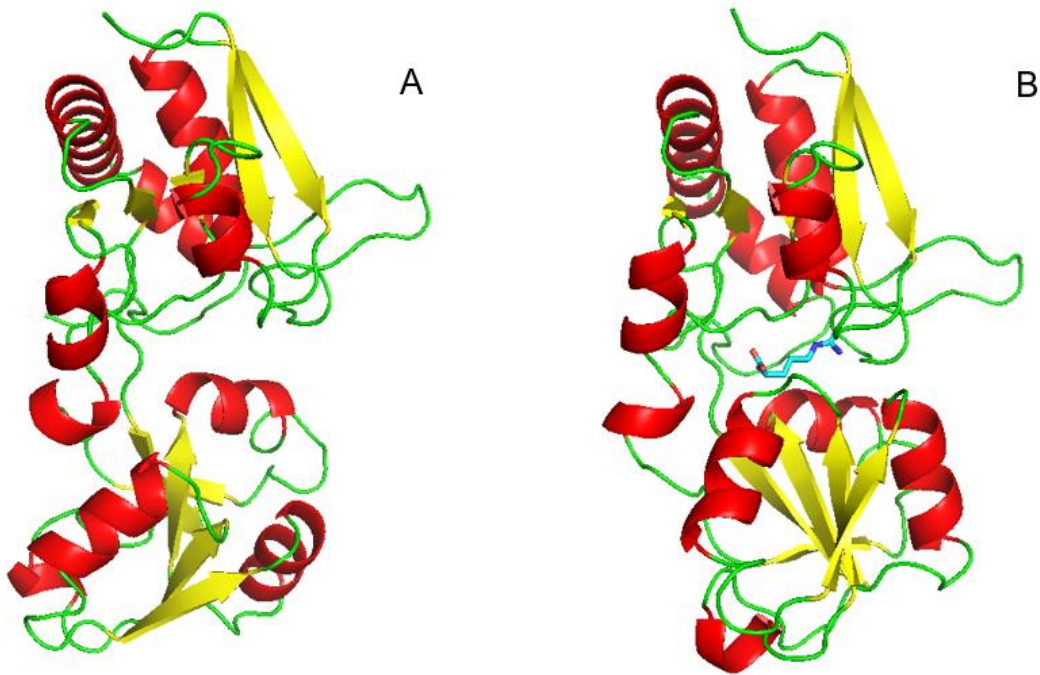


Figura 5. Los cambios conformacionales en presencia y ausencia de ligando de la proteína periplásmica LAO. Al lado izquierdo (A) se muestra la conformación en el estado abierto (PDB: 2LAO) y en el lado derecho (B) se muestra la conformación en el estado cerrado de la proteína LAO con el ligando arginina (PDB: 1LAF). Programa PyMol.

Es probable que la gran capacidad de adaptación de esta superfamilia haya surgido del posicionamiento del sitio de unión en la intercara entre dominios y del cambio conformacional mediada por el ligando. En esta disposición los ligandos se colocan dentro de un entorno que se parece al interior de una proteína pero los residuos que forman el sitio de unión están colocados en la superficie de sus dominios.

Además, el cambio conformacional mediado por ligando permite el desarrollo de funciones vinculadas a través del acoplamiento conformacional. La ingeniería de

proteínas se ha aprovechado de las propiedades intrínsecas de este plegamiento de proteínas para diseñar biosensores alostéricos, elementos de control, receptores y enzimas biológicamente activas con las PBP's. El cambio conformacional mediado por ligando de la PBP proporciona un poderoso mecanismo para la ingeniería (Dwyer, *et al.*, 2004).

Proteína periplásmica de unión a ácido γ -aminobutírico Atu4243

El ácido γ -amino butírico (GABA por sus siglas en inglés) es un aminoácido no proteico que está presente en una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, levaduras, plantas y animales. En animales, el GABA actúa como una señal de célula a célula durante la neurogénesis en la etapa adulta y como un neurotransmisor esencial en las neuronas maduras. El ligando GABA es importante en la comunicación entre especies en las interacciones de parásito-hospedero y en mamíferos del sistema nervioso central, GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio y actúa como una señal en el desarrollo de los tejidos (Planamente, *et al.*, 2012). En las plantas y bacterias, la síntesis y degradación del GABA también se asocia a estrés biótico y abiótico, incluyendo condiciones ácidas y daños mecánicos o de estimulación (Chevrot, *et al.*, 2006). Los patógenos de *Agrobacterium tumefaciens* modifican genéticamente a su hospedero para conducir a la síntesis de opinas en los tumores de plantas. Las opinas son fosfodiésteres, así como también pueden ser productos de aminoácidos condensados con cetoácidos o azúcares. Estos son nutrientes de *Agrobacterium* e importados a la célula bacteriana a través

de proteínas de unión periplásmica (PBP's) y transportadores ABC (Chemistry, *et al.*, 2016).

El transporte de GABA involucra a dos proteínas periplásmicas de unión (PBP's), Atu2422 y Atu4243 (figura 6). Estas dos PBP's muestran una afinidad muy similar para GABA, pero difieren tanto en su secuencia como en la composición y la selectividad del sitio de unión a GABA. La proteína Atu2422 se puede unir a un amplio espectro de aminoácidos con una cadena lateral corta, tales como alanina, valina, prolina, que son inhibidores competitivos del transporte de GABA. En contraste, el transporte GABA mediado por la proteína Atu4243 sólo es alterado por un análogo sintético llamado ácido trans-4-aminocrotónico (TACA), en el que un doble enlace confiere rigidez e imita a GABA en una conformación plana. El GABA es una molécula flexible capaz de adoptar diversas conformaciones al unirse a la proteína Atu4243 (figura 6-A), sin embargo hasta ahora solo se tiene cristalizado en un plano único de conformación extendida con el ligando GABA (PDB código 4EUO), mientras que la proteína Atu2422 interactuando con el ligando GABA adopta una conformación más curvada (PDB código 3IP9) (figura 6-B) (Planamente, *et al.*, 2012).

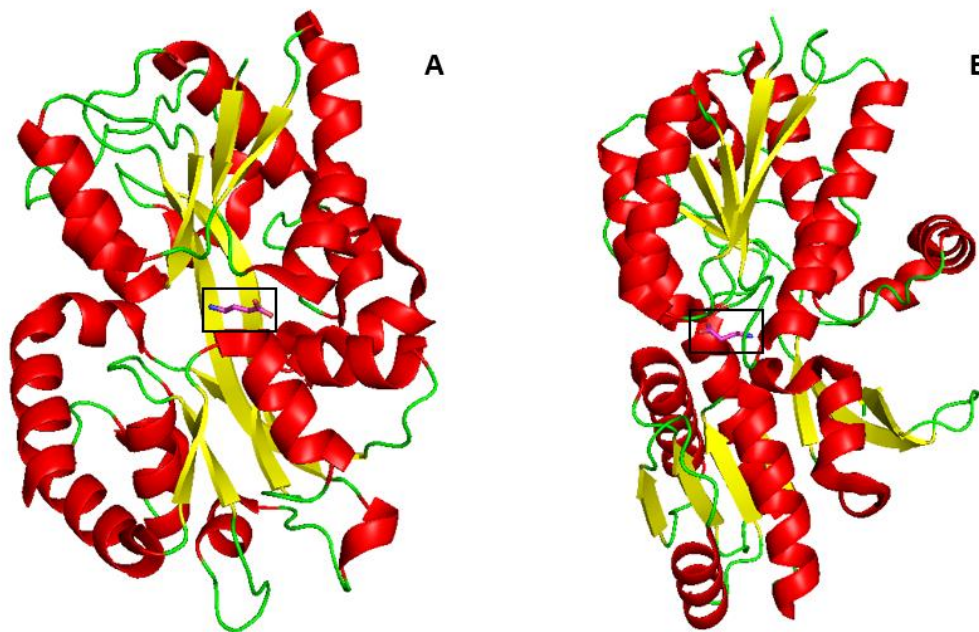


Figura 6. A) La proteína periplásmica de unión Atu4243 con el ligando GABA en su estructura conformacional cerrada. B) La proteína periplásmica de unión Atu2422 con el ligando GABA en su estructura conformacional cerrada. Programa PyMol.

El ligando GABA hace seis interacciones polares con Atu4243, el grupo amino de GABA hace enlaces de hidrógeno con ambos oxígenos del grupo carboxilo de Asp²²⁶ y una molécula de agua. Un átomo de oxígeno (OE2 indicado en la figura 7) del grupo carboxilato de GABA forma un enlace de hidrógeno con el NH₂ del grupo guanidinio de la molécula Arg²⁰³, mientras que el otro átomo de oxígeno (OE1 indicado en la figura 6) interactúa con el amino de Arg²⁰³, el átomo de oxígeno de Thr¹² y el OH de Tyr²⁶². El ligando GABA se sitúa entre estas dos cadenas laterales Trp⁸ y Trp²⁰⁰ que junto con el anillo fenilo de Phe⁹⁹ proporcionan el 77% de las interacciones de Van der Waals.

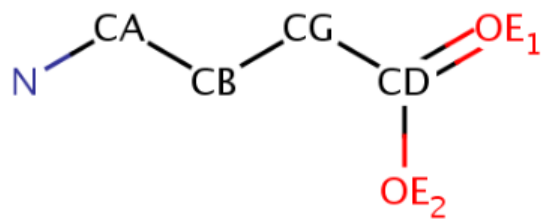


Figura 7. Molécula de GABA, ligando de la proteína periplásmica de unión Atu4243.

Las características del sitio de unión de la proteína Atu4243 con su ligando GABA están definidos por las cadenas laterales con los siguientes aminoácidos: Trp⁸, Thr¹², Glu⁶⁰, Phe⁹⁹, Tyr¹⁰¹, Trp²⁰⁰, Arg²⁰³, Asp²²⁶ y Tyr²⁶² como se muestra en la figura 8 (Planamente, *et al.*, 2012).

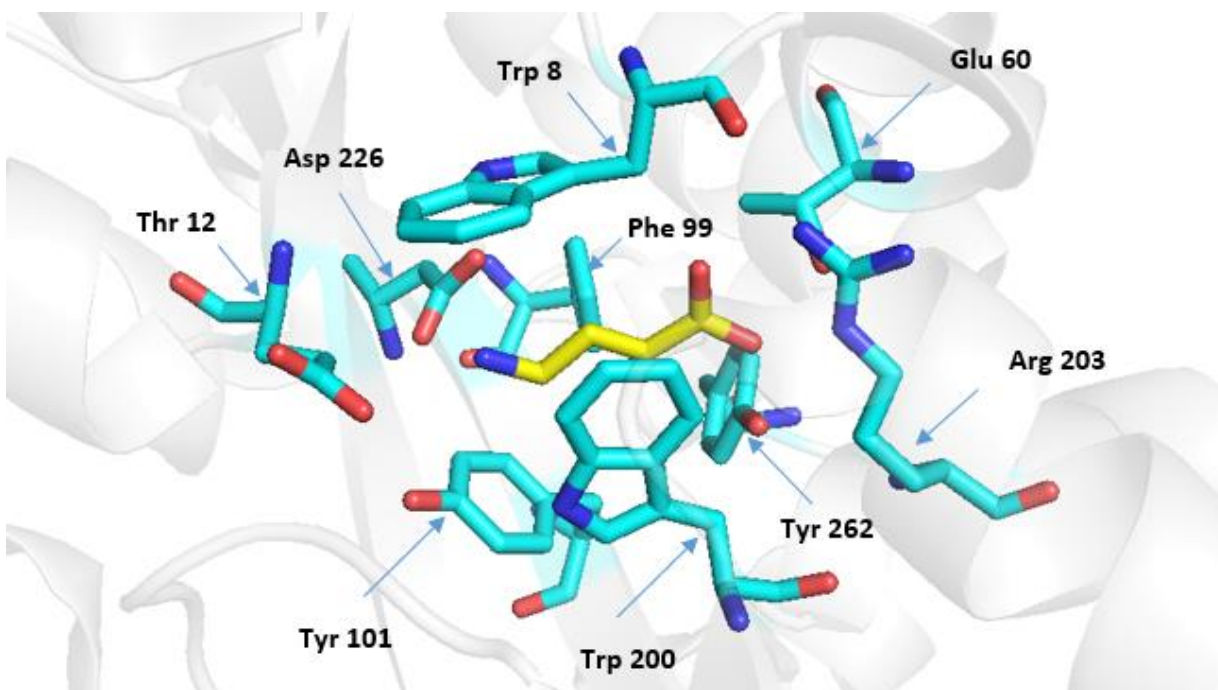


Figura 8. El sitio de unión de la proteína Atu4243 está definido por las cadenas laterales de Trp⁸, Thr¹², Glu⁶⁰, Phe⁹⁹, Tyr¹⁰¹, Trp²⁰⁰, Arg²⁰³, Asp²²⁶ y Tyr²⁶² con su ligando GABA (amarillo). Programa PyMol.

La constante de disociación (Kd) reportada en la literatura de la proteína Atu4243 con su ligando GABA que fue medida por fluorescencia intrínseca, ya que esta proteína tiene 12 residuos Trp, de los cuales dos (Trp⁸ y Trp²⁰⁰) se encuentran en el sitio de unión de la proteína, la Kd de la proteína Atu4243 por GABA es de 9 ± 2 μ M. Debido a que la cadena lateral Asp²²⁶ en la proteína Atu4243 forma un enlace de hidrógeno con el grupo amino GABA, y Arg²⁰³ tiene dos enlaces de hidrógeno con su grupo carboxilato, por lo que nos da a entender que estos dos residuos deben desempeñar un papel importante en la unión del ligando GABA para esta proteína. Las características del sitio de unión de la proteína Atu2422 de unión no-selectiva a GABA, está definido por las cadenas laterales con los siguientes aminoácidos: Phe¹⁸, Phe⁷⁷, Asn⁷⁸, Ser⁷⁹, Ala¹⁰⁰, Ala¹⁰¹, Thr¹⁰², Tyr¹⁵⁰, Leu²⁰², Asp²²⁶, Gly²²⁷, Tyr²⁷⁵ y en su secuencia solo contiene 3 residuos Trp, sin embargo ninguno de estos se encuentra en el sitio de unión (figura 9), por lo que no se tiene una Kd reportada (Planamente, *et al.*, 2010).

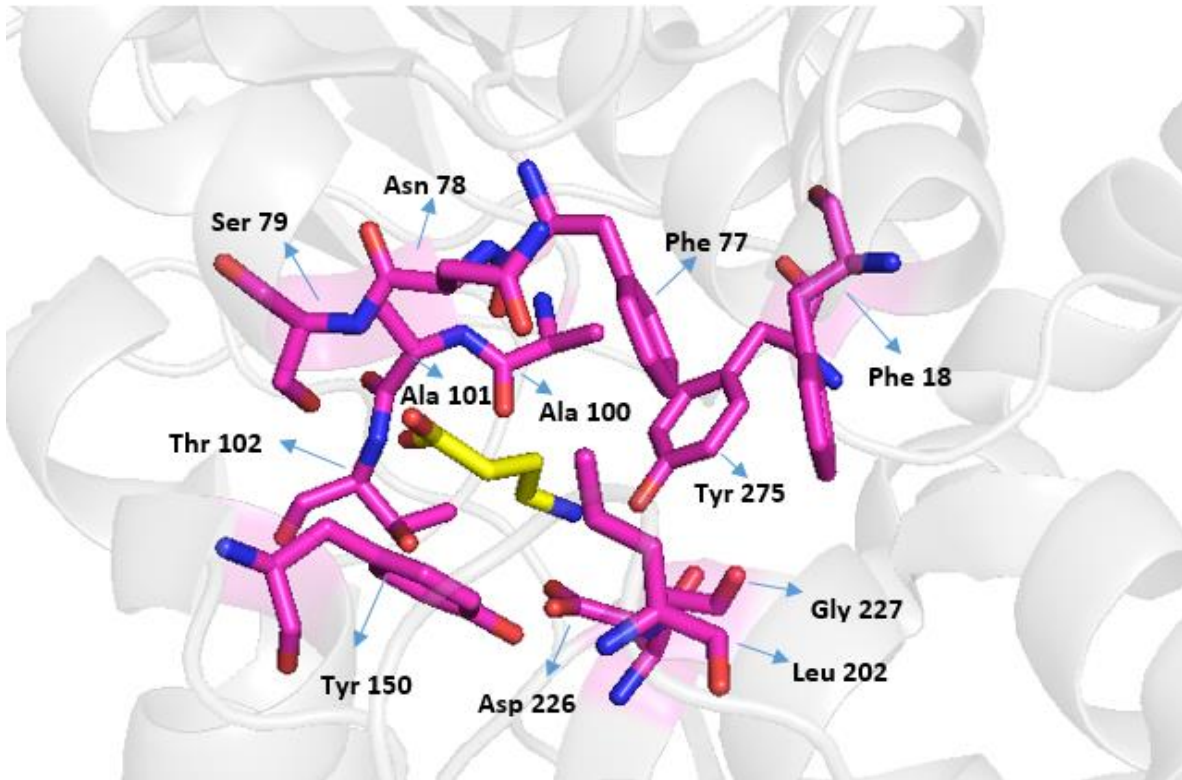


Figura 9. El sitio de unión de la proteína Atu2422 está definido por las cadenas laterales de Phe¹⁸, Phe⁷⁷, Asn⁷⁸, Ser⁷⁹, Ala¹⁰⁰, Ala¹⁰¹, Thr¹⁰², Tyr¹⁵⁰, Leu²⁰², Asp²²⁶, Gly²²⁷, y Tyr²⁷⁵ con su ligando GABA (amarillo). Programa PyMol.

El sitio de unión a GABA de la proteína Atu4243 no mostró similitud con el de la proteína de unión no-selectiva al ligado a GABA Atu2422 (Planamente *et al.*, 2010). Por lo tanto, la conformación y orientación de GABA unidos en los dos sitios de unión a ligando son diferentes. En particular, GABA exhibe orientación opuesta cuando las estructuras de Atu4243 y Atu2422 se superponen (figura 10).

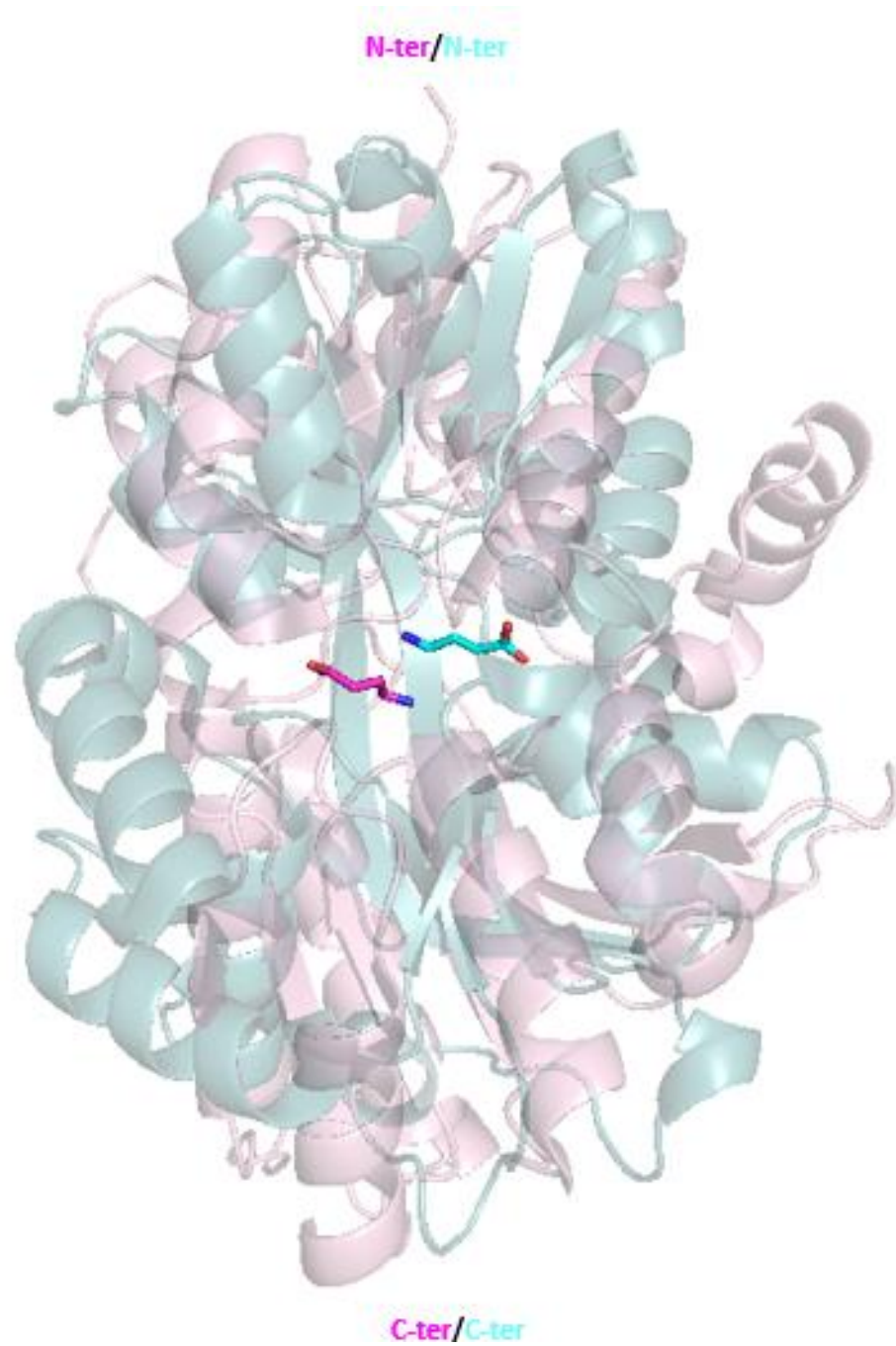


Figura 10. Alineamiento estructural entre las dos proteínas periplásmicas de unión Atu4243 (PDB: 4EUO) en color cian y Atu2422 (PDB: 3IP9) en color magenta. Ambas en su estructura cerrado con el ligando GABA en la región de bisagra. Programa PyMol.

Con un alineamiento de las secuencias que se llevó a cabo en línea EMBL-EBI (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) tanto de la proteína Atu4243 (primer marco) y la proteína Atu2422 (segundo marco) el porcentaje de similitud que se muestra es de un 38.8% y el porcentaje de identidad es de 25.7%, así como el porcentaje de espacios que hay en el alineamiento entre ambas proteínas es de 23.8% (figura 11). Por lo que a pesar de tener afinidad por el mismo ligando aparentemente no tienen una cercanía filogenética.

```

Atu4243_01      138  SAPGVIEAALLADGV-TADKLYPLDLDRAFKKLDTIKSDIIWWSG----- 181
      :|.|||.|  ::::| | .|||  |.....|:.....| |:|. |
Atu2422_01      163  NAAGVTE--VMYEGVNVGDK----DFSALISKMKEAGVSIYWGGLHTEA 206

Atu4243_01      182  -----GAQSQQLIASAEAPFGSVWNGRMTALEQSGVKVETSWAQNITAAD 226
      .|.|||.||...:..|.||. |:::  :|.|||. : .|....|
Atu2422_01      207  GLIIRQAADQGLKAKLVSGDGI VSN-ELASI--AGDAVEGT--LNTFGPD 251

Atu4243_01      227  SLVVPKGTKNKDAAMKFIALA-----TSAQAQADMATATGYAPV 265
      .:::|  :||:..|||.||..  .:| |. |. |. |. |
Atu2422_01      252  PTLRP---ENKELVEKFKAAAGFNPEAYTLYSYAAMQAIAGAAKAAG---- 294

Atu4243_01      266  NIESAKLMDPKIAKSLP-----DQQTESQVNADMNY-WAQHRDEIGE 306
      ::|..|:.....|. |  |:::.....| |...| |:
Atu2422_01      295  SVEPEKVAEALKKGSPFTALGEISFDEKGDPKLPGYVMYEWKKGPD--GK 342

Atu4243_01      307  RWYAWQAKHHHHHH      320
      ..|..|..| | | | |
Atu2422_01      343  FTYIQQSHHHHHHH      356

```

Figura 11. Alineamiento entre las dos secuencias de proteínas periplásmicas de unión Atu4243 (PDB: 4EUO) en color cian y Atu2422 (PDB: 3IP9) en color magenta. Generadas en EMBOSS Needle.

La búsqueda de secuencias de proteínas relacionadas con Atu4243 (en el dominio procarionte) sugirió que el sitio de unión de proteínas periplásmicas que unen a GABA en γ -proteobacteria es similar al de la proteína de Atu4243, ya que en el sitio de unión sólo difieren en un aminoácido, la Phe¹⁰¹ es reemplazada por la Tyr¹⁰¹ en

la proteína Atu4243 en el segundo bloque y en los otros dos bloques difieren en dos o más residuos. En este cladograma todas las proteínas poseen los dos residuos clave involucrados en la unión a GABA, incluyendo Arg²⁰³ y Asp²²⁶ (figura 12). Estas PBP's pertenecen a diferentes géneros de proteobacterias α, β y γ, tales como los patógenos animales y vegetales *Burkholderia* y *Pseudomonas syringae* y los simbiontes vegetales *Rhizobium sp* y *Sinorhizobium sp* (Planamente *et al.*, 2012).

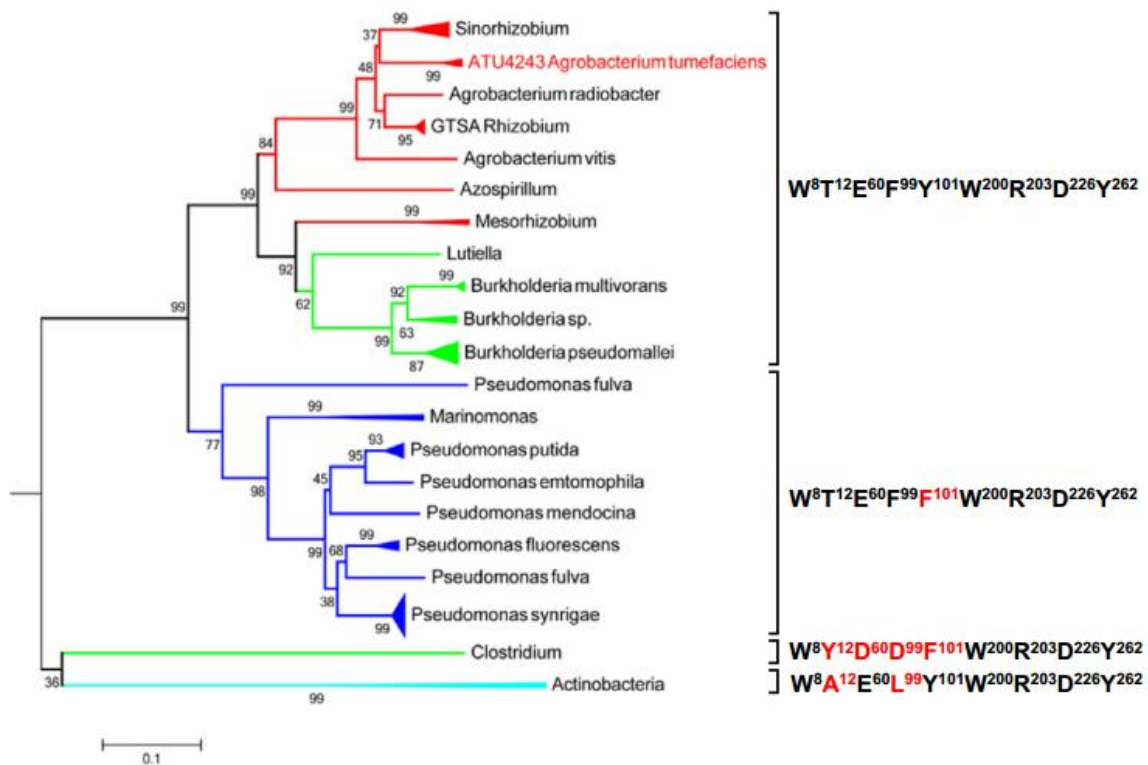


Figura 12. Cladograma de la relación de la proteína periplásmica Atu4243 conservando los residuos clave Trp⁸, Thr¹², Glu⁶⁰, Phe⁹⁹, Tyr¹⁰¹, Trp²⁰⁰, Arg²⁰³, Asp²²⁶ y Tyr²⁶². Mostrando un relación de 65 análogos de Atu4243 en diferentes especies bacterianas (Planamente *et al.*, 2012).

METODOLOGÍA ESPECTROSCÓPICA PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de DLS, también conocida como espectroscopia de correlación de fotones o de dispersión de luz cuasi-elástica, es una herramienta que permite determinar los coeficientes de difusión de traslación (D_t) de macromoléculas en suspensión. En una solución de macromoléculas, la concentración local de estas fluctúa continuamente debido a su movimiento browniano. De acuerdo a la primera ley de Fick, el valor de D_t se relaciona directamente con el gradiente de concentración del soluto distribuido en el solvente y este valor es inversamente proporcional al tamaño de la partícula, por lo que las moléculas de menor tamaño se desplazan más rápidamente que las de mayor tamaño. A partir de las mediciones de DLS es posible calcular el tamaño hidrodinámico de las partículas en solución, asumiendo la geometría simple de una esfera, y la polidispersidad de las especies presentes, por medio de la desviación estándar de los valores D_t .

La técnica de DLS ha sido utilizada ampliamente por más de medio siglo para monitorear fenómenos de agregación de proteínas en solución. Algunos ejemplos, incluyen el estudio de la influencia de varios factores en el estado de agregación, la detección de agregados indeseables en proteínas terapéuticas que puedan ocasionar algún tipo de respuesta inmunogénica durante su administración o la identificación de soluciones en la que las macromoléculas se mantienen monodispersas durante los procesos de nucleación y crecimiento de cristales de proteínas (Lorber *et al*, 2012).

Fluorescencia intrínseca

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado basal, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una vez excitada, la molécula pasará a un estado vibracional de menor energía. El fotón emitido por fluorescencia tiene menos energía que el absorbido, por lo tanto posee una frecuencia menor y emite a mayor longitud de onda (Skoog *et al*, 2006). Las proteínas muestran propiedades de fluorescencia intrínseca debido a los residuos aromáticos que las conforman. Cuando las proteínas interactúan con su ligando o con otras proteínas, ocurren rearrreglos locales que modifican la fluorescencia intrínseca, por lo que esta técnica permite estudiar las interacciones entre las proteínas y sus ligandos, ya que numerosas interacciones y procesos pueden alterar las propiedades espectrales de los residuos aromáticos de una proteína. También es posible adicionar fluoróforos extrínsecos a través de uniones covalentes para diseñar proteínas como sensores específicos a proteínas u otros ligandos. (Lakowicz, 2006). En el análisis de las macromoléculas por fluorescencia se utilizan dos tipos de compuestos fluorescentes, los extrínsecos, que son añadidos al sistema normalmente enlazados a alguno de sus componentes y los intrínsecos que están presentes en la propia macromolécula. En las proteínas existen solamente tres aminoácidos con propiedades de fluorescencia intrínseca: el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la fenilalanina (Phe). Se puede distinguir la fluorescencia entre cada uno de ellos por medio de la longitud de onda de excitación específica (λ_{exc}).

La fluorescencia de la tirosina suele ser demasiado débil debido a la excitación, ya que si está ionizada la fluorescencia resulta casi totalmente extinguida, al igual que si se halla cerca de un grupo amina, carboxilo o un triptófano. No obstante, puede detectarse excitando con luz de longitud de onda de 280nm para la tirosina y triptófano, sin embargo a una $\lambda_{exc}= 260$ nm se observa únicamente la contribución de las tirosinas y a una $\lambda_{exc}= 295$ nm se excitan principalmente los triptófanos. Esta técnica proporciona información sobre la conformación espacial de la proteína (Freifelder, 2003), es decir, que estos residuos pueden utilizarse para monitorear el plegamiento de una proteína debido a que sus propiedades de fluorescencia son dependientes del medio que los rodea. En estado nativo, los residuos de Trp y Tyr se encuentran generalmente dentro de la proteína en un ambiente predominantemente hidrofóbico, pero en el estado desplegado los residuos mencionados son expuestos hacia el solvente. Por lo que en un ambiente hidrofóbico, estos residuos poseen un mayor rendimiento cuántico, así como una mayor intensidad en la señal de fluorescencia y en un ambiente hidrofílico sus rendimientos cuánticos disminuyen, al igual que la señal de fluorescencia. El análisis comparativo de los espectros de emisión de este tipo de residuos aromáticos, pueden sugerir cambios terciarios específicos en las proteínas (Vivian, *et al.*, 2001).

Dicroísmo Circular

La asimetría estructural en una molécula da lugar a diferencias en la absorción de la luz polarizada en un plano formado por dos componentes reunidos circularmente a la derecha y a la izquierda, la medición de esta diferencia se llama espectroscopia

de dicroísmo circular (DC). Un espectro de DC es una representación de la diferencia de los coeficientes de absorción molar para la luz polarizada en ambos sentidos a una longitud de onda dada.

Las moléculas quirales (que carecen de ejes de rotación impropios), exhiben dicroísmo circular, es decir, tiene coeficientes de absorción diferentes para la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda a una longitud de onda dada.

En el caso de las proteínas se aprovecha la naturaleza quiral de los carbonos que conforman el esqueleto de la cadena polipeptídica, para el estudio de su estructura mediante esta técnica. Los espectros que se obtienen en la región UV lejana (190 - 250 nm) determina la composición de estructura secundaria mediante una serie de algoritmos; es posible utilizar los datos para obtener un estimado del porcentaje de hélice α , hebras β y giros presentes en la proteína, sin embargo también se pueden obtener espectros en la región de UV cercano (250 - 350 nm) de la radiación electromagnética, esta región determina la presencia de estructura terciaria. La forma y la magnitud del espectro de DC de la proteína en esta región depende del número y tipo de aminoácidos aromáticos presentes, de su movilidad, del microambiente que los rodea y de su disposición espacial, por lo que los espectros son un reflejo de la conformación global de la proteína. Las señales en la región de UV cercano son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación en una molécula.

En las proteínas, los cromóforos de interés incluyen el enlace peptídico (absorción <240 nm) en las cadenas laterales en presencia de aminoácidos aromáticos (rango de absorción 260 nm – 320 nm) y los enlaces disulfuro (bandas de débil absorción cerca de 260 nm) (Kelly, et al., 2005).

El enlace peptídico presenta señal de DC cuando se encuentra en un entorno plegado. La diferencia en los coeficientes de extinción molar para la luz polarizada en el plano izquierdo y derecho se representa como una función de la longitud de onda. Las conformaciones hélice α y hebras β tienen espectros de DC característicos (figura 13). Dado que las curvas son diferentes para cada una de las estructuras secundarias de una proteína, este espectro DC puede proporcionar una estimación aproximada de la fracción de dichas estructuras que contiene la proteína de interés. Utilizando espectros de DC se puede determinar si las proteínas están correctamente plegadas, estimar la fracción de la proteína que está plegada en cualquiera de las estructuras secundarias comunes y supervisar las transiciones entre los estados plegado y desplegado, en donde se puede utilizar a la proteína nativa como referencia para el estado plegado, ya que se le pueden hacer cambios en la condición de la solución en la que se encuentra y así observar los diferentes cambios conformacionales provocados por esta manipulación a su medio (Nelson, *et al.*, 2008).

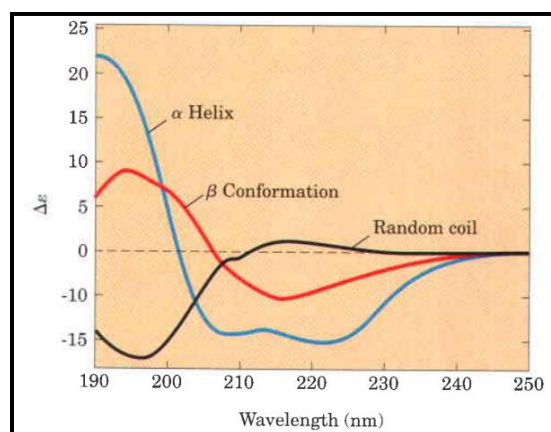


Figura 13. Las diferentes curvas del espectro de DC para las diferentes estructuras secundarias de las proteínas (Nelson, *et al.*, 2008)

HIPÓTESIS

Se asume que las proteínas periplásmicas de unión cambian de conformación desde un estado abierto a un estado cerrado en presencia de su ligando, entonces, la proteína periplásmica de unión "Atu4243", podría ser utilizada como biosensor si los cambios en la señal de fluorescencia intrínseca correlacionan con un incremento en la concentración de ligando.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Purificar la proteína Atu4243 y caracterizar la unión a GABA a través de los cambios en la fluorescencia intrínseca.

Objetivos particulares

- Sobreexpresar y establecer un protocolo de purificación para la proteína Atu4243.
- Determinar el radio hidrodinámico de la proteína Atu4243 utilizando las diferentes pruebas de desnaturalización con agentes químicos (urea y cloruro de guanidinio) por dispersión dinámica de luz.
- Caracterizar la unión de la proteína Atu4243 a su ligando determinando su K_d por fluorescencia intrínseca.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados son de la marca Sigma ®.

Gen de Atu4243

Las características generales de la proteína Atu4243 son que: contiene una secuencia de 320 residuos con un peso molecular de 35.110 KDa y cuenta con un punto isoeléctrico (pI) de 5.28. Se mandó a sintetizar el gen de Atu4243 (GenScript ®) no optimizado para *E. coli* con una etiqueta de 6 histidinas en su región amino-terminal para su posterior purificación a través de cromatografía de afinidad a níquel (figura 14).

1	CAT ATG GAT CTG GTT TTT TCC AGC TGG GGG GGA ACC ACG CAG GAC	45
1	His Met Asp Leu Val Phe Ser Ser Trp Gly Gly Thr Thr Gln Asp	15
46	GCC CAG AAG GCG GCC TGG GCT GAG AAA TTC ATG GTG GAA ACC GGC	90
16	Ala Gln Lys Ala Ala Trp Ala Glu Lys Phe Met Val Glu Thr Gly	30
91	ATC AAC GTG CTG CAG GAT GGC CCG ACC GAC TAT GGC AAG CTG AAA	135
31	Ile Asn Val Leu Gln Asp Gly Pro Thr Asp Tyr Gly Lys Leu Lys	45
136	GCC ATG GTC GAG GCA AAC GGC GTG ACA TGG GAT GTG GTC GAT GTC	180
46	Ala Met Val Glu Ala Asn Gly Val Thr Trp Asp Val Val Asp Val	60
181	GAA GGC GAC TAT GCC GCG CAG GCC GGC CCC AAG GGT CTG CTT GAA	225
61	Glu Gly Asp Tyr Ala Ala Gln Ala Gly Pro Lys Gly Leu Leu Glu	75
226	AAG CTG GAT TTC AGC GTC ATC GAC AAA ACG AAA CTC GAC CCT CGT	270
76	Lys Leu Asp Phe Ser Val Ile Asp Lys Thr Lys Leu Asp Pro Arg	90
271	TTC GTG ACG GAT TAT TCT GTC GGC AGC TTC TAT TAT TCC TTC GTC	315
91	Phe Val Thr Asp Tyr Ser Val Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe Val	105
316	ATC GGC TGC AAT GTC GAT TCA GTT TCT GCC TGC CCC AAG AGC TGG	360
106	Ile Gly Cys Asn Val Asp Ser Val Ser Ala Cys Pro Lys Ser Trp	120
361	GCC GAT CTC TTC GAT ACT GCT AAA TTT CCG GGC AAG CGC ACC TTC	405
121	Ala Asp Leu Phe Asp Thr Ala Lys Phe Pro Gly Lys Arg Thr Phe	135
406	TAC AAG TGG TCG GCA CCG GGT GTG ATC GAG GCA GCA CTT CTG GCC	450
136	Tyr Lys Trp Ser Ala Pro Gly Val Ile Glu Ala Ala Leu Leu Ala	150
451	GAC GGC GTT ACG GCC GAC AAG CTT TAT CCG CTT GAT CTC GAC CGT	495
151	Asp Gly Val Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Pro Leu Asp Leu Asp Arg	165

496	GCT TTC AAG AAG CTC GAC ACG ATC AAA TCC GAT ATC ATC TGG TGG	540
166	Ala Phe Lys Lys Leu Asp Thr Ile Lys Ser Asp Ile Ile Trp Trp	180
541	TCA GGC GGC GCG CAG TCG CAG CAG TTG ATC GCA TCC GCC GAA GCA	585
181	Ser Gly Gly Ala Gln Ser Gln Gln Leu Ile Ala Ser Ala Glu Ala	195
586	CCC TTC GGC AGC GTC TGG AAT GGC CGC ATG ACC GCT CTC GAG CAG	630
196	Pro Phe Gly Ser Val Trp Asn Gly Arg Met Thr Ala Leu Glu Gln	210
631	AGC GGC GTC AAG GTG GAG ACA TCC TGG GCG CAG AAT ATC ACT GCG	675
211	Ser Gly Val Lys Val Glu Thr Ser Trp Ala Gln Asn Ile Thr Ala	225
676	GCG GAT TCG CTC GTT GTC CCG AAG GGA ACG AAG AAC AAG GAT GCG	720
226	Ala Asp Ser Leu Val Val Pro Lys Gly Thr Lys Asn Lys Asp Ala	240
721	GCG ATG AAG TTC ATC GCC TTG GCG ACG TCC GCG CAG GCG CAG GCA	765
241	Ala Met Lys Phe Ile Ala Leu Ala Thr Ser Ala Gln Ala Gln Ala	255
766	GAT ATG GCG ACA GCG ACG GGT TAC GCC CCG GTC AAT ATC GAA TCC	810
256	Asp Met Ala Thr Ala Thr Gly Tyr Ala Pro Val Asn Ile Glu Ser	270
811	GCC AAG CTG ATG GAC CCG AAA ATT GCC AAA TCC CTG CCG GAC CAG	855
271	Ala Lys Leu Met Asp Pro Lys Ile Ala Lys Ser Leu Pro Asp Gln	285
856	CAG ACG GAA AGC CAG GTC AAT GCC GAC ATG AAC TAC TGG GCG CAG	900
286	Gln Thr Glu Ser Gln Val Asn Ala Asp Met Asn Tyr Trp Ala Gln	300
901	CAT CGC GAT GAA ATT GGC GAG CGC TGG TAC GCC TGG CAG GCA AAA	945
301	His Arg Asp Glu Ile Gly Glu Arg Trp Tyr Ala Trp Gln Ala Lys	315
946	CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA CGC GGA TCC	975
316	<u>His His His His His His</u> End Arg Gly Ser	325

Figura 14. Secuencia de nucleótidos separada por tripletes indicando la traducción en aminoácidos Programa DNA Strider (vr 1.59.1)

Para la sobreexpresión, el gen fue subclonado en un vector de clonación pET-3a (figura 15), este vector tiene resistencia al antibiótico de ampicilina, además de un sistema de expresión inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

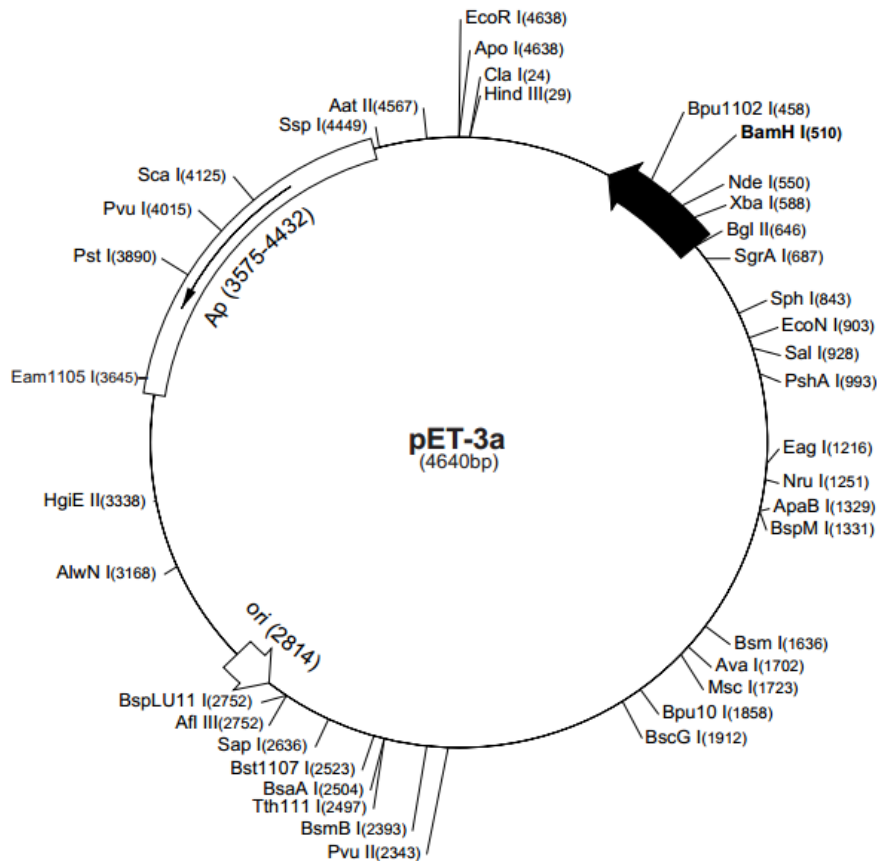


Figura 15. Mapa del vector pET-3a y sus sitios de restricción (Novagen).

Transformación de células quimio-competentes y electro-competentes

Para la transformación en las células quimio-competentes se colocaron 3 μ L de DNA de Atu4243 al fondo de un tubo tipo eppendorf, a continuación se agregaron 50 μ L de las células competentes de la cepa de *E.coli* BL21 A1 y se dejó incubando en hielo por 20 minutos. Después de incubación, se colocó el tubo eppendorf en baño María por 1 minuto a 42°C e inmediatamente se pasó a un recipiente con hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se le agregó 1 mL de medio súper óptimo (por sus siglas en inglés SOC) y se dejó incubando durante 1 hora a 37°C con agitación constante a 180 rpm para lograr la recuperación de las células. Para las

células electro-competentes se colocaron (120 ng/ μ L) de DNA en un micro-tubo junto con 50 μ L de las células competentes de la cepa de *E.coli* BL21 (DE3) pLysS y se dejó reposar en hielo por 20 minutos. Posteriormente se colocaron los 53 μ L de la células competentes con el DNA de la proteína Atu4243 en una cubeta de electroporación estéril de 0.2 cm y se colocó en un electroporador (Micropulser Electrporator™), programándolo para la descarga de un pulso de 2.50 kV para lograr el ingreso del DNA en las células competentes. Inmediatamente después se sacó el contenido de la cubeta de electroporación colocándolo en un tubo estéril y resuspendió con 1mL de medio SOC para después dejarlo incubando por 1 hora a 37°C en agitación constante. Para ambos métodos, después del tiempo de incubación se sembraron 50 μ L y 100 μ L de las células transformadas, en condiciones de esterilidad, en placas con medio Lysogenic-Broth (LB) + ampicilina 100 mg/mL, al terminar cada una de las placas se dejaron incubando a 37°C durante 12 horas.

Sobrexpresión de Atu4243

Una vez transformadas las células para la sobreexpresión de la proteína Atu4243, se tomó una colonia de cada una de las cepas y se inoculó en un matraz de 250 mL con 100 mL de medio de LB al cual se le agregó 100 μ L de ampicilina 100 mg/mL para la cepa de BL21 A1. En otro matraz de 250 mL, de igual forma se colocaron 100 mL de medio LB con 100 μ L de ampicilina 100 mg/mL para la cepa de BL21 (DE3) pLysS (ambas se dejaron en agitación a 180 rpm a 37°C durante 12 horas). Posteriormente, se inocularon en dos matraces de 2 L ambos con 1 L de medio LB

+ ampicilina 100 mg/mL. Se dejaron crecer los cultivos agitándose constantemente a 250 rpm a 37°C durante 2 horas aproximadamente hasta que éstos alcanzaron una densidad óptica (D.O.) de 0.7 ± 0.1 , medidos a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro DU7500 (Beckman Coulter). Después, al matraz con la cepa de BL21 A1 se le agregaron 2g de arabinosa y 0.098g (0.4 mM) de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido para la cepa de BL21 (DE3) pLysS y se mantuvieron en incubación durante 4 horas a 37°C para inducir la expresión de la proteína Atu4243. Al finalizar se tomó una muestra de 1mL en un tubo eppendorf para cada litro de cultivo. Después las células inducidas se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se conservó el precipitado guardándolo en refrigeración a 4°C.

Purificación de Atu4243

Las células inducidas de ambas cepas que previamente se guardaron en refrigeración se suspendieron en un amortiguador de sonicación (para más información ver material anexo) adicionado con inhibidor de proteasas (PMSF 0.2 mM diluido en DMSO). Las células se lisaron por sonicación en frío para el correcto rompimiento de las células y evitar que se desnaturalizara la proteína. Se le dieron 15 ciclos con una duración de 30 segundos con intervalos de 45 segundos de descanso y una amplitud de 35% en un Ultrasonic Processor (Cole Parmer ©). Se centrifugaron cada una de las diferentes cepas a 12000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se tomaron muestras de 1 mL de cada uno de los pasos anteriores con la

leyenda de E.T. (extracto total) para cada muestra sonicada, así como 1mL del sobrenadante con la leyenda de S.N. (sobrenadante).

Precipitación de la proteína Atu4243 con sulfato de amonio

Se tomó el sobrenadante de cada una de la cepas y se precipitó con los siguientes porcentajes de saturación: 20%, 45% y 80% de sulfato de amonio que se le agregaron a cada una de las muestras con la agitación en frío y se dejaron incubando por 12-16 horas en refrigeración a 4°C (mismo procedimiento con cada uno de los porcentajes de saturación). Al terminar el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm a 4°C durante 25 minutos, posteriormente la proteína se puso a dializar en membrana de celulosa (Sigma-Aldrich ©, D9652-100FT).

Desnaturalización de la proteína Atu4243 por urea y cloruro de guanidinio

Los precipitados de ambas cepas que fueron refrigerados, se suspendieron con amortiguador de fosfatos A (para más información ver material anexo) después se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos, a una temperatura 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se volvió a resuspender la pastilla del primer lavado con el amortiguador adicionando el desnaturalizante con urea a una concentración de 5 M a un pH 7.7. Se dejó incubando en hielo durante 60 minutos. Al finalizar, se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 20°C y se recuperó el sobrenadante, tomando en cuenta que ya no se observara turbio, una

vez teniendo un sobrenadante claro se recuperó y se descartó la pastilla. Se utilizó el mismo procedimiento de desnaturalización para el amortiguador de fosfatos A (para más información ver material anexo) pero adicionando 5 M de cloruro de guanidinio.

Purificación de Atu4243 por cromatografía de columna de afinidad a níquel

La purificación de todas las muestras de la proteína se concentraron a un volumen de 10 mL y se filtraron con una membrana de 0.45 µm (Millex® HV) antes de pasarlo a una columna de afinidad a níquel (HisTrap® HP) acoplada a un sistema de FPLC (GE®). Este sistema está conectado a una computadora controlado por el programa de cómputo *Unicorn 3.1*. Se equilibró la columna con el amortiguador de fosfatos B (para más información ver material anexo). La proteína se eluyó con un gradiente de 80 mL de amortiguador de fosfatos C (para más información ver material anexo). Las fracciones correspondientes al pico de absorbancia durante el transcurso del gradiente, fueron colectadas, así como el frente de elución para verificar que no se perdiera proteína en este paso de la purificación. Se repitió este procedimiento para las siguientes muestras de proteína con la columna de afinidad a níquel anteriormente lavada y equilibrada.

Se dializaron las muestras utilizando una membrana de celulosa en un amortiguador de fosfatos A (para más información ver material anexo) durante 12-16 horas a una temperatura de 4°C, para retirar el imidazol de las muestras. Al finalizar el tiempo de la diálisis se concentraron las muestras con centricones (Millipore) hasta un

volumen final de 5mL para posteriormente medir su unión al ligando. Todos los pasos de la purificación se siguieron mediante un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS), incluyendo las muestras de expresión e inducción para verificar la banda de la proteína Atu4243.

Cuantificación de proteína Atu4243

Una vez que se obtuvo la proteína dializada pura y filtrada. La proteína fue cuantificada por su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop2000 (Thermo Scientific ©); tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar de la proteína Atu4243 que es de 80900 (ϵ_{280}) y el peso molecular (PM) de 35.114 KDa (<https://www.expasy.org/tools/>), obteniendo una concentración en el sobrenadante de 0.626 mg mL⁻¹ y de las muestras desnaturalizadas con urea se obtuvo una concentración de 0.522 mg mL⁻¹ y con cloruro de guanidinio se obtuvo una concentración de 2.628 mg mL⁻¹.

Electroforesis

Toda proteína tiene un pH característico, denominado punto isoeléctrico, en el que éste no tiene una carga neta y por ello no se mueve en un campo eléctrico. En el enfoque isoeléctrico, las proteínas son sometidas a electroforesis en un estrecho tubo de gel de poliacrilamida en el que se establece un gradiente de pH mediante una mezcla de amortiguadores. Cada proteína se mueve hacia un punto en el gradiente y esto difiere al tomar en cuenta el punto isoeléctrico (Alberts, 2004).

Una alícuota de todas las muestras de la proteína Atu4243 que fueron guardadas con el fin de correr un gel SDS-PAGE para el cual se prepararon las muestras en tubos de 0.5 mL, se mezclaron hasta quedar homogéneas y se pusieron en baño María durante 10 minutos. Se preparó el gel de poliacrilamida al 12% en la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida (para más información ver material anexo), a continuación se cargaron 10 μ L en cada uno de los pozos del gel para cada una de las diferentes muestras, se cerró la cámara de electroforesis y se procedió a conectarla a la fuente de poder que se corrió a un voltaje de 100 mV. Cuando el frente de elución con el colorante salió, se procedió a teñir el gel con la solución teñidora (azul brillante R-250), después el gel se metió a una solución desteñidora (revisar anexo) para quitar el exceso de colorante.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

Se empleó esta técnica con el fin de identificar la composición del amortiguador que permitiera mantener a la proteína en ausencia de agregación y verificar qué componente del amortiguador o del mismo protocolo de expresión y purificación causaba esto. Se procedió a la preparación de las muestras con una concentración final en la celda de 0.1 mg/mL con amortiguador de fosfatos A, después se filtraron cada una de las muestras incluyendo el blanco (amortiguador) con filtros de 22 μ m (Millex[®] HV) y se midieron en el equipo Zetasizer μ V[®] (Malvern). Se comenzó a medir cada una de las diferentes muestras de la proteína a una temperatura de 20°C con 10 repeticiones cada una.

Fluorescencia intrínseca

El fin de emplear esta técnica fue para verificar que la proteína después de los pasos de la purificación pudiera unir a su ligando GABA. La medición de fluorescencia intrínseca (FI) se realizó en un espectrofluorómetro PC1 (ISS©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para controlar la temperatura. Para estos experimentos se filtraron cada una de las diferentes muestras con una membrana de 0.45 µm (Millex ® HV), para evitar cualquier tipo de partículas microscópicas que pudiera afectar la medición. Se utilizó una concentración de la proteína de 0.1 mg mL⁻¹ y un amortiguador de fosfatos A. La temperatura de medición fue de 25°C y se empleó una celda de cuarzo de 0.5 cm x 0.5 cm, posteriormente se acomodaron las rejillas (*slits*) de paso de luz, las utilizadas fueron de 1mm para la de emisión y 0.5mm para la de excitación. Se excitó a una longitud de $\lambda_{exc}= 295$ nm y la longitud de emisión $\lambda_{em}= 310$ nm – 450 nm, monitoreando la intensidad de la fluorescencia cada 1 nm. Para la titulación se hizo un *stock* de ligando GABA 2 mM más el amortiguador Tris (para más información ver material anexo) el cual se fue adicionando en gradiente de una concentración inicial de 0.04 mM a una concentración final de 1.28 mM. Las mediciones de dicha titulación se emplearon para obtener la k_d experimental de la proteína Au4243 con su ligando GABA.

Para obtener la K_d experimental se utilizó la ecuación (1) de unión derivada de la forma hiperbólica en donde ΔF_o , es el cambio inicial en la fluorescencia, ΔF_{max} es el cambio máximo en la fluorescencia, “s” es sustrato y K_d es la constante de disociación:

$$\Delta F_o = \frac{\Delta F_{max} * s}{K_d + s}$$

El centro de masa espectral (CME) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$CME = \frac{\sum \lambda I \lambda}{\sum I \lambda}$$

En donde, I_{λ} es la intensidad de fluorescencia para cada longitud de onda (λ)

Dicroísmo circular

Los experimentos de dicroísmo circular (DC) y desnaturalización por temperatura de la proteína Atu4243 de cada una de las diferentes muestras se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience®) para el control de la temperatura. Las muestras con la proteína Atu4243 se manejaron a una concentración de 0.1 mg/mL en una celda de cuarzo de 0.1 cm, en un amortiguador A (para más información ver material anexo) a una temperatura de 25°C. Se obtuvieron espectros de DC de la proteína nativa y desnaturalizada para observar el cambio en la señal provocado por el aumento de temperatura gradual que fue de los 20°C a los 90°C; para evitar la evaporación la celda de cuarzo se selló con Parafilm® y se corrió a una velocidad de barrido de 180K/hr obteniendo los espectros en un rango de longitud de onda de 190 nm a 250 nm.

Estudio de proteínas homólogas de Atu4243

Para la construcción del árbol filogenético se buscaron secuencias homólogas de la proteína Atu4243 (PDB 4EQ7/4EUO). Se trabajó con la secuencia eliminando la cola de histidinas de la secuencia (las secuencias se obtuvieron de

<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Se procedió a la búsqueda por la opción blastp en línea de la página UniProt (<http://www.uniprot.org/>) en una base de datos con redundancia al 90%, UniRef90. Las condiciones en la cual se llevó a cabo la búsqueda fueron las siguientes: un valor límite de probabilidad (E) no mayor a 0.001 (*threshold*), se utilizó la matriz de sustitución matriz BLOSUM-62, y no más de 1000 resultados. También se realizó una búsqueda blastp en línea desde NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la base de datos no redundante (nr) en el cual si se obtuvieron coincidencias. Las condiciones de búsqueda fueron las siguientes: no hubiera más 1000 resultados, valor límite de probabilidad (E) no mayor a 0.001 (*threshold*), número de caracteres en la ventana de búsqueda fue de 6, en una matriz de sustitución BLOSUM-62. Para la depuración de secuencias, se realizó una primera fase por tamaño de las secuencias, para quedarnos únicamente con las secuencias que cubrieran la longitud de la secuencia de referencia de la proteína Atu4243 (4EQ7/ 4EUO), y un 10% más, es decir, menos de 314 aminoácidos y mayores a 345 aminoácidos, por lo que todas las secuencias que sobrepasaran los 345 aminoácidos fueron eliminadas.

Con el objetivo de reducir el número de secuencias y seguir con la depuración se aplicó CD-HIT, que agrupa por redundancia y disminuye el número de las mismas de acuerdo a su similitud. CD-HIT elige una secuencia representante y todas las demás que se le parezcan a esta secuencia en más del 90% se eliminan en este caso. Se realizaron los alineamientos con el programa PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>), para ello los archivos en formato FASTA se transformaron en formato Phylip. Se hizo una primera corrida utilizando la opción de “*Automatic Model Selection*” de PhyML con el fin de determinar qué

modelo de sustitución de amino ácidos era el mejor de acuerdo al conjunto de secuencias. En menos de 30 minutos se obtuvo el árbol y se sometió a una segunda corrida utilizando nuevamente la estrategia “*Automatic Model Selection*” con 100 bootstraps para dar soporte a los nodos y validez al árbol. Por último el árbol se visualizó y coloreo en Figtree (<http://beast.community/figtree>).

RESULTADOS

Expresión y purificación de Atu4243

Las condiciones iniciales del protocolo que se siguieron para sobreexpresar y purificar la proteína están basadas en la producción de una proteína con colas de histidina en su extremo carboxilo terminal. Este artículo describe el protocolo de purificación la proteína Atu4243, en donde utilizan el vector pET9a modificado, el cual denominan pET9aSN1, en una cepa de *E. coli* llamada Rosetta 2 pLysS (Planamente, *et al.* 2012). En nuestro caso utilizamos un vector pET3a y diferentes cepas variantes de BL21 (DE3). Al seguir este protocolo se observó que la proteína Atu4243 se expresó en forma de cuerpos de inclusión y no se obtuvo en la fracción soluble. Por lo tanto se buscó un protocolo más viable para la sobreexpresión y purificación de la proteína Atu4243. Para esto, primero se probaron diferentes cepas de *E. coli*, para la transformación en las células competentes, posteriormente se probaron diferentes tiempos de incubación (3hrs, 6hrs y 12hrs) y temperaturas durante la inducción de la proteína (37°C, 30°C y 25°C). Se encontró que La mejor sobreexpresión fue en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Se realizó el protocolo de transformación para células electro-competentes, después se llevó a cabo el crecimiento bacteriano en el medio LB + ampicilina (100 µg/mL) hasta llegar a una D.O. de 0.7 ± 0.1 a una longitud de onda de 600 nm. Se indujo la expresión de la proteína con de 0.4mM de IPTG a de 37°C durante 3 horas, no se observó ningún cambio significativo en el nivel de expresión de la proteína al modificar la temperatura y aumentar las horas de inducción, sin embargo la proteína se encontró en forma de cuerpos de inclusión, en la fracción no soluble.

Se realizó una modificación añadiendo un amortiguador con L-arginina (150 mM) durante la sonicación en frío, del cual se obtuvieron los perfiles electroforéticos SDS-PAGE al 12% de la proteína Atu4243 (figura 16 y 17). Se observó que no se presenta ninguna banda soluble del tamaño de la proteína en ausencia de L-arginina (figura 16, el último carril, S.N.). Por otra parte en presencia de arginina se obtuvo una fracción soluble de la proteína, aunque la mayor parte se encontró en forma insoluble (figura 17).

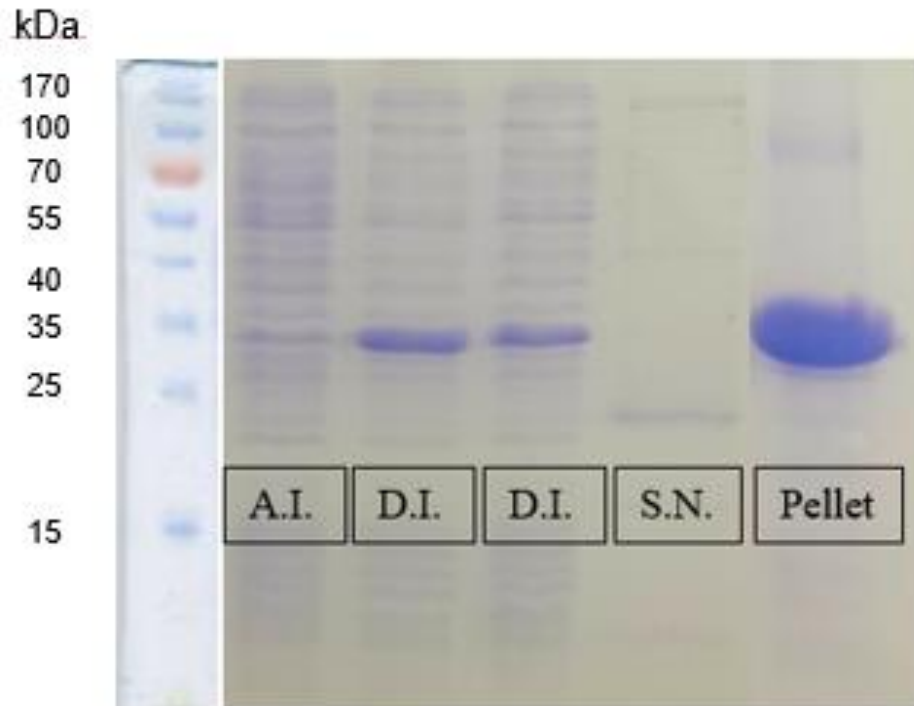


Figura 16. Perfil electroforético SDS-PAGE de la proteína Atu4243 (sin utilizar el amortiguador con arginina), con una banda correspondiente a un peso de 35 kDa, en los diferentes pasos de sobreexpresión: la muestra antes de inducir (A.I.), la muestra después de inducir con IPTG (D.I.), la proteína total después de sonicar (diluida 1:10 veces: E.C.), la proteína total en forma no soluble (botón después de centrifugación, *pellet*) y la forma soluble (S.N.).

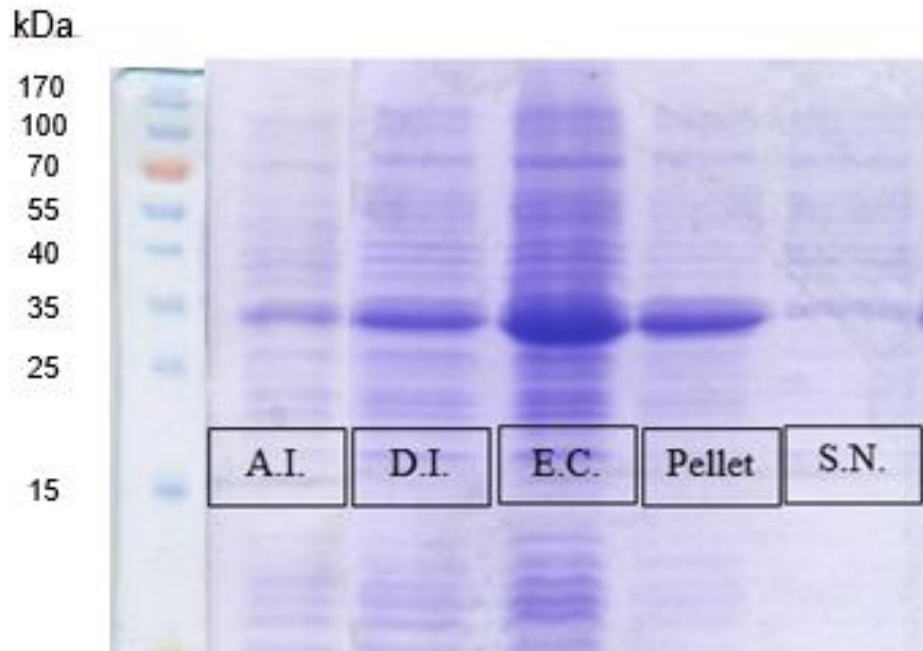


Figura 17. Perfil electroforético SDS-PAGE de la proteína Atu4243 (utilizando amortiguador con arginina), con una banda correspondiente a un peso de 35 KDa, en los diferentes pasos de sobreexpresión: la muestra antes de inducir (A.I.), la muestra después de inducir con IPTG (D.I.), la proteína total después de sonicar (diluida 1:10 veces: E.C.), la proteína total en forma no soluble (botón después de centrifugación, *pellet*) y la forma soluble (S.N.).

En un intento por recuperar la proteína de los cuerpos de inclusión se desnaturizó y renaturalizó la fracción no soluble. Las pastillas se colocaron en las dos diferentes condiciones desnaturizantes, ya descritas en el método, se dializaron para su posterior purificación por medio de cromatografía de afinidad a níquel. También se purificó la proteína soluble del sobrenadante.

Purificación de Atu4243

En la figura 18 se muestra el perfil cromatográfico de la purificación de la proteína en su forma soluble y de las proteínas renaturalizadas, después de desnaturizar con Urea y GndCl. En las tres condiciones la primera parte de la elución se desechó

porque las proteínas observadas en el gel de poliacrilamida no corresponden a los 35 kDa de la proteína de interés (este pico no se observa en el cromatograma). A un volumen de elución de 50mL se observa un solo pico que al correr esta fracción en el gel de poliacrilamida se observó la banda que corresponde a 35 kDa, en las tres condiciones indicadas.

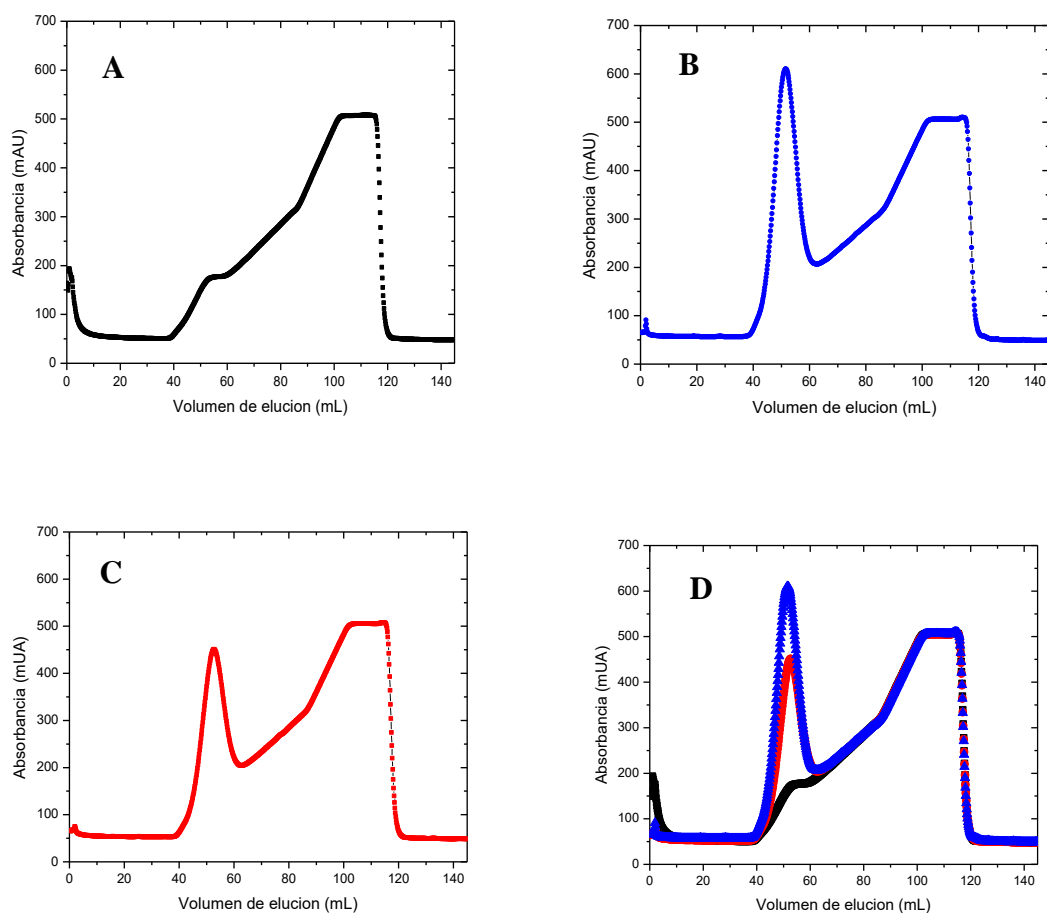


Figura 18. Se muestran los cromatogramas de la purificación de la proteína Atu4243 después de la columna acopladas a un equipo FPLC ÄKTA, en condiciones descritas en el método. A) Proteína obtenida del sobrenadante; B) Proteína desnaturalizada con Urea 5 M para obtener la proteína de cuerpos de inclusión (previamente dializada); C) Proteína desnaturalizada para obtener la proteína de cuerpos de inclusión con GndCl 5 M (previamente dializada) y D) Comparación entre los picos de absorbancia de la misma proteína en las diferentes condiciones.

Para verificar la pureza de la proteína, así como para confirmar que la proteína del sobrenadante no se hubiese pasado en el frente de elución, se corrió un gel de poliacrilamida, donde se colocaron las muestras de las diferentes fracciones que se recolectaron después de la corrida cromatográfica (figura 19). También se recolectaron las fracciones de la proteína que se desnaturalizó con ambos agentes, se procedió a concentrar todas las muestras y se corrió un gel para verificar la presencia de la proteína, así como su pureza de ésta (figura 20).

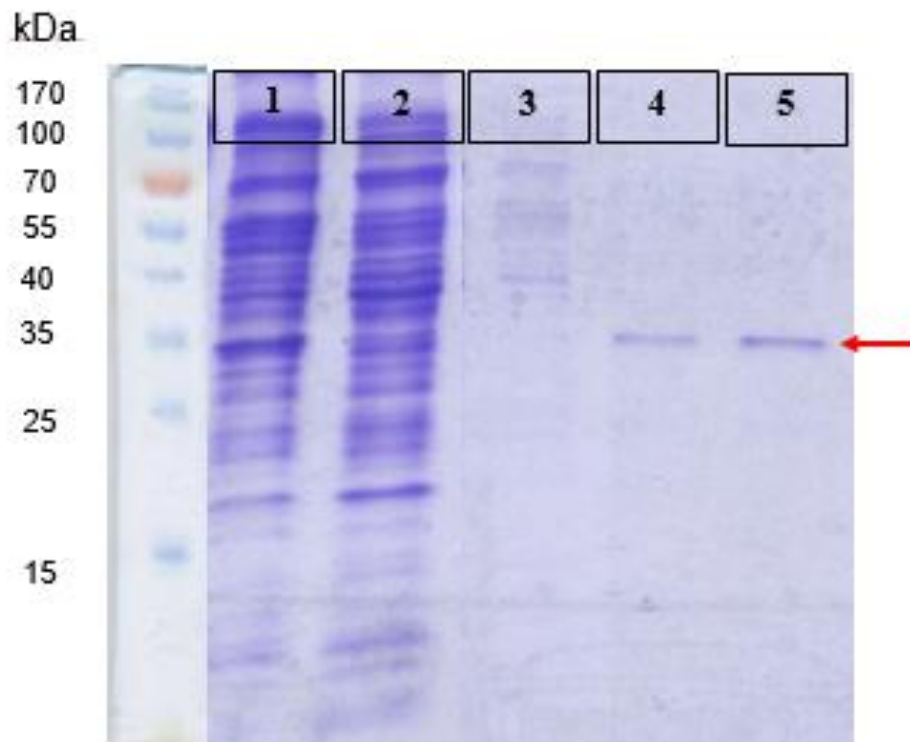


Figura 19. En el perfil electroforético SDS-PAGE de la purificación de Atu4243 se observa que en los carriles de izquierda a derecha lo siguiente: la banda de la proteína antes de pasar por la columna de purificación (1); Frente de elución (2); Fracción de desecho durante toda la corrida (3); En los últimos carriles (4, 5) se observaron las fracciones de la proteína soluble purificada a una concentración de gradiente de imidazol 500 mM al 26.5%.

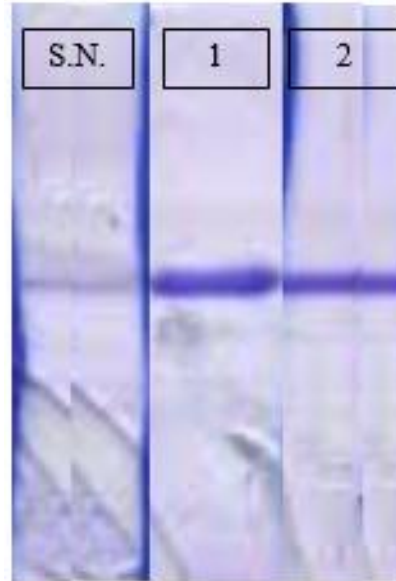


Figura 20. Perfil electroforético SDS-PAGE de muestras de Atu4243 después de concentrar. En el primer carril se aprecia la proteína pura extraída del sobrenadante (S.N.); en el siguiente carril la muestra de proteína pura desnaturizada con GndCl 5 M y renaturalizada (1) y en el último carril la muestra de proteína pura desnaturizada con urea 5 M y renaturalizada (2).

Cuantificación de proteína Atu4243

La cuantificación de la proteína se determinó por su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop2000 (Thermo Scientific©) con los datos obtenidos se realizó la siguiente tabla:

Tabla 1. Cuantificación de la proteína Atu4243 en sus diferentes métodos de obtención.

Atu4243	Volumen obtenido (mL)	Concentración mg mL ⁻¹	Rendimiento mg L ⁻¹
Silvestre(Soluble) pura	5	0.626	3.13
Desnaturalizada urea 5 M y renaturalizada pura	5	0.522	2.61
Desnaturalizada GndCl 5 M y renaturalizada pura	5	2.628	13.14

Dispersión dinámica de Luz

Para verificar la homogeneidad de las muestras obtenidas, éstas se estudiaron por dispersión dinámica de luz. Los parámetros de tamaño que puede medir el DLS van de 0.3 nm a 0.5 μm y el tamaño esperado de nuestra muestra es de aproximadamente 5.9 a 6.2 nm, por lo que a pesar de que la proteína de interés es pequeña, el equipo alcanzó a medir su tamaño. Cada una de las muestras se midió en el amortiguador de fosfatos A (para más información ver material anexo); al analizar los espectros de la primera muestra (proteína soluble) se observó que tiene un tamaño de $6.7 \text{ nm} \pm 0.8$ (figura 21-A), lo que corresponde con la medida que se obtuvo de la medición del radio hidrodinámico con el programa PyMol a partir de la estructura cristalográfica de la proteína Atu4243 (PDB: 4EUO) de aproximadamente 5.9 a 6.2 nm.

La segunda prueba se realizó tomando en cuenta que la proteína Atu4243 fue previamente desnaturalizada con urea 5 M y renaturalizada. Al analizar los espectros se apreció que el tamaño de la proteína fue de $8.7 \text{ nm} \pm 2.8$ (figura 21-B). La tercera fue previamente desnaturalizada con GndCl 5 M y renaturalizada, al analizar los espectros se observó que el tamaño de la proteína fue de $11.7 \text{ nm} \pm 3.5$ (figura 21-C) y por último, la muestra que contenía el ligando GABA (figura 21-D), en el cual se observó que los datos de la proteína es de $47. \pm 10.9 \text{ nm}$ (tabla 2).

Es decir, los diferentes valores obtenidos en las muestras descritas anteriormente indican que a pesar de que la muestra soluble y las renaturalizadas presentaron un tamaño cercano al medido por la estructura cristalográfica en comparación con la muestra que unió al ligando se presentó un aumento en el tamaño posiblemente por

agregación y la lectura de la última muestra presentó mucha irregularidad en tamaño en comparación con las anteriores, esto se puede explicar debido a que afecta el cambio conformacional y que probablemente se agregue la proteína en cuanto se une al ligando.

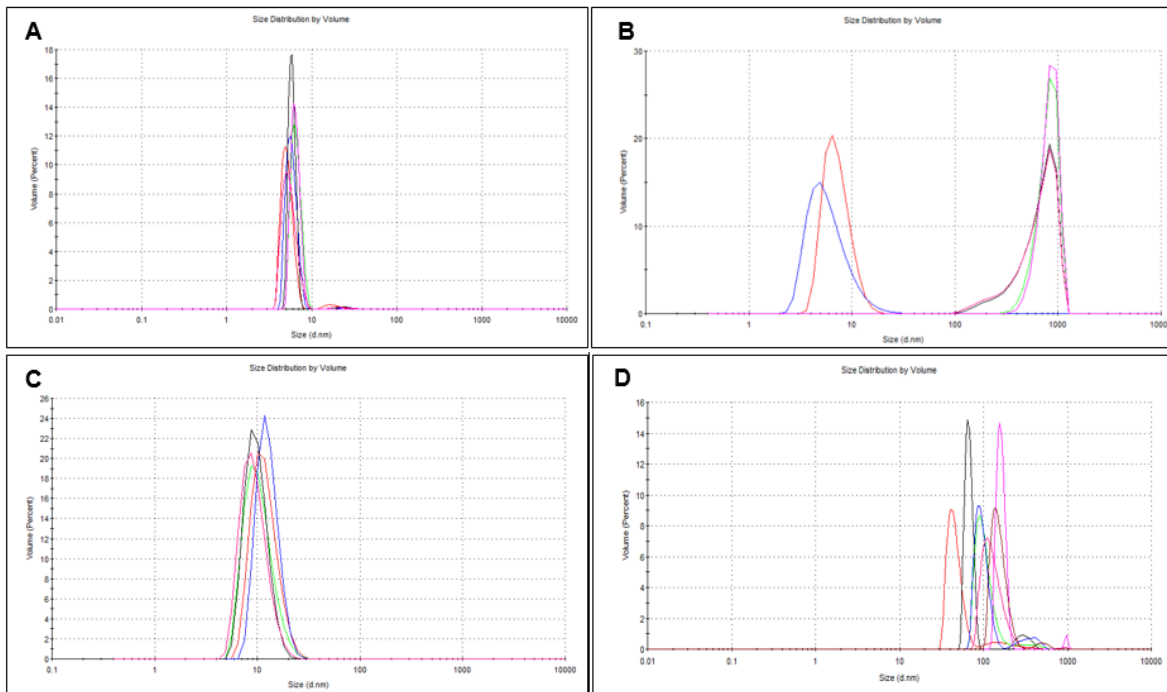


Figura 21. Comparación de los gráficos medidos por DLS de las diferentes muestras de la proteína Atu4243. A) Muestra soluble de la proteína Atu4243. B) Muestra desnaturalizada con urea 5 M y renaturalizada. C) Se observa la muestra desnaturalizada con GndCl 5 M no hay tanta irregularidad en los tamaños de la muestra. D) La muestra con la proteína Atu4243 con el ligando GABA.

También se obtuvo un porcentaje en masa de polidispersidad (Pd) que sirve como referencia para saber si una muestra es monodispersa o polidispersa. Un Pd menor al 20% nos indica que se trata de una muestra monodispersa por lo que se concluye que ésta es homogénea.

Tabla 2. Comparativo del radio hidrodinámico entre las diferentes condiciones en las que se trató la proteína al momento de la purificación y se muestran datos obtenidos de las mediciones en el DLS.

Atu4243	Diámetro (nm)	%Pd	% Masa	%Intensidad
Silvestre (Soluble)	6.7 ±0.8	14.3 ± 3.5	99.7 ±0.3	10.9 ± 4.8
Desnaturalizada urea 5 M y renaturalizada	8.7 ± 2.8	38.7 ± 11.5	100	50 ± 20.3
Desnaturalizada GndCl 5 M y renaturalizada	11.7± 3.5	25.4 ± 6.1	100	100
Silvestre (Soluble) con ligando	47± 10.9	30 ± 12.2	90.8 ±9.2	50 ± 54.4

En los datos obtenidos se observó que la proteína soluble tiene un % Pd de 14 % indicándonos que la muestra es homogénea y un porcentaje en masa mayor al 99%, es decir que toda la muestra presenta un mismo tamaño lo que sugiere que la mayor cantidad es la proteína Atu4243. La muestra desnaturalizada con urea 5 M y renaturalizada, así como la desnaturalizada con GndCl 5 M y renaturalizada presentaron un 39 % y 25 % Pd respectivamente, ambas con un Pd mayor al 20% indicándonos heterogeneidad en las muestras, es decir, que no todo lo que se midió es la proteína soluble solamente, sino que comienza a tener un grado de agregación que posiblemente se deba por la desnaturalización previa que sufrió la proteína. La muestra de la proteína con el ligando presentó un Pd de 30%, lo cual nos indicó que

es una muestra heterogénea, ya que no sólo está la proteína Atu4243 sino que también se encontró la proteína que ya estaba unida al ligando.

Espectroscopia de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243 con GABA

Se hicieron varias pruebas para observar cambios en la fluorescencia intrínseca con la proteína soluble. El primer ensayo se hizo con la proteína Atu4243 soluble en un amortiguador Tris (para más información ver material anexo) y el segundo ensayo se realizó con la proteína Atu4243 en un amortiguador Tris sin arginina (se dializó la muestra para retirar la arginina). Se obtuvieron los espectros de fluorescencia en ausencia y presencia de GABA, sin normalizar (figura 22) y normalizado para observar posibles cambios en la forma del espectro (figura 23). En la tabla 3 se muestran los parámetros obtenidos de los experimentos de fluorescencia intrínseca con la proteína en su estado nativo y sin arginina. Se observó un apagamiento de la fluorescencia intrínseca en presencia de GABA de la forma soluble.

Tabla 3. Parámetros de los espectros de emisión de la proteína Atu4243

Proteína Atu4243	Número de triptófanos (n)	λ_{\max} de emisión (nm)	Centro de Masa Espectral (CEM) (nm)
Silvestre (Soluble)	12	332	340.44
Silvestre (Soluble) con ligando	12	328	340.33
Silvestre (Soluble) sin arginina	12	303	339.24
Silvestre (Soluble) con ligando sin arginina	12	325	346.35

La proteína Atu4243 silvestre presenta un máximo de emisión cercano a 330 nm, el cual es un indicativo de que los triptófanos se encuentran en el solvente en un

ambiente hidrofóbico. Sin embargo, la muestra de proteína a la cual se le retira la arginina disminuye su máximo de emisión pudiendo indicar que dicha muestra tiene un cambio en su estructura.

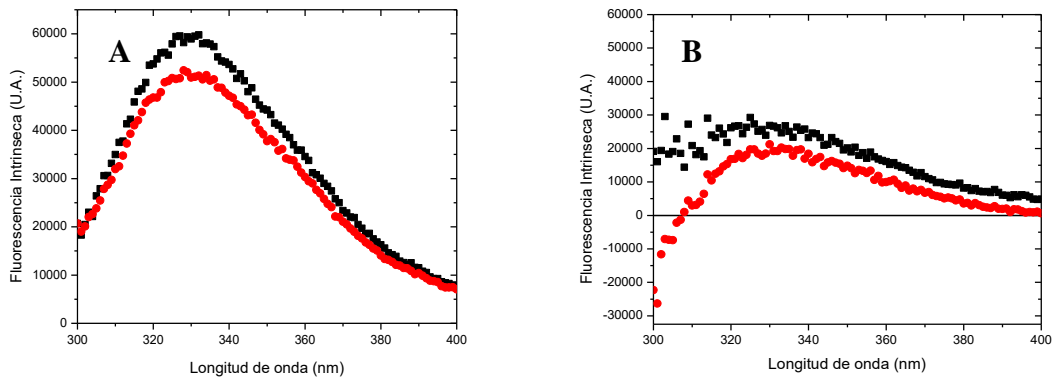


Figura 22. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243. La proteína soluble en ausencia de GABA (■) y en presencia de GABA (●). A) Espectro de fluorescencia con la proteína (soluble) y el amortiguador con L-Arginina. B) Espectro de fluorescencia con la proteína y el amortiguador sin la L-Arginina obteniendo valores negativos (datos sin normalizar).

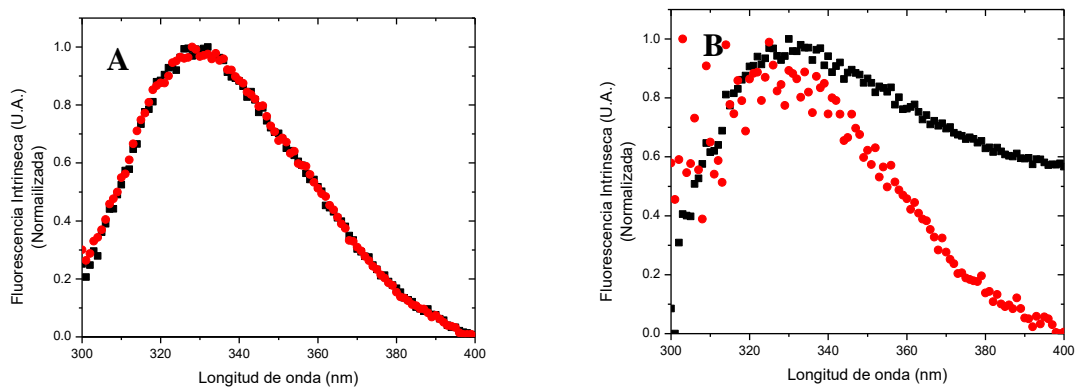


Figura 23. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243. La proteína soluble en ausencia de GABA (■) y en presencia de GABA (●). A) Espectro de fluorescencia con la proteína (soluble) y el amortiguador con L-Arginina. B) Espectro de fluorescencia con la proteína (soluble) y el amortiguador sin la L-Arginina (datos normalizados).

Se estudió el efecto que tiene la renaturalización de la proteína en la capacidad de obtener una muestra homogénea, ya que aparentemente esto podría afectar su capacidad de unión. Para ello se colectaron los espectros de la proteína Atu4243

pura, en un amortiguador Tris. Las muestras desnaturalizadas con urea y GndCl a una concentración de 5 M y renaturalizadas (figuras 24 y 25). No se observó un cambio en la fluorescencia intrínseca de la proteína desnaturalizada con urea y posteriormente renaturalizada, sin embargo para la proteína renaturalizada después de añadir GndCl se observó un pequeño apagamiento de la fluorescencia.

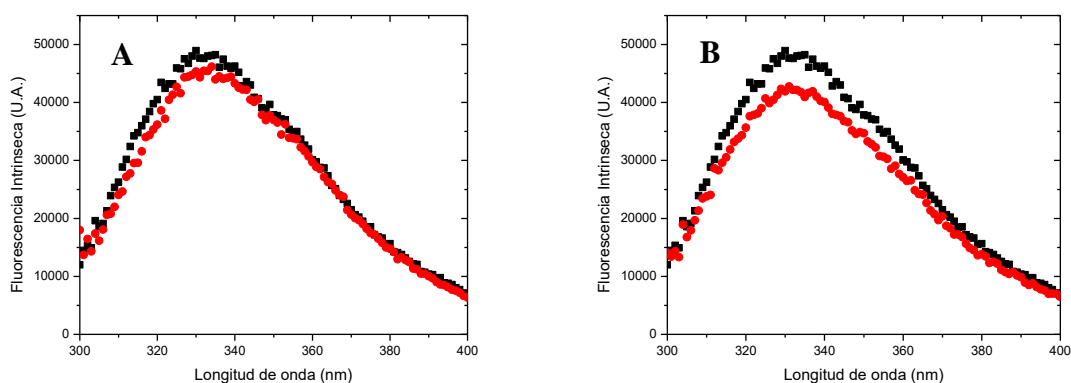


Figura 24. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243. La proteína (extraída de cuerpos de inclusión) en ausencia de GABA (■) y en presencia de GABA (●). A) Espectro de fluorescencia con la proteína desnaturalizada con urea 5 M y posteriormente renaturalizada. B) Se observa el espectro de fluorescencia con la proteína (extraída cuerpos de inclusión) desnaturalizada con GndCl 5 M y posteriormente renaturalizada (datos sin normalizar).

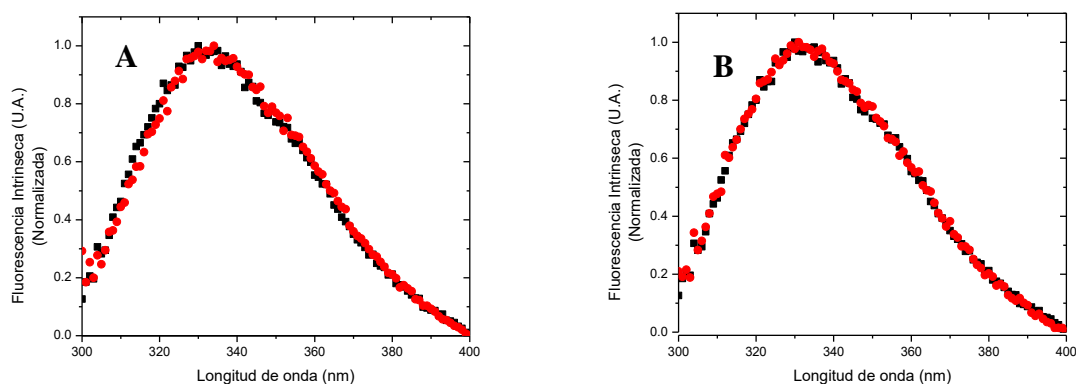


Figura 25. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína Atu4243. La proteína (extraída de cuerpos de inclusión) en ausencia de GABA (■) y en presencia de GABA (●). A) Espectro de fluorescencia con la proteína desnaturalizada con urea 5 M y posteriormente renaturalizada. B) Se

observa el espectro de fluorescencia con la proteína (extraída cuerpos de inclusión) desnaturalizada con GndCl 5 M y posteriormente renaturalizada (datos normalizados).

Correlación entre el cambio de la fluorescencia intrínseca y la concentración de GABA

Se tituló la proteína diversas concentraciones de GABA. Utilizando la proteína que se extrajo del sobrenadante, al ser la muestra que no se renaturalizó por lo que presenta menos manipulación que pudiera modificar su estructura, posteriormente se colectaron los espectros de fluorescencia (figura 26), en los cuales se observó que la forma del espectro se conservó dando como resultado un apagamiento de la fluorescencia, conforme se adicionó el ligando. Los datos de la curva de titulación se suavizaron para eliminar ruido con el *software* de análisis del espectrofluorómetro PC1-ISS (Urbana, Champaign, Illinois, USA).

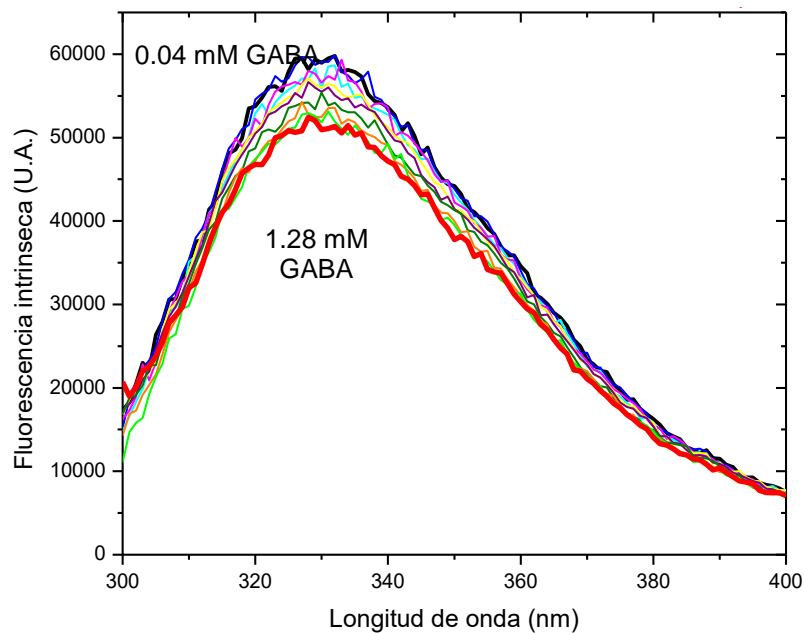


Figura 26. Espectro de fluorescencia intrínseca de la titulación de la proteína Atu4243 la franja de color negro con ligando GABA con una longitud de excitación de 295nm, de una concentración de ligando de 0.04 mM a 1.28 mM.

Se tomó el ΔF (cambio de fluorescencia en presencia de GABA con respecto a la basal) a las diversas concentraciones de GABA a una longitud de onda de 330 nm y se regraficaron los datos en función de la concentración de GABA (figura 27). Los cambios en la intensidad de la fluorescencia de la proteína renaturalizada de GndCl, fueron menores y más ruidosos que los de la proteína soluble, por lo que no se tomaron en cuenta.

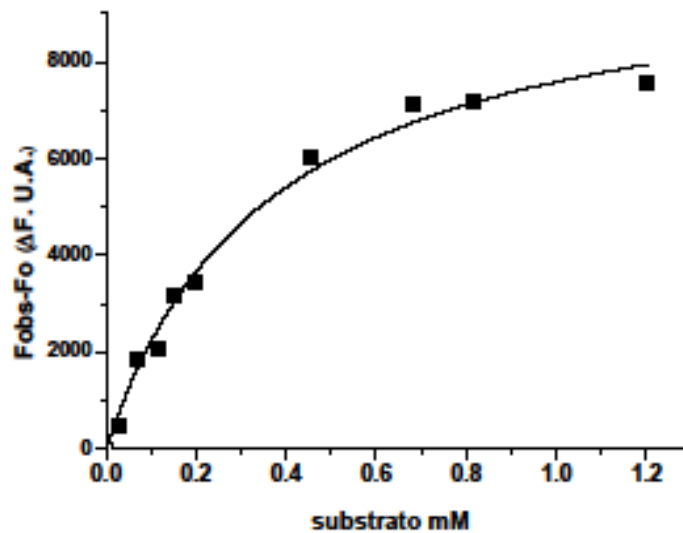


Figura 27. Gráfico de la proteína Atu4243 en el cual se representa el ajuste a un modelo de un sitio de unión (ecuación 1 en la parte de material y métodos), en el cual el sustrato es GABA.

Estos datos se ajustaron a la ecuación de unión (material y métodos), donde se obtuvo una K_d de 0.36 ± 0.04 mM. Sin embargo, la K_d que se encontró reportada en la literatura (Planamente, *et al.*, 2012) que tiene un valor de 0.009 ± 0.002 mM. Los cambios de afinidad en la unión de GABA para la proteína purificada con respecto a los valores reportados, pueden deberse a un sitio de unión ocupado con arginina o bien a pérdida de estabilidad de la proteína.

Dicroísmo circular

Para estudiar la estabilidad y/o cambios en la estructura con respecto a la forma silvestre, se llevaron a cabo espectros de dicroísmo circular. En los ensayos que se hicieron con la proteína pura Atu4243 se observó que los espectros de DC en donde se distinguen los picos mínimos característicos que poseen las hélices α y hebras β , que son en 220 y 210 nm respectivamente (figura 28). Se realizó la comparación de los valores de estructura secundaria calculados a partir de los experimentos de DC con los porcentajes obtenidos a partir de la estructura cristalográfica de la proteína Atu4243. Está mostro un contenido de hélices α del 30% por DC y del 43% de acuerdo a su estructura en tanto que el contenido de hebras β del 9% por DC y de su estructura del 19%.Lo cual indicó que aparentemente hay un aumento de la estructura de hélices α y una disminución en la forma de las hebras al azar (*ramdon coil*).

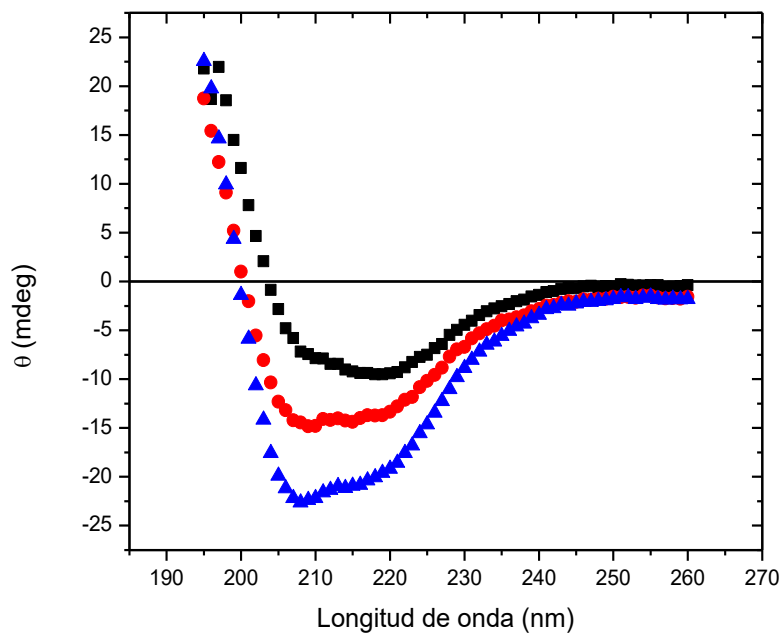


Figura 28. Espectros de dicroísmo circular nativo de Atu4243 en sus diferentes condiciones a una temperatura de 25°C, en un amortiguador de NaH₂PO₄ 10mM, pH 7.7 a una concentración de 0.1mg mL⁻¹ en todos los ensayos; Atu4243 sin arginina (▲), Atu4243 desnaturalizado con urea (■), Atu4243 desnaturalizado con GndCl (●).

Tabla 4. Deconvolución de los espectros DC para las diferentes muestras de la proteína Atu4243. Se muestran los porcentajes de estructura secundaria para cada una.

Atu4243	Hélices α (%)	Hebras β (%)	<i>Random coil</i> (%)	Giros β (%)
Silvestre (Soluble)	31 ±1.3	9±0.5	36±0.4	17±0.3
Desnaturalizada urea 5 M y renaturalizada	46±2.6	6±0.4	24±1.4	15±0.4
Desnaturalizada GndCl 5 M y renaturalizada	70±5.8	3.0±0.3	13.0±1.2	13±0.9

Estudio de proteínas homólogas a la proteína Atu4243

Existen dos variantes de proteínas periplásmicas descritas que unen GABA, Atu4243 y Atu2422, ambas proteínas se presentan en bacterias que son parásitos de plantas y se conoce su estructura tridimensional. De manera interesante, cuando se comparan las estructuras y el sitio de unión, la topología de ambas proteínas es similar, pero no idéntica; la proteína Atu2422 contiene 25 residuos más por lo que existen algunas hélices y motivos extras en esta proteína, además la estereoquímica de la unión de GABA a la proteína es diferente. Inclusive cuando se realiza una búsqueda en la bases de datos de estructuras cristalográficas de homología estructural de la proteína Atu4243 se encuentra que Atu4243 presenta una mayor cercanía estructural con las proteínas periplásmicas que unen putrecina y espermidina ($\text{RMSD} < 3 \text{ \AA}$) que con la proteína Atu2422 ($\text{RMSD} > 4.5 \text{ \AA}$). Por lo anterior se realizó una búsqueda de secuencias en dos bases de datos: con redundancia al 90%, UniRef90 y con una base de datos no redundante (nr). Se realizó la búsqueda utilizando como semilla la secuencia de aminoácidos de Atu4243, y se obtuvo un árbol con el programa PhyML. En las figuras 29-32, respectivamente se indican los árboles de estas secuencias para la base de datos no redundante (nr) y para la base de datos Uniref90 (90% de redundancia). En ambas búsquedas la proteína Atu4243 (azul) se encuentra cercana a las proteínas periplásmicas que unen espermidina (verde), esto mismo se observó en las búsquedas por homología estructural en la base de datos del PDB. Se sugiere durante la evolución de las proteínas periplásmicas, ambas proteínas representan dos soluciones estructurales diferentes para unir GABA.

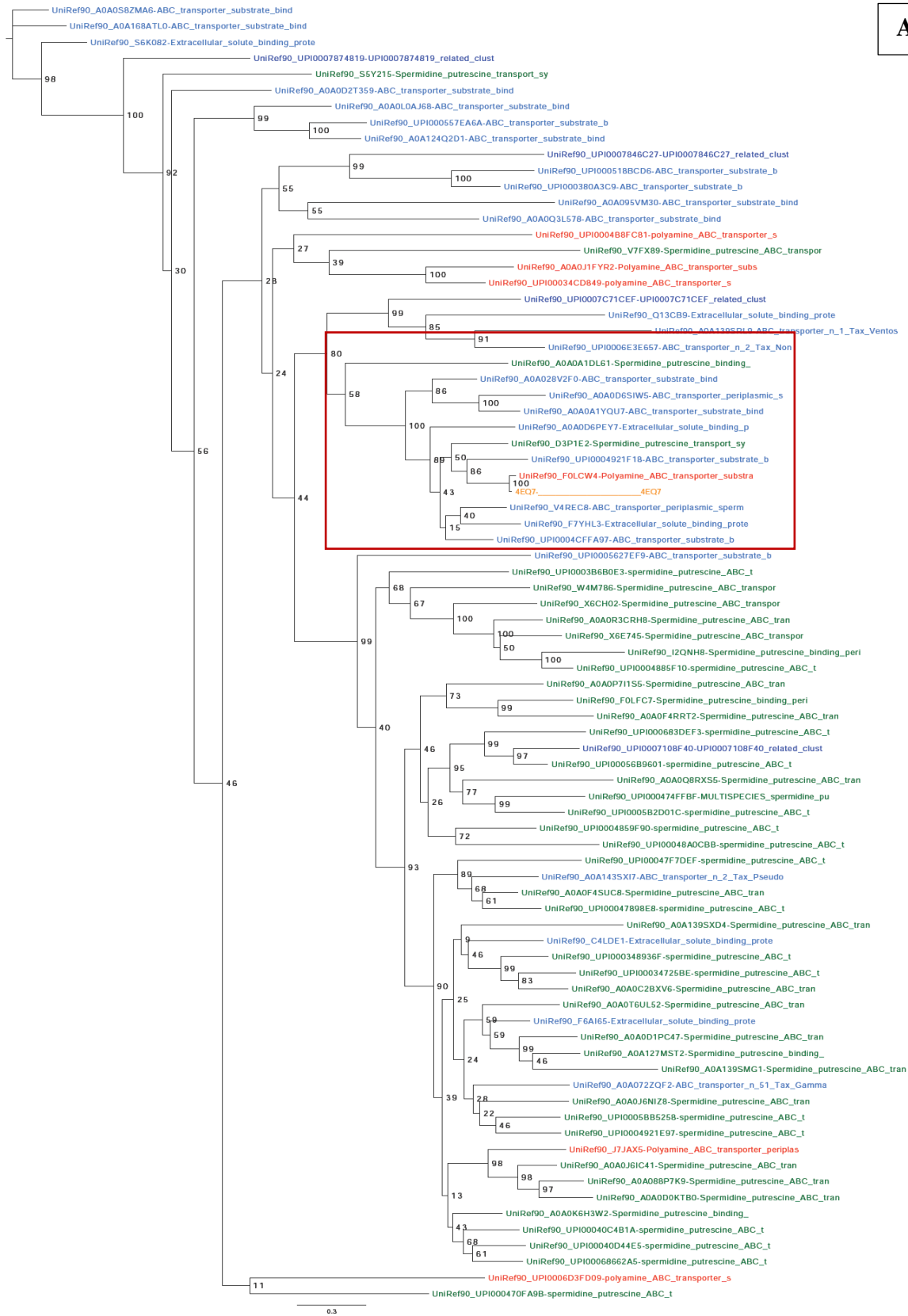


Figura 29. Árbol filogenético con la base de datos Uniref90 90% de redundancia para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a *Atu4243*.

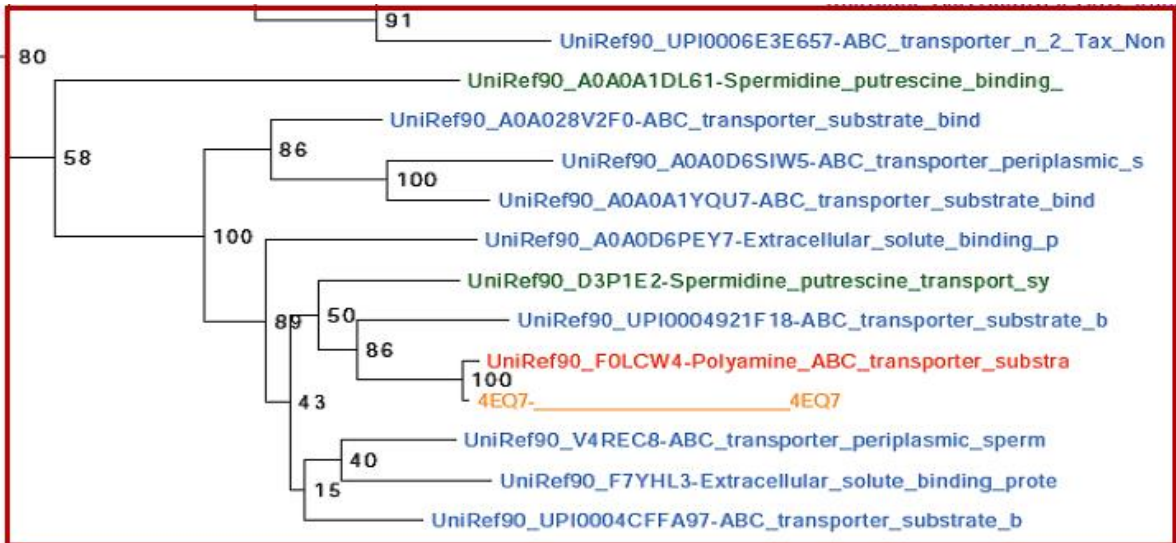


Figura 30. Acercamiento del árbol filogenético con la base de datos Uniref90 90% de redundancia para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a Atu4243.

B

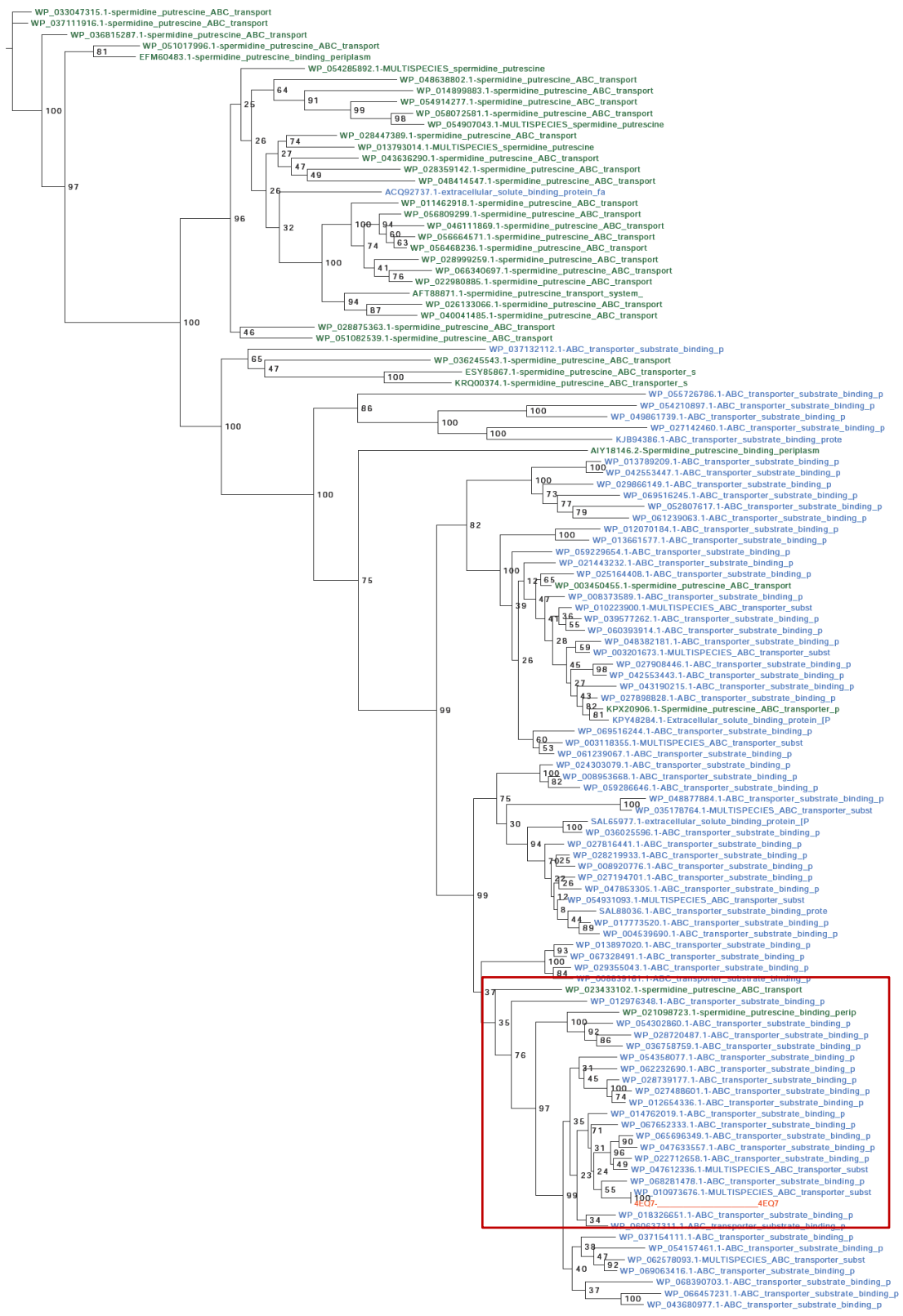


Figura 31. Árbol filogenético con la base de datos de secuencias no redundante (nr) para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a Atu4243.

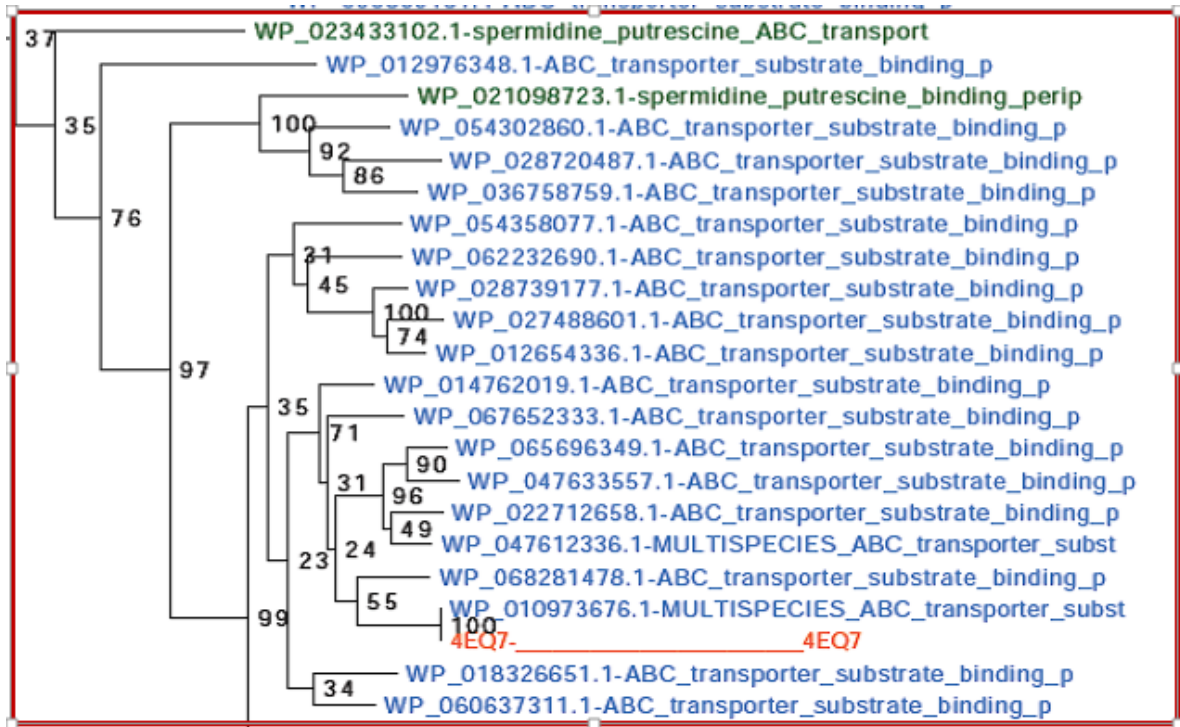


Figura 32. Acercamiento del árbol filogenético con la base de datos de secuencias no redundante (nr) para encontrar las proteínas homólogas más cercanas a Atu4243.

DISCUSIÓN

Protocolo de expresión y purificación

Se buscaron varias condiciones de expresión y purificación de la proteína Atu4243 ya que el primer protocolo que se utilizó (Planamente *et al*, 2012) no fue reproducible para obtener proteína soluble. La proteína se encontró en cuerpos de inclusión, sin embargo la cantidad de proteína por litro de cultivo no era despreciable con un rendimiento de 13.14 mg mL⁻¹. La diferencia en nuestras condiciones y el protocolo descrito originalmente, fue que en la literatura se utilizó el vector pET9aSN1 (derivado del pET9a) y nosotros utilizamos un vector pET3a (ambos vectores son similares, además en la inserción del gen no se encuentran diferencias, puesto que en ambas construcciones se utilizó el sitio de inicio NdeI y término con BamHI con seis His en el extremo carboxilo). Sin embargo la diferencia con respecto al protocolo descrito fue en la cepa de *E.coli*, ya que utilizaron una variante llamada Rosetta2 pLysS, la cual no logramos conseguir.

Se procedió a trabajar con los cuerpos de inclusión para tratar de recuperar la proteína a través de un protocolo de desnaturalización y renaturalización. En un principio se siguió el protocolo (Macherey-Nagel Protino ®) para la desnaturalización con urea a una concentración 8 M, no obstante, se observó que al renaturalizar la proteína en un amortiguador NaH₂PO₄ 35 mM NaCl 300 mM pH 8.0 se formaban agregados. Entonces se decidió renaturalizar la proteína gradualmente a diferentes concentraciones (6 M, 4 M, 2 M y 1 M) para así evitar que se agregara, pero se obtuvo el mismo resultado. Después de esto se centrifugó

y se obtuvo el sobrenadante, se corrió una muestra en un gel de poliacrilamida para verificar que se encontrara la proteína de interés. Se procedió a hacer una prueba con su ligando GABA para confirmar que la proteína se encontrara bien plegada y se observó en la medición con fluorescencia intrínseca que los espectros no mostraron ningún cambio en la intensidad, lo que nos indicó que la proteína no se había replegado correctamente o no era funcional. Se consideró utilizar algún agente que pudiera estabilizar a la proteína, por lo que teníamos tres problemas a resolver: el primero que se pudiera obtener la proteína soluble, el segundo que al tenerla en el sobrenadante no se perdiera gran cantidad y tercero que al desnaturalizar y renaturalizarla para extraerla de los cuerpos de inclusión se replegara y fuera funcional esto es, que se uniera a su ligando).

Para el bajo rendimiento se utilizó un protocolo para precipitar la proteína con sulfato de amonio al 80% (en este porcentaje la proteína se precipitó y al correr muestras en geles de poliacrilamida no se encontraba proteína en el sobrenadante), esto eliminó algunas impurezas. Cabe resaltar que se agregó L-arginina a una concentración de 150 mM a todos los amortiguadores empleados para su purificación, desde el amortiguador de lisis celular hasta la medición por fluorescencia intrínseca, excepto para la medición de dicroísmo circular.

En la literatura encontramos que la formación de cuerpos de inclusión ocurre frecuentemente cuando las proteínas heterólogas se sobreexpresan, la ventaja es que es posible recuperar proteínas de los cuerpos de inclusión, en este sentido la arginina se utiliza ampliamente para replegar proteínas obtenidas de y parece ser viable para una variedad de proteínas que difieren en propiedades químicas y físicas. Ya sea que el replegado se induce por diálisis o dilución, ahora es habitual

incluir arginina cuando se seleccionan las condiciones de replegamiento para la proteína insoluble de cuerpos de inclusión (Tsumoto, *et al*, 2004). A pesar de su uso, se sabe poco sobre el mecanismo de acción de la arginina en el replegamiento de proteínas, sin embargo la presencia de osmolitos modifica diversas propiedades de las proteínas en solución incluyendo su solubilidad, estabilidad, desnaturalización e interacciones con otras moléculas y estructuras.

El papel de la arginina se ha examinado cuidadosamente en los aditivos introducidos en etapas de replegamiento. Ciertas proteínas no se repliegan bien en presencia de arginina, sin embargo, incluso con estas proteínas, la adición de arginina al amortiguador de replegamiento da como resultado a menudo una proteína soluble, y la subsiguiente eliminación de la arginina por diálisis conduce a la precipitación de la proteína. Por lo tanto, a pesar de que estas proteínas no están correctamente plegadas, parece que la arginina las mantiene solubles en una estructura no nativa o cercana a la nativa. Deberíamos tener en cuenta que la arginina a pH neutro o por debajo del mismo está cargada y por lo tanto puede interferir con el replegamiento de proteínas. Por lo que se puede sugerir que la arginina juega un papel importante en la purificación de esta proteína porque puede redirigir el plegamiento, dejando regiones hidrofóbicas menos expuestas a los solventes o regiones que tengan cargas que podrían ser estabilizadas.

Una fracción de las proteínas que contienen enlaces disulfuro, al sobreexpresarse forman cuerpos de inclusión (IB's por sus siglas en inglés) estos son llamados "clásicos". No obstante hay proteínas que no requieren enlaces disulfuro para plegarse (por ejemplo, proteínas intracelulares cuando se expresan naturalmente)

y se pueden expresar como proteínas solubles en el citoplasma de *E. coli*. Existen agregados insolubles que se denominan a menudo IB's sueltos y difieren en estructura de los IB's clásicos (Tsumoto, *et al.*, 2004).

La agregación puede deberse a la sobreexpresión o a la toxicidad de las proteínas expresadas. Para maximizar la expresión en la fracción soluble, generalmente se usan dos enfoques. El primer enfoque es mejorar la expresión cambiando las condiciones de cultivo tales como la temperatura y la composición química del medio, o bien co-expresando con proteínas chaperonas o utilizando un sistema de fusión a otras proteínas solubles. El segundo enfoque es mejorar la recuperación cambiando las condiciones de lisis. Por ejemplo, se ha observado cualitativamente, que la inclusión de 0.1-1 M de arginina en el amortiguador de lisis aumenta la cantidad de proteína expresada en la fracción soluble (Tsumoto *et al.*, 2004). Alternativamente, la fracción de pastillas obtenidas después de la lisis celular puede extraerse con un amortiguador que contiene arginina para recuperar las proteínas nativas.

La presencia de arginina ayudó en los niveles de sobreexpresión y purificación de la proteína Atu4243 en forma soluble, así como para recuperar proteína de los IB's, lo que generó ensayos satisfactorios en las mediciones de fluorescencia intrínseca, pero no necesariamente en la función.

Estabilidad y homogeneidad de la proteína evidenciado a través de DLS, fluorescencia y DC

La dispersión dinámica de luz se utilizó para verificar la homogeneidad entre las diferentes muestras de la proteína Atu4243. La primera gráfica que contenía la proteína soluble presentó un porcentaje bajo de polidispersidad (% Pd) de 14.3 ± 3.5 por lo que se consideró que la muestra era homogénea y que solo contenía la proteína de interés (figura 21-A). La segunda gráfica que muestra los datos de la proteína que se extrajo por la desnaturalización-renaturalización con urea a una concentración 5 M, se observó que los picos fueron irregulares además de que el porcentaje de polidispersidad fue de 38.7 ± 11.5 %, superando el 20% de Pd, lo que indica que la muestra es heterogénea (figura 21-B). En la tercera gráfica se observaron picos similares de la muestra desnaturalizada-renaturalizada con cloruro de guanidinio a una concentración de 5 M (figura 21-C) con un Pd 25.4 ± 6.1 %, a pesar de que disminuye su Pd en comparación con la muestra anterior aun así supera el 20% por lo que la muestra también es heterogénea. En la última gráfica se observan varios picos irregulares (figura 21-D) obteniendo un Pd de 30 ± 12.2 % indicándonos heterogeneidad. Si bien la proteína es soluble después de la desnaturalización con ambos agentes, no es claro el estado nativo debido a la heterogeneidad que presentan. También se observó que el tamaño en comparación a la muestra de la proteína Atu4243 soluble que fue de 6.7 ± 0.8 nm es la que más se acerca al valor obtenido de la estructura cristalográfica que va de 5.9 a 6.2 nm. Las muestras renaturalizadas con urea y GndCl aumenta de tamaño 8.7 ± 2.8 nm y 11.7 ± 3.5 nm respectivamente en comparación con la muestra soluble por una

posible agregación debido un mal plegamiento al regresar de un estado desnaturalizado al nativo. En el caso de la muestra con el ligando el tamaño aumenta 47 ± 10.9 nm en comparación con las muestras desnaturalizadas por lo que se infiere que a pesar de ser la proteína soluble se puede estar agregando al presentarse el cambio conformacional de la proteína Atu4243 al interactuar con su ligando.

Con respecto a la titulación a través de los cambios en la fluorescencia intrínseca (figura 22) que se obtuvo de la muestra soluble de la proteína Atu4243, presentó una disminución en la señal de fluorescencia al ir aumentando la concentración del ligando GABA. Se calculó la constante de disociación (K_d) que fue de 0.365 ± 0.046 mM. Este es un valor menor de K_d , que el reportado (0.009 ± 0.002 mM) para esta proteína (Planamente *et al.*, 2012). Por lo que una posibilidad es que a pesar de que se encontraba pura, la proteína no fuera estable, o posibles efectos de agregación podrían modificar este valor. También puede ser que la arginina esté afectando el sitio de unión, ya sea modificando una parte de la estructura o que la arginina esté ocupando parte del sitio en lugar del ligando (figura 27).

En los espectros de dicroísmo circular de las diferentes muestras de la extracción de la proteína Atu4243 (figura 28), se observó un cambio notable en la estructura secundaria al comparar los tres espectros. Sin embargo, cabe resaltar que para estas pruebas de DC se le eliminó la L-arginina (interfería con la determinación), por lo que la estabilidad de la proteína puede estar modificada y generar problema en la determinación de la estructura secundaria. Es interesante hacer notar que la proteína que se extrajo soluble de la desnaturalización y renaturalización con urea 5 M no presentaba un cambio claro de la fluorescencia en presencia con su ligando.

Esto puede deberse a los cambios en los porcentajes de estructura secundaria, que a su vez generaron una proteína no funcional, ya sea para la unión o para el cambio conformacional.

En contraste, la proteína extraída de la desnaturalización y renaturalización con cloruro de guanidinio 5 M se observó una estructura secundaria menos proclive a la agregación, pero aun así al compararla con la silvestre (extraída del sobrenadante), hay una diferencia en los porcentajes de los elementos de la estructura secundaria, lo cual puede sugerir que no toda la proteína se haya renaturalizado de la forma correcta y a pesar de dar un cambio en la señal total de la fluorescencia, el intento de titular la proteína, generó mucha interferencia en la señal de la fluorescencia, por lo que no fue posible obtener una Kd para esta muestra por esta técnica.

Por otro lado, el análisis de la filogenia con secuencias de proteínas homólogas a la proteína Atu4243, mostró un mayor acercamiento con proteínas que unen putrecina y/o espermidina. Este agrupamiento se observó independientemente de las secuencias contenidas en la base de datos con la que se buscó (no redundancia y UNIREF 90, figura 29-32), por lo que se podría inferir que el origen de ambas proteínas que unen GABA (Atu4243 y Atu2422) son soluciones diferentes que dio la naturaleza al problema de la interacción con este ligando, lo que también concuerda con la homología estructural, pues la proteína Atu4243 estructuralmente está más cercana a las proteínas que unen putrecina y espermidina (RMSD < 3.0 Å), mientras que la homología estructural con Atu2422 es mayor a 4.5 Å, además esta última proteína contiene 25 residuos más con un par de motivos hélice α extra.

CONCLUSIONES

- La precipitación selectiva con sulfato de amonio mejora y facilita el rendimiento en el protocolo de purificación de la proteína Atu4243.
- Usando el protocolo más “eficiente”, se obtiene un bajo rendimiento en forma soluble con nuestra construcción, ya que la mayoría se expresa formando cuerpos de inclusión y sólo en presencia de L-arginina aumenta su solubilidad.
- La proteína desnaturalizada y renaturalizada con GndCl permite recuperar proteína soluble que es funcional.
- La proteína desnaturalizada y renaturalizada con urea, a pesar de obtener proteína soluble, no permiten obtener proteína funcional.
- Con la fracción soluble de la proteína en presencia de L-arginina, es posible estabilizar para obtener una respuesta a la unión de GABA con los cambios en la fluorescencia intrínseca a las diferentes concentraciones de su ligando.
- La proteína Atu4243 en sus diferentes protocolos de purificación no presentaron el mismo contenido de estructura secundaria y sólo la muestra de la proteína extraída del sobrenadante, así como la obtenida de la renaturalización con cloruro de guanidinio exhibieron función para unir a GABA.
- La proteína Atu4243 y Atu2422 a pesar de que ambas se encuentran en el mismo organismo y de unir GABA, no presentan una aproximación en los árboles filogenéticos presentes en este trabajo por lo que se infiere que no hay cercanía próxima entre éstas.

PERSPECTIVAS

- Mejorar el protocolo de purificación de la proteína para intentar obtenerla en forma soluble y que se obtenga un mayor rendimiento.
- Caracterizar la proteína por calorimetría diferencial de barrido y calorimetría de titulación isotérmica.
- Crear nuevas construcciones de gen-vector para sobreexpresar proteína, con residuos de histidina en el extremo amino terminal o bien con diferentes tipos de uniones a las regiones de histidina.
- Utilizar mutaciones con residuos aromáticos en el sitio de unión para poder estudiar y contar con un sensor con mayor afinidad. al ligando GABA
- Analizar la estabilidad termodinámica de la proteína con modificaciones para determinar cuáles proteínas serían viables como sensores estables.
- Introducir fluoróforos extrínsecos por modificación covalente para mejorar la señal y construir un sensor más robusto.
- Hacer más reconstrucciones filogenéticas entre las proteínas Atu4243 y Atu2422 para tratar de entenderlas desde un punto evolutivo

REFERENCIAS

1. **Alberts B.** 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition: The shape and structure of proteins, New York: Garland Science.
2. **ATGC South of France bioinformatics platform**. Consultada por última vez 27-Junio-2017. <http://www.atgc-montpellier.fr/phym/>
3. **BEASTdoc**. Consultada por última vez 28-Junio-2017. <http://beast.community/figtree>
4. **Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E., & Faure, D.** 2006. *GABA controls the level of quorum-sensing signal in Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(19), 7460–7464.
5. **Dwyer, M. A., & Å, Hellinga, W. H.** 2004. *Periplasmic binding proteins : a versatile superfamily for protein engineering*. Current Opinion in Structural Biology, 14(4) ,495-504.
6. **EMBL.EBI European Bioinformatics Institute: EMBOSS Needle**. Consultada por última vez 20-Julio-2017. http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
7. **ExPASy Bioinformatics Resource Portal**. Consultada por última vez 13-Marzo-2017. <https://www.expasy.org/tools/>
8. **Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H., Sadee, W., & Chemistry, P.** 1999. *The Venus Flytrap of Periplasmic Binding Proteins : An Ancient*

- Protein Module Present in Multiple Drug Receptors*, Journals American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSci 1(2).
9. **Fiser, A., Kinh Gian Do, R., Sali, A.** 2000. *Modeling of loops in protein structures*. Cambridge University Press. (9), 1753-1773.
 10. **Guzmán, H.** 2015. *Análisis y rediseño de la interacción proteína-ligando utilizando a la proteína periplásmica de unión a aminoácidos básicos*. (Tesis). Facultad de Medicina. UNAM. México.
 11. **Heide, T. Van Der, & Poolman, B.** 2002. *ABC transporters : one, two or four*, 3(10), 938–943.
 12. **Kelly S. M., Jess T.J., Price Nicholas C.** 2005. *How to study proteins by circular dichroism*. Biochemical et Biophysical Acta 1751, 119-139.
 13. **Krüger, D.M., Rathi, P.C., Pflieger, C., & Gohlke, H.** 2013. *CNA web server: rigidity theory-based thermal unfolding simulations of proteins for linking structure, thermo-stability, and function*. *Nucleic Acids Research*, 41, W340-8.
 14. **Lakowicz, J.R.** 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3° Edición. Springer. pp 88
 15. **Lober B., Fischer F., Bailly M., Roy H., Kern D.** 2012. *Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students*. *Biochemistry and molecular biology education*, 40, 372-382.
 16. **Marty L., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Dessaux, Y., Faure D. & Moréra, S.** 2016. *Structural Basis for High Specificity of Amadori Compound and Mannopine Opine Binding in Bacterial Pathogens*, *Journal of Biological Chemistry*, 1-12.

17. **NCBI-BLAST U.S. National Library of Medicine.** Consultada por última vez el 27-Junio-2017. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
18. **Nelson D., Cox M.** 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th edition. New York: Macmillan Publishers.
19. **Paas, Y.**1998. *The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors*, Trends in Neuroscience, 117–125.
20. **Planamente, S., Mondy, S., Hommais, F., Vigouroux, A., Moréra, S., & Faure, D.** 2012. *Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens*, Molecular Microbiology, 86(5), 1085–1099.
21. **Planamente, S., Vigouroux, A., Mondy, S., Nicaise, M., Faure, D., & More, S.** 2010. *A Conserved Mechanism of GABA Binding and Antagonism Is Revealed by Structure-Function Analysis of the Periplasmic Binding Protein Atu2422 in Agrobacterium tumefaciens*, The Journal of Biological Chemistry, 285(39), 30294–30303.
22. **RCSB PDB Protein Data Bank.** Consultada por última vez el 23-Junio-2017. <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
23. **Shi, R., Proteau, A., Wagner, J., Cui, Q., Purisima, E. O., Matte, A., & Cygler, M.** 2009. *Trapping open and closed forms of FitE-A group III periplasmic binding protein*, Proteins: Structure, Function, Bioinformatics, 75, 598–609.
24. **Skoog D., Holler F. J., Crouch S. R.** 2006. *Principles of instrumental analysis*. Sexta edición. Connecticut, Estados Unidos. Cengage Learning.

25. **Sosa-Peinado, A., González-Andrade, M.** 2010. *Fluorescent Biosensors for Protein Interactions and Drug Discovery*, Biosensors for Health, Environment and Biosecurity, 4-12.
26. **Tomii, K., Kanehisa, M.** 1998. *A Comparative Analysis of ABC Transporters in Complete Microbial Genomes*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1048–1059.
27. **Tsumoto, K. Umetsu, M. Kumagai, I. Ejima, D. Philo, J. Arakawa T.** 2004. *Role of arginine in protein refolding, solubilization and purification*. Biotechnology Progress. 20. 1301-1308.
28. **UniProt.** Consultada por última vez el 27-Junio-2017. <http://www.uniprot.org/>
29. **Vivian, J.T., Callis, P.R.** 2001. *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins*. Biophysical Journal, 80, 2093-2109.
30. **Voet, D., Voet J.** 2004. Bioquímica. 3° Edición, Panamericana.
31. **Yoon, H., Ahn, J., Barone, P. W., Yum, K., Sharma, R., Boghossian, A. A., Strano, M. S.** 2011. *Periplasmic Binding Proteins as Optical Modulators of Single-Walled Carbon Nanotube Fluorescence : Amplifying a Nanoscale Actuator*, Bioanalytical Sensors, 50, 1828–1831.

ANEXO

A) Preparación de medios

Para elaborar los siguientes medios de cultivo se utilizaron los siguientes reactivos:

- Medio LB (Luria-Bactotripton)

Para un litro de medio líquido:	
Bactotripton	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g

- Medio SOC

Para un litro de medio líquido:	
Bactotripton	20g
Extracto de levadura	5g
NaCl	0.58g
KCl	0.19g
MgCl ₂	1.9g
Glucosa	3.6g

- Medio LB Sólido (Luria- Bactotripton)

Para un litro de medio líquido:	
Bactotripton	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g
Agar	25g

Nota: Al medio una vez que esta estéril se le agregó 1mL de Ampicilina a 1000X para las placas.

B) Preparación de soluciones

Todas las disoluciones que se ocuparon se ajustaron a un pH 7.7, en un volumen de 1 L.

- Solución amortiguadora de sonicación

Reactivo	Concentración (mM)	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g)
Tris	100	121.14	12.114
NaCl	150	58.44	8.766
L-Arginina	150	174.2	26.13
EDTA	1	380.17	0.3801
PMSF	1500	174.19	0.00871

Nota: El reactivo de PMSF se diluyen en 32 μ L

- Solución amortiguadora de fosfatos A

Reactivo	Concentración (mM)	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g)
NaH ₂ PO ₄	35	137.99	9.38
NaCl	150	58.44	8.766
L-Arginina	150	174.2	26.13

- Solución amortiguadora de fosfatos B

Reactivo	Concentración (mM)	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g)
NaH ₂ PO ₄	35	137.99	9.38
NaCl	300	58.44	17.53
L-Arginina	150	174.2	26.13
Imidazol	5	68.08	0.3404

- Solución amortiguadora de fosfatos C

Reactivo	Concentración (mM)	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g)
NaH ₂ PO ₄	35	137.99	9.38
NaCl	300	58.44	17.53
L-Arginina	150	174.2	26.13
Imidazol	500	68.08	34.04

- Solución amortiguadora Tris

Reactivo	Concentración (mM)	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g)
Tris	100	121.14	12.114
NaCl	300	58.44	17.53
L-Arginina	150	174.2	26.13

*Filtrado

- Solución amortiguadora de corrida

Para un litro de solución	
Trizma base	3g
Glicina	14.4g
SDS al 10% p/v	10mL

Nota: Pesar todos los reactivos e ir incorporando poco a poco en 970mL de agua destilada para evitar la formación de burbujas.

- Solución digestora de proteínas

Para preparar 5mL de solución:	
SDS 10%	2mL
β-Mercaptoetanol	200μL
EDTA 250mM	160μL
TrisHCL 1M pH 6.8	1mL
de azul de bromofenol	0.1mg