



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Obtención de la proteína recombinante CsgA y sus motivos
estructurales”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:
DANIELA REYES MARTÍNEZ

ASESOR:
DR. VICTOR MANUEL LUNA PINEDA

COASESOR EXTERNO:
DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES

COASESOR INTERNO:
M. EN C. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Obtención de la proteína recombinante CsgA y sus Motivos estructurales.

Que presenta la pasante: **Daniela Reyes Martínez**

Con número de cuenta: **310310244** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Febrero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	Q. Karla Paola Hernández Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

Lugar de realización

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

Financiamientos y apoyos económicos.

Este trabajo fue financiado por CONACyT-Problemas Nacionales (2016) con el número de cuenta 1764 y por fondos federales del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” con los registros HIM/2016/027 SSA. 1240, HIM/2017/002 SSA. 1298 y HIM/2018/136 SSA 1456.

Dedicatoria

A Daniel Martínez, mi padre, mi mayor motivación en cada paso que he dado, mi ejemplo a seguir y mi apoyo incondicional. Cada logro mío es un logro tuyo.

A mi madre, por su paciencia y apoyo durante todo este tiempo, por animarme siempre a dar lo mejor de mí.

A mis amigas Elizabeth, Flor, Joshy, Mextli, Miranda y Sandra por todas las enseñanzas profesionales y personales. Por las risas en las buenas y el apoyo en las malas. Son mujeres increíbles y brillantes. Vamos por más. A la maestra Vicenta por ser parte importante en este proceso, por las enseñanzas las risas y las largas pláticas.

A la UNAM y al Hospital Infantil de México “Federico Gómez” , al grupo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal por siempre hacerme sentir como en casa. A mis asesores, Dr. Juan Xicotécatl por abrirme las puertas de su laboratorio, por todas las enseñanzas y consejos, al Dr. Víctor Manuel Luna por tenerme tantísima paciencia, por las enseñanzas, el apoyo y por la amistad. Gracias por todo.

A mis sinodales por ser los mejores profesores que tuve durante la carrera sepan que tienen toda mi admiración y agradecimiento.

Índice

Índice.....	5
Índice de figuras y tablas.....	8
Abreviaturas.....	10
Resumen.....	11
1. Introducción y Antecedentes.....	12
1.1 Introducción.....	12
1.1.1 Infecciones del tracto urinario.....	12
1.1.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogénica (UPEC).....	12
1.1.3 Factores de virulencia y mecanismo de patogenicidad de UPEC.....	13
1.1.4 Fimbria curli y su biogénesis.....	16
1.1.5 La proteína CsgA o subunidad estructural de la fimbria curli.....	19
1.2 Antecedentes.....	21
1.3 Fundamentos de la metodología.....	24
1.3.1 Extracción de DNA genómico.....	24
1.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
1.3.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	26
1.3.4 Clonación Independiente de Ligación (LIC).....	27
1.3.5 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a níquel.....	29
1.3.6 Evaluación de las proteínas por SDS PAGE.....	30
1.3.7 “Western Blotting”.....	31
2. Planteamiento del problema de investigación.....	33

2.1 Justificación.....	33
2.2 Objetivos.....	34
2.2.1 Objetivo general.....	34
2.2.2 Objetivos particulares.....	34
3. Materiales y Métodos.....	35
3.1 Análisis bioinformático.....	36
3.2 Amplificación de <i>csgA</i> y las regiones que codifican sus motivos estructurales.....	37
3.3 Clonación en el vector pLATE31.....	38
3.4 Transformación del vector de expresión por electroporación.....	39
3.5 Verificación de transformantes por PCR en colonia.....	39
3.6 Verificación de la expresión de proteínas y ensayos de solubilidad.....	40
3.7 “Western blotting”.....	41
3.8 Purificación de la proteína CsgA y sus motivos estructurales.....	42
3.9 Diálisis.....	44
3.10 Despolimerización con ácido fórmico.....	44
4. Resultados.....	46
4.1 Diseño de iniciadores y predicción de propiedades fisicoquímicas.....	46
4.2 Amplificación de <i>csgA</i> y las regiones que codifican sus motivos estructurales.....	47
4.3 Verificación de los vectores de expresión.....	49
4.4 Determinación de la solubilidad y condiciones de expresión de las proteínas.....	51
4.5 Purificación de la proteína CsgA y sus motivos estructurales.....	55
4.6 El tratamiento con ácido fórmico despolimeriza los agregados proteicos.....	58

5. Discusión.....	60
6. Conclusiones.....	63
7. Referencias.....	64

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Esquema representativo de los principales factores de virulencia de UPEC.....	14
Figura 2. Micrografía de los curli en la cepa de UPEC.....	16
Figura 3. Esquema representativo de la biogénesis en la fimbria curli.....	17
Figura 4. Secuencia lineal de aminoácidos que componen a la proteína CsgA.....	20
Figura 5. Predicción de la estructura tridimensional de CsgA.....	20
Figura 6. Distribución de los genes asociados a factores de virulencia y aptitud.....	21
Figura 7. Esquema de la activación de TLR2/TLR1 por los curli.....	23
Figura 8. Esquema representativo de los pasos de la PCR.....	26
Figura 9. Diagrama de alineamiento del vector pLATE31.....	29
Figura 10. Interacción entre los residuos de histidina y la matriz Ni-NTA.....	30
Figura 11. Detección de proteínas por “Western Blotting”.....	32
Figura 12. Diagrama de flujo.....	35
Figura 13. Esquema que representa los fragmentos del gen <i>csgA</i>	36
Figura 14. Amplificación de las secuencias que codifican para la proteína CsgA N y sus motivos estructurales.....	48
Figura 15. Verificación por PCR de probables transformantes con el vector de expresión pLATE31- <i>csgAN</i>	49
Figura 16. Verificación por PCR de las probables transformantes con los vectores pLATE31- <i>csgA</i> M1, pLATE31- <i>csgA</i> M2 y pLATE31- <i>csgA</i> M3.....	50
Figura 17. Ensayo de solubilidad para la proteína CsgA R.....	51
Figura 18. Evaluación de la solubilidad para la proteína CsgA N.....	52

Figura 19. Evaluación por “Western blotting” de la solubilidad de los motivos estructurales M1 y M2.....	53
Figura 20. Evaluación por SDS-PAGE de la solubilidad de los motivos estructurales M1 y M2.....	53
Figura 21. Evaluación de la solubilidad del motivo estructural M3.....	54
Figura 22. SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación bajo condiciones nativas de los motivos estructurales M1 y M3.....	55
Figura 23. SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación bajo condiciones desnaturalizantes de la proteína CsgA N y su motivo estructural M2.....	56
Figura 24. SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación bajo condiciones desnaturalizantes de la proteína CsgA R.....	57
Figura 25. Tratamiento de la proteína CsgA N con rojo Congo y ácido fórmico al 90%.....	58
Figura 26. Tratamiento de los motivos estructurales de la proteína CsgA con ácido fórmico al 90%.....	59
Tabla 1. Iniciadores para la amplificación de las distintas regiones del gen <i>csgA</i>	46
Tabla 2. Predicción de las propiedades fisicoquímicas de la proteína CsgA y sus motivos estructurales.....	47

Abreviaturas

- 6xHis:** Etiqueta de 6 histidinas
CBI: Comunidades bacterianas intracelulares
CNF1: Factor necrotizante citotóxico
CsgA: Subunidad proteica estructural de la fimbria curli
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
hlyA: α -hemolisina
IL: Interleucina
IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
ITU: Infecciones del tracto urinario
kDa: kilodalton
LB: Luria-Bertani (medio de cultivo)
LIC: Clonación independiente de ligación
LPS: Lipopolisacárido
N22: Región de 22 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína CsgA
NCBI: National Center of Biotechnology Information
Ni-NTA: Agarosa Níquel- Ácido nitrilotriacético
Pb: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF: Fluoruro de polivinilideno
Sat: Toxina autotransportadora secretada
SDS: Dodecil sulfato de sodio
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
Sec: Péptido señal
Tm: Temperatura de fusión
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
UFC: Unidades formadoras de colonias
UPEC: *Escherichia coli* uropatógena
Vat: Citotoxina autotransportadora vacuolar

Resumen.

Las infecciones del tracto urinario son consideradas como una de las principales causas de morbilidad en el mundo. En México, se reportan más de 4 millones de casos cada año. *Escherichia coli* uropatogénica es el principal agente causal de las ITU con más del 80% de aislamientos en estos pacientes, mientras, el 50% de las infecciones adquiridas en hospitales son generadas por esta bacteria. Entre los factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatogénica se encuentra la fimbria curli. Curli, un homopolímero de proteínas CsgA, es el principal componente de la matriz extracelular bacteriana que modula la respuesta inmune del hospedero y es un factor de aptitud que apoya en la colonización a través de la interacción de sus motivos estructurales de esta proteína a un receptor todavía no descrito en el tracto urinario. Una proteína soluble es indispensable para realizar ensayos de interacción receptor-ligando, por lo que, establecer un sistema de expresión de la proteína CsgA y sus motivos estructurales permitirá obtener una molécula soluble para la búsqueda en un futuro del receptor de curli en el tracto urinario. **Objetivo.** Establecer un sistema de expresión en *E. coli* para purificar una proteína recombinante CsgA y/o sus motivos estructurales, como una molécula soluble. **Materiales y métodos.** La estrategia metodológica se dividió en las siguientes etapas: 1) análisis bioinformático para la estrategia de clonación; 2) clonación de las diferentes variantes en el vector de expresión pLATE31 y su transformación en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3); y 4) estandarización de las condiciones de expresión y purificación para obtener una molécula soluble. **Resultados.** Las cinco variantes de la proteína CsgA fueron clonadas y expresadas eficientemente, sin embargo la proteína CsgA y M2 fueron localizadas en la fracción insoluble durante el ensayo de purificación y de la solubilidad. Siguiendo las mismas condiciones, el motivo estructural M1 y M13 fueron identificadas en la fracción soluble. Los motivos M1 y M13 fueron purificados por cromatografía de afinidad en condiciones nativas con una concentración de 90.37 y 37 ng/ μ L, respectivamente. Sin embargo, se tomó la decisión de purificar en condiciones desnaturalizantes las proteínas CsgA y M2 para realizar ensayos de replegamiento y solubilidad, las cuales tuvieron una concentración de 34.7 y 70.7 ng/ μ L, respectivamente. **Conclusiones.** Se pudo establecer un sistema de expresión en *E. coli* para la proteína CsgA y sus motivos estructurales, sin embargo solo M1 y M3 fueron identificadas como moléculas solubles. Estos motivos podrán ser usados en un futuro para la búsqueda del receptor de curli en el tracto urinario.

1. Introducción y Antecedentes

1.1 Introducción

1.1.1 Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son consideradas como una de las principales causas de morbilidad en el mundo¹. En México, se han reportado más de 4 millones de casos cada año². Estas infecciones son clasificadas de acuerdo con el sitio de infección: en orina sin síntomas son definidas como bacteriuria asintomática, en vejiga como cistitis, en riñón como pielonefritis y en sangre como bacteriemia³.

Las ITU son causadas principalmente por patógenos de origen intestinal que contaminan la uretra y ascienden hasta la vejiga, incluyendo los riñones². Una ITU es considerada cuando el uropatógeno alcanza más de 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL posterior al cultivo de la orina⁴. Los principales agentes causales son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter spp.* y *Enterobacter spp.*⁵.

1.1.2 *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC)

E. coli es una especie muy diversa que tiene la habilidad de colonizar y persistir en numerosos nichos, tanto ambientales como en hospederos animales⁵. Esta bacteria, así como la demás microbiota intestinal en mamíferos, tiene una relación simbiótica con su hospedero⁶; Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* tienen la capacidad de causar enfermedad en el tracto intestinal (diarrogénicas) y en otros sitios anatómicos del hospedero (extraintestinales)⁷. La principal cepa de *E. coli* extraintestinal es *E. coli* uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés); la cual ha adquirido la capacidad de colonizar el tracto urinario⁸.

UPEC es el principal agente causal de las ITU con más del 80% de aislamientos en estos pacientes, mientras, el 50% de las infecciones adquiridas en hospitales son generadas por esta bacteria⁹. UPEC adquirió a través de la transferencia horizontal de genes, diferentes factores de virulencia contenidos en islas de patogenicidad, plásmidos y fagos¹⁰. Estos factores de virulencia están localizados principalmente en la superficie bacteriana de UPEC y son utilizados para generar la patología clínica^{2,11}.

1.1.3 Factores de virulencia y mecanismo de patogenicidad de UPEC

El mecanismo de patogenicidad de UPEC inicia con la adherencia al uroepitelio, a través de adhesinas fimbriales (FimH, PapG, SfaS, FocH y DrA) localizadas en la parte distal de diferentes fimbrias (tipo 1, P, S, F1C y Dr), como se muestra en la **Figura 1**¹⁰. Estas adhesinas interactúan con componentes de la membrana del uroepitelio, tales como: proteínas α -D-manosiladas, glicoesfingolípidos y ácido neuramínico, incluyendo el factor que acelera el decaimiento y proteínas de la matriz extracelular^{12,13}. La adherencia de UPEC activa diferentes vías de señalización y contribuye a la invasión bacteriana de las células del tracto urinario². La invasión permite a la bacteria permanecer intracelularmente y formar comunidades bacterianas intracelulares (CBI)³. La interacción de UPEC con la célula promueve un estado de oxidación intracelular, originando la filamentación de la bacteria intracelular y su posterior eflujo¹⁴. UPEC provoca la lisis de la célula hospedera, mientras las células del uroepitelio entran en apoptosis y posterior exfoliación, como un mecanismo de defensa contra la infección¹. Sin embargo, el epitelio intermedio del tracto urinario queda expuesto y UPEC puede colonizar nuevamente para un nuevo ciclo de infección¹⁵. Otro factor de virulencia importante en UPEC es el lipopolisacárido (LPS) y está asociado a la colonización de esta bacteria en la vejiga, la formación de CBI y la resistencia a antibióticos hidrofóbicos¹⁶.

La orina es una muestra biológica con bajo aporte de hierro, donde UPEC ocupa captadores de este metal, definidos como sideróforos que permiten a esta bacteria transportarlo a su citosol¹⁵. Además, UPEC posee sistemas de secreción tipo I y V para expulsar toxinas, tales como: la α -hemolisina (hlyA), factor necrotizante citotóxico (CNF1) y toxinas autotransportadoras, incluyendo la citotoxina autotransportadora vacuolar (Vat) y toxina autotransportadora secretada (Sat)⁸. Estas toxinas causan defectos en la función o la forma de las células del hospedero, deteniendo el ciclo celular y provocando la lisis⁸. Por otro lado, el flagelo de UPEC es usado por la bacteria para movilizarse hasta los nutrientes, escapar de condiciones desfavorables y del sistema inmune del hospedero¹⁷. En UPEC, el flagelo es asociado con la ascensión de la bacteria al tracto urinario alto (riñones)¹⁶.

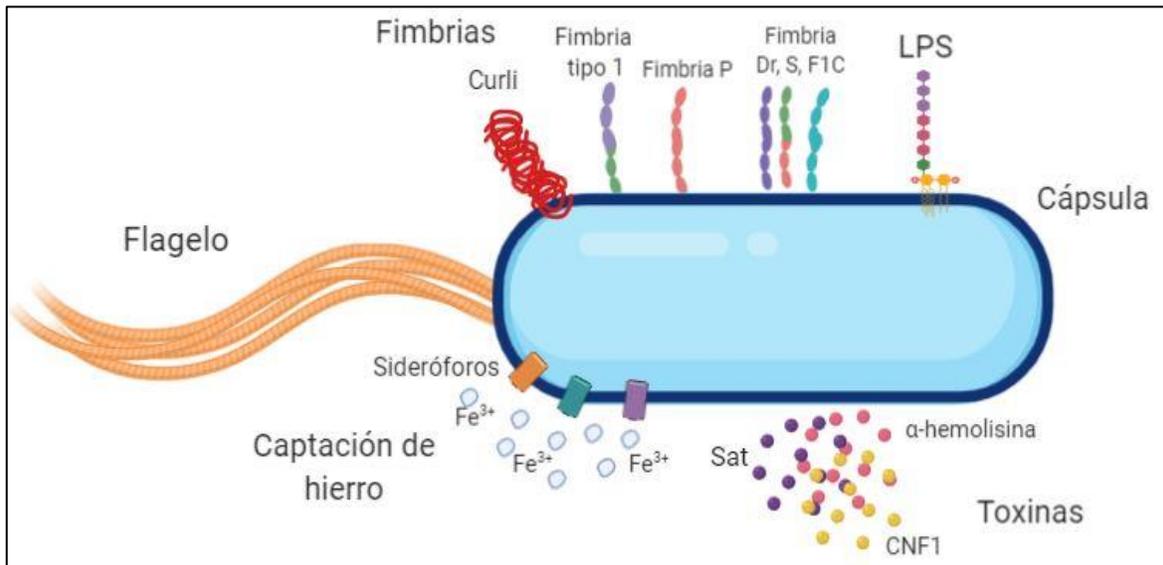


Figura 1. Esquema representativo de los principales factores de virulencia de UPEC. Las cepas de UPEC han adquirido los diferentes factores de virulencia a través de la transferencia horizontal de genes. Estos genes codifican factores que promueven la supervivencia y virulencia de las cepas de UPEC en su hospedero. Estos factores de virulencia son clasificados principalmente en: fimbrias, cápsula, lipopolisacárido, flagelo, sistemas captadores de hierro y toxinas¹⁰.

Recientemente, curli, una fimbria con características amiloideas ha sido descrita como un factor de virulencia importante en cepas clínicas de UPEC y este factor es la base de este estudio. Las proteínas amiloideas son estructuras proteicas filamentosas e insolubles que se fibrilizan a partir de subunidades monoméricas, se han encontrado en muchos organismos, incluyendo bacterias, hongos y mamíferos. Estas estructuras también se han reconocido como causantes de enfermedades neurodegenerativas y algunas encefalopatías¹⁸. Las fibras purificadas son altamente resistentes a la degradación química, proteolítica y enzimática; permanecen intactas incluso durante el tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS) o proteinasa K¹⁹.

La capacidad de resistir la degradación mejora la resistencia y durabilidad de las biopelículas, lo que les permite resistir condiciones ambientales adversas. La exposición a productos químicos agresivos como ácido fórmico al 90% o hexafluoroisopropanol es necesaria para despolimerizar las fibras en subunidades monoméricas¹⁹.

Los amiloides humanos y bacterianos no comparten secuencias de aminoácidos conservadas, sin embargo, comparten numerosas características. Los péptidos precursores de amiloides en mamíferos y bacterias se pliegan en estructuras de láminas beta altamente conservadas debido a la presencia de residuos de glutamina y asparagina, y amiloides¹⁹.

1.1.4 Fimbria curli y su biogénesis

En 1989, Normak y colaboradores describieron por primera vez a la fimbria curli en aislados de *E. coli* a partir de mastitis en bovinos²⁰. Las fimbrias curli son consideradas como el componente principal de la matriz extracelular bacteriana y también son consideradas como proteínas amiloideas funcionales²¹. Estas fimbrias amiloideas son también expresadas en otras Gammaproteobacterias, tales como: *Salmonella* spp, *Cronobacter* spp, *Pseudomonas* spp, y *Vibrio cholerae*²¹⁻²⁴. Las condiciones óptimas de expresión de la fimbria curli ocurren durante la fase estacionaria bajo condiciones de estrés y con una temperatura óptima entre 26 a 30°C²⁵. Estas fimbrias son fibras finas curvadas en forma de rizos flexibles formando cúmulos heterogéneos cuando son vistos en micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (**Figura 2**)^{2,26}.

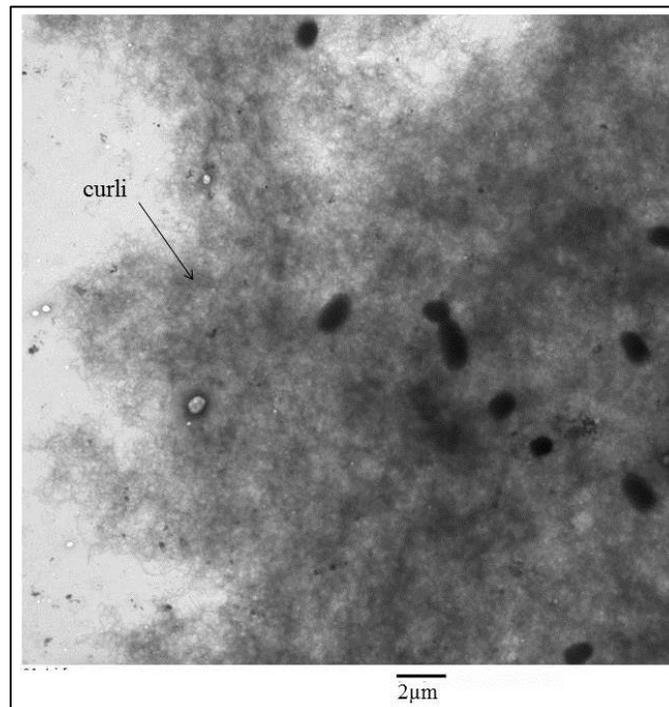


Figura 2. Micrografía de los curli en la cepa de UPEC. Las fimbrias curli son fibras finas en forma de rizos flexibles en cúmulos heterogéneos de aproximadamente 10 a 15 μm . La cepa de UPEC CFT073 fue crecida en medio “Yeast Extract Casaamino acid” suplementado con 10% DMSO e incubado a 37°C durante 36 hrs para la expresión de los curli. Esta micrografía fue obtenida por tinción negativa y posterior microscopía electrónica de transmisión por Vega-Hernández R., tesis de Licenciatura (2019). La barra inferior corresponde a una escala de 2 μm .

Los genes que codifican para las proteínas involucradas en la biogénesis de la fimbria son localizados en dos operones convexos definidos como: *csgBAC* y *csgDEFG* (Figura 3)²⁵.

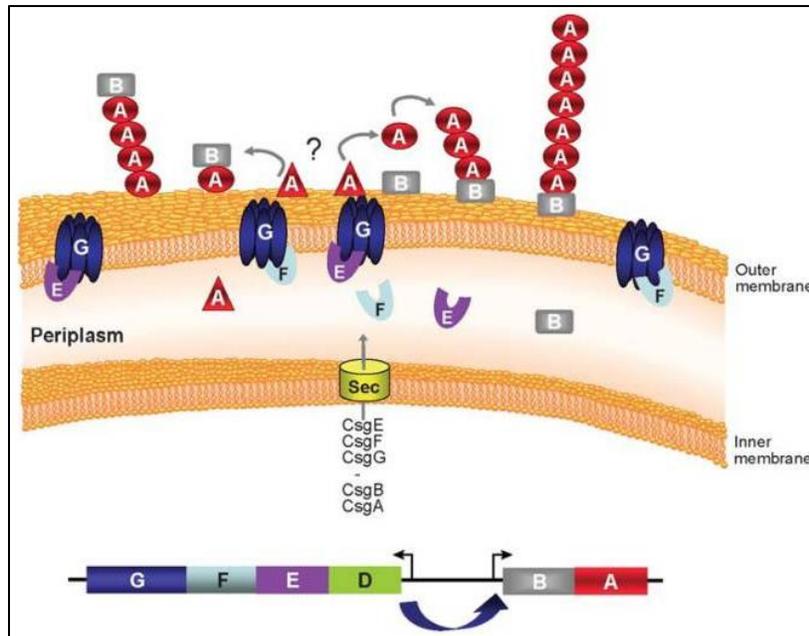


Figura 3. Esquema representativo de la biogénesis en la fimbria curli. Las proteínas involucradas en la biogénesis de la fimbria curli están codificadas en los operones *csgBAC* y *csgDEFG*. La fimbria curli está formada por un homopolímero de la proteína CsgA. CsgA es secretada a través del poro formado de CsgG asociado a las proteínas accesorias CsgE y CsgF. El componente estructural CsgA es anclado a la superficie bacteriana por acción la proteína “nucleadora” CsgB y regulada su expresión por la proteína CsgD¹⁷.

El operón *csgBAC* codifica para las proteínas estructurales CsgA y CsgB, además de la proteína periplásmica CsgC. La proteína CsgA es el componente estructural mayor, la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 15 KDa y su plegamiento está dado por cinco repeticiones de estructura secundaria de lámina β antiparalela²¹. Este plegamiento le confiere la capacidad de permanecer en un estado amiloideo posterior a su ensamblaje en la superficie bacteriana²⁷. La proteína CsgB se conoce como la subunidad menor de curli y

comparte un 30% de identidad con CsgA, incluyendo su núcleo amiloideo²³. Este componente menor es definido como una proteína “nucleadora” indispensable para el ensamble de los curli en la superficie celular bacteriana²⁸. Es decir, CsgA es secretada en estado soluble a través de la membrana externa, mientras, en el exterior CsgB se encarga de anclar a la fimbria en la superficie bacteriana e iniciar la polimerización de CsgA²⁹. El último producto del operón *csgBAC* es CsgC, una proteína periplásmica, la cual permite la secreción de las subunidades estructurales de los curli, manteniendo el poro abierto³⁰. Este proceso completo en la biogénesis es definido como “nucleación-precipitación” o “Secreción Tipo VII”³¹.

La proteína CsgD, un regulador positivo de la familia FixJ/LuxR, es codificado en el operón *csgDEFG* de curli²⁰. Este regulador es asociado a la expresión del operón *csgBAC*, mientras suprime la expresión de los genes flagelares²⁰. Los genes *csgE*, *csgF* y *csgG* son también codificados en el operón *csgDEFG* y sus proteínas componen el aparato de secreción de los curli en la membrana externa³². La proteína CsgG se ensambla para formar un poro en la membrana externa, mientras que CsgE y CsgF desempeñan funciones similares a las chaperonas³². Ambas proteínas permiten la secreción y la unión de las subunidades mayor (CsgA) y menor (CsgB) de los curli a la superficie celular²¹. Interesantemente, las mutantes *csgE* presentan un ensamblaje defectuoso de curli con una reducción en la estabilidad de CsgA y CsgB²¹.

1.1.5 La proteína CsgA o subunidad estructural de la fimbria curli

CsgA, la subunidad estructural mayor de la fimbria curli está compuesta por 151 aminoácidos sin procesar (**Figura 4**). Esta proteína contiene una región amino terminal de 21 aminoácidos, también conocida como péptido señal, que es requerida para la estabilidad y secreción de CsgA al espacio periplásmico de la bacteria³². A partir del aminoácido 22 al 43 es localizada la región N22, la cual provee especificidad a la proteína CsgG ubicada en el poro de la membrana externa²¹. Además, esta región N22 permite la nucleación de CsgA por la proteína CsgB en la membrana externa de la bacteria y es también definida como nucleadora²⁵. Interesantemente, cinco repeticiones de estructura lámina β (R1 a R5) están presentes a partir de los aminoácidos 43 al 151, formando el núcleo amiloideo en CsgA³³.

Las secuencias de las repeticiones tienen un secuencia consenso Ser-X5-Gln-X-Gly-X-Gly-Asn-X-Ala-X3-Gln que garantiza la formación de la estructura secundaria de lámina β cruzada^{22,25}. La primera (R1) y la última (R5) repetición forman fibras amiloideas de forma individual y son críticas para la nucleación y polimerización³⁴. Por otro lado, las repeticiones R2, R3 y R4 contienen residuos de ácido aspártico y glicina que regulan la amiloidogenicidad, incluyendo el potencial tóxico de CsgA; mientras, la ausencia de dichas repeticiones en la proteína acelera su auto polimerización³⁴. Esta característica amiloidea en la proteína CsgA le permite ser evaluada mediante ensayos de Tioflavina T, microscopía electrónica de transmisión y tinción con rojo Congo^{26, 28, 35}.

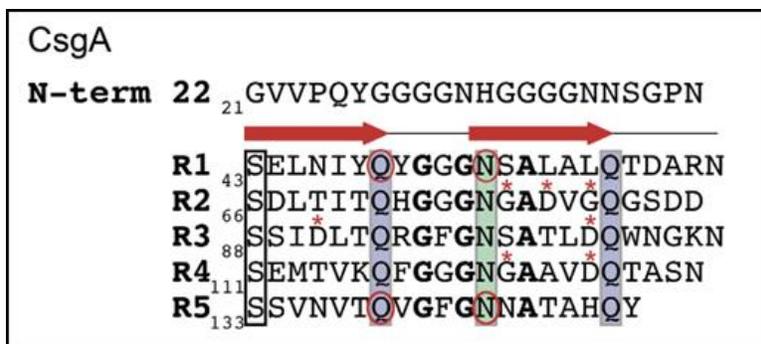


Figura 4. Secuencia lineal de aminoácidos que componen a la proteína CsgA. La proteína CsgA posee en una secuencia de 21 aminoácidos (Sec) y a partir del aminoácido 22 al 43 la secuencia denominada “nucleadora o N22”. Desde el aminoácido 44 al 153 es la secuencia que forma el núcleo amiloideo (R1 a R5). Los aminoácidos conservados y que estabilizan el núcleo amiloideo son Serina, Glutamina y Asparagina³³.

La predicción de la estructura terciaria de la proteína CsgA muestra las cinco unidades repetitivas organizadas en estructuras de lámina β cruzada, generando una alta estabilidad estructural definida como “cremallera estérica”³⁶. Este tipo de “cremallera” es formada por la interacción de residuos de Gln, Asn y Ser entre cada una de las hebras β posicionadas opuestamente. La principal interacción intermolecular en esta conformación estructural son fuerzas de van der Waals. Si, la estructura tridimensional de esta proteína es vista a través de su eje muestra estas interacciones como los dientes de un cierre³⁶. Esta estructura es la base de la estabilidad de las fibrillas amiloideas, incluyendo sus características de auto nucleación y su tendencia a formar estructuras polimórficas^{25,30}.

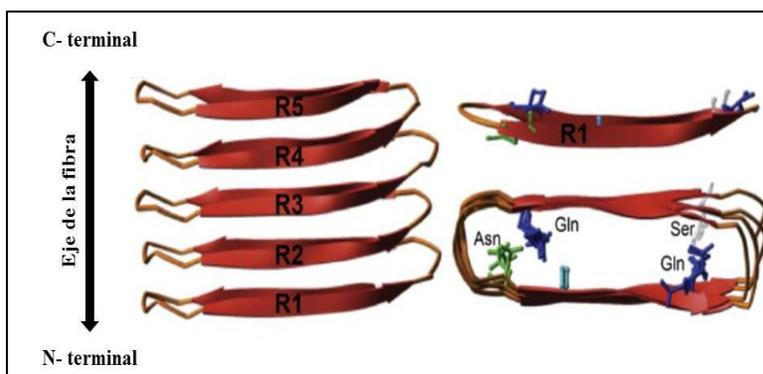


Figura 5. Predicción de la estructura tridimensional de CsgA. La predicción muestra el plegamiento de las cinco repeticiones de lámina β , así como, las interacciones entre glutamina, asparagina y serina. Estas interacciones tipo van der Waals forman la cremallera estérica y confieren la estabilidad a la estructura. Modificado de Evans y Chapman, 2013.

1.2 Antecedentes

En un estudio realizado en el Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se evaluó la distribución del gen *csgA* de la fimbria curli en una colección de cepas clínicas de UPEC³⁷. Esta evaluación mostro una alta distribución del gen *csgA* con más del 90% en los aislados clínicos (**Figura 6**)³⁷. Adicionalmente, esta alta distribución fue conservada en aislados clínicos de UPEC con perfil multidrogorresistentes y con una alta diversidad genética³⁷.

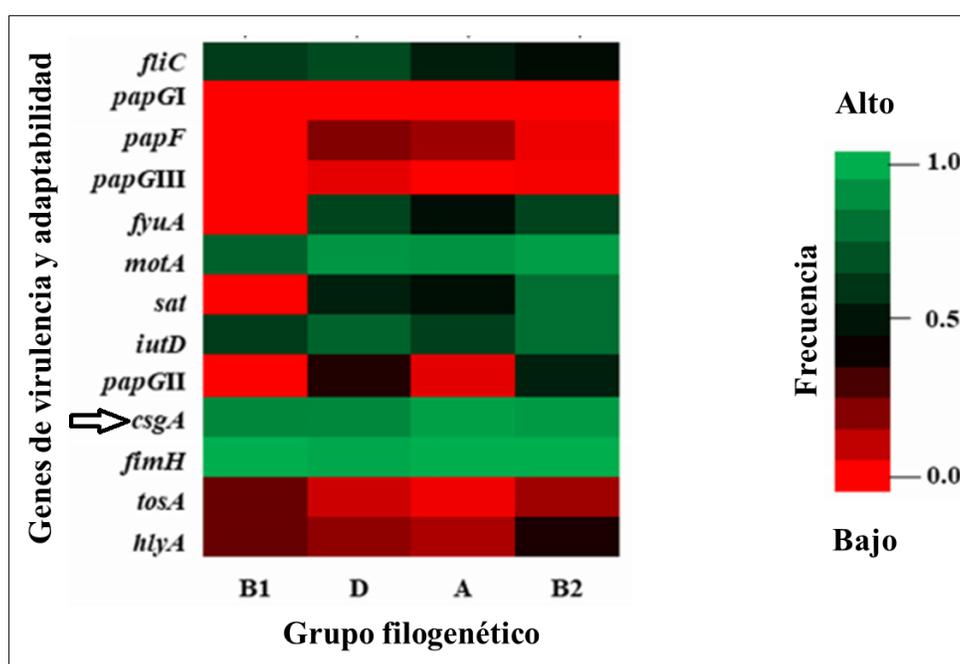


Figura 6. Distribución de los genes asociados a factores de virulencia y aptitud. El mapa de calor muestra la distribución de genes de virulencia según su grupo filogenético, donde el gen *csgA* se encuentra con una alta frecuencia en todos los aislados clínicos de UPEC. Modificada de Luna-Pineda y cols. 2018.

Recientemente, curli fue asociado a daño tisular y en la regulación de la respuesta inmune, además de potenciar la adhesión en vejiga y riñón³⁸. La delección del gen *csgA* muestra una disminución en la adherencia a células de vejiga, sugiriendo que la fimbria curli en UPEC está involucrada en el proceso de cistitis³⁹. Estos datos sugieren que las fimbrias curli potencian la interacción entre la bacteria y la célula de vejiga incluso mayor

que la fimbria tipo 1. Esta interacción es potenciada por la fosfoetanolamina de celulosa, también localizada en la superficie bacteriana de UPEC⁴⁰. Las fimbrias curli generan la liberación de citocinas mediante la interacción de csgA con TLR1/2, sin embargo, cuando curli se encuentra sobre expresada en la superficie de UPEC, puede ocultar a otras fimbrias importantes en la generación de citocinas. Probablemente, las fimbrias curli interfieren conformacionalmente con LPS, fimbria tipo 1 y/o fimbria P, evitando la interacción de estas con TLR4, disminuyendo la liberación de IL-6 principalmente. Estos datos proponen a la fimbria curli como un sistema de evasión de la respuesta inmune de UPEC en su hospedero³⁸. Sin embargo, el receptor específico en el tracto urinario no ha sido descrito.

En macrófagos, las fimbrias curli puede interaccionar con los receptores de reconocimiento de patrones de la familia Toll-like Receptors (TLR2) dando lugar a producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina-8 (IL-8), IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como óxido nítrico^{41,42}. El TLR1 también es necesario para facilitar el reconocimiento de estas fimbrias⁴⁰. La internalización de las fimbrias curli en los macrófagos por la activación del complejo TLR1/TLR2 es crítica para la activación del inflamosoma NLRP3.

El inflamosoma NLRP3 es un complejo proteico multimérico que al ser activado por f. curli inicia una forma inflamatoria de muerte celular y promueve la producción de IL-1 β vía Caspasa 1(**Figura7**)⁴³.

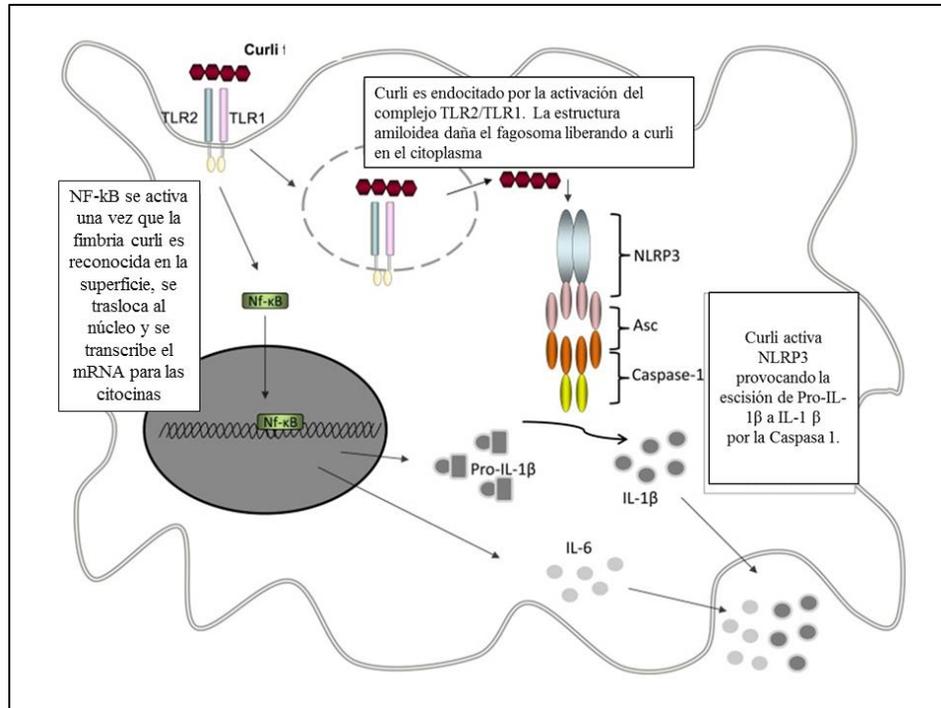


Figura 7. Esquema de la activación de TLR2/TLR1 por los curli. La internalización de curli está mediada por su interacción con el complejo TLR2/TLR1 y por la vía del fagosoma. La salida de curli del fagosoma permite interactuar y activar el inflamosoma NLRP3, promoviendo la producción de IL-1β. Una vía alterna es la interacción de TLR2/TLR1 y la activación de Nf-κB para la producción de IL-1β, incluyendo IL-6.

La proteína CsgA puede interactuar con proteínas de la matriz extracelular y de suero tales como: fibronectina, fibrinógeno, plasminógeno, activador tisular de plasminógeno, H- cininógeno, factor XII, antígeno MHC-I y β_2 -microglobulina^{44,45}. Además, las cepas de *E. coli* no UPEC productoras de fimbrias curli son capaces de activar el sistema de fase de contacto (factores VIII, IX, X, XI y XII) en plasma humano, generando un efecto anticoagulante^{46,47}.

Otro estudio utilizando las repeticiones R1 y R5 individualmente están asociadas a la interacción con proteínas de la matriz extracelular y de suero antes mencionadas⁴⁴. La generación de la proteína recombinante CsgA y sus motivos de interacción (lámina beta antiparalela) serán la base para la identificación del receptor de curli en el tracto urinario en un futuro.

1.3 Fundamentos de la metodología

La tecnología de ADN recombinante es una importante herramienta que permite identificar un gen o múltiples genes, cortarlo e insertarlo en el genoma de otro organismo. El término de tecnología de ADN recombinante fue introducido por el descubrimiento de las enzimas de restricción en bacterias por Werner Arber. Estas enzimas bacterianas cortan el ADN en sitios específicos a lo largo de la molécula permiten la degradación de moléculas de ADN virales extrañas; también se les ha dado una función tecnológica que se relaciona con el uso de tres herramientas principales: enzimas, vectores y organismo hospedador⁴⁸.

1.3.1 Extracción del ADN genómico de UPEC

La extracción consiste en el aislamiento y purificación del ADN genómico de UPEC; el cual servirá como cadena molde para la amplificación del gen *csgA*. Esta técnica está basada en las propiedades físicoquímicas de la molécula de ADN, tales como:

- 1) el ADN es de doble cadena de nucleótidos, formando una doble hélice
- 2) los nucleótidos están formados por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada
- 3) los grupos fosfato tienen carga negativa y son polares
- 4) esta carga negativa y polaridad le proporciona la propiedad de solubilidad al ADN
- 5) en presencia de un disolvente orgánico (etanol) permite la exposición de los grupos fosfato^{49,50,51}.

La interacción de la carga negativa del ADN en etanol a un ion monovalente (Na^+) genera la interacción entre las mismas moléculas y su precipitación. Mientras, esta misma carga neta negativa del ADN permite la unión a moléculas y/o matrices inorgánicas con carga positiva⁵⁰. Estas matrices retienen varios microgramos de ADN específicamente y permite separarlo de otros componentes de la bacteria⁵². La extracción de ADN genómico

en bacterias Gram negativas tiene cuatro principales pasos: lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN⁴⁷.

La lisis celular se realiza frecuentemente con enzimas como la lisozima, las proteínas se eliminan mediante un paso de precipitación con sal y finalmente el ADN es precipitado con isopropanol y etanol al 70%.

1.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica exponencialmente una secuencia específicamente (inserto) de ADN usando iniciadores que se unen a nucleótidos complementarios⁵¹.

Las ADN polimerasas requieren una cadena molde y un par de iniciadores que contengan un hidroxilo 3' y flanqueen la región blanco⁵³. La enzima empleada para la clonación es la ADN polimerasa “Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase” de “Thermo Scientific”⁵⁴. Las enzimas de PCR de alta fidelidad, por su baja tasa de error, se utilizan para técnicas que requieren alta precisión⁵⁴. La PCR sucede en tres etapas: la primera es la desnaturalización del ADN de doble cadena con aproximadamente 94°C en un tampón apropiado; la segunda etapa es el alineamiento, donde los iniciadores hibridan específicamente en su secuencia complementaria por el descenso de la temperatura entre 40 a 60 °C según la T_m de estos; por último, en la tercera etapa, la polimerasa se acopla en el extremo 3' del iniciador para el inicio de la replicación o extensión de la nueva cadena de ADN con una temperatura óptima de ~72°C (**Figura 8**)⁵³. El número de copias de ADN es obtenido por el número de ciclos durante la PCR.

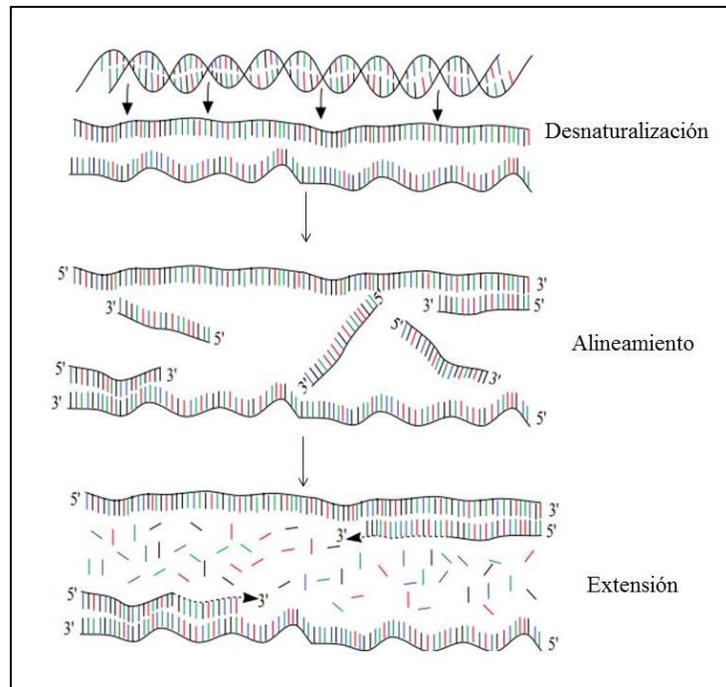


Figura 8. Esquema representativo de los pasos de la PCR. La desnaturalización (1) de la doble hélice provoca la separación de las cadenas, permitiendo así el alineamiento (2) de los iniciadores en la cadena molde. Finalmente, la polimerasa inicia la extensión (3) de la secuencia diana en el extremo 3' del cebador. Modificada de Andy Vierstraete 1999.

1.3.3 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica que consiste en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés⁵⁵. Mediante la electroforesis es posible separar fragmentos de ADN en función de su tamaño y carga; visualizándolos mediante una sencilla tinción⁵⁶. La tinción más comúnmente utilizada es con bromuro de etidio, un agente intercalante que tiene afinidad para unirse al ADN⁵⁰. El bromuro de etidio se excita con luz ultravioleta de onda corta, 254 nm, y emite su fluorescencia como luz visible, de color rosado-anaranjado, mediante la cual es posible observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel después la electroforesis⁵⁷.

1.3.4 Clonación Independiente de Ligación (LIC)

Los vectores de clonación son plásmidos a los que se les ha introducido un gen o fragmento de ADN denominado inserto. Los vectores pueden replicarse de manera autónoma e independiente del genoma de la célula hospedera. El resultado es la obtención de millones de copias de una molécula recombinante o clona molecular compuesta por ADN proveniente del inserto y del vector⁵⁸. Los vectores de expresión son aquellos cuyo objetivo es producir un transcrito para la síntesis de la proteína⁵⁹.

El vector pLATE31 es un vector de expresión que tiene en su secuencia un promotor de reconocimiento de la ARN polimerasa y el terminador de la transcripción del bacteriófago T7 para la expresión de genes heterólogos de *E. coli* (**Figura 9**). El control en la expresión depende de la presencia del gen que codifica para la proteína rop, la cual regula en número de copias del plásmido. El vector pLATE31 tiene como marcador de selección el gen de resistencia a ampicilina. Además, este es un vector lineal que forma extremos cohesivos, los cuales codifican para el sitio de unión a ribosoma y para la etiqueta 6xHis⁶⁰.

El sistema de clonación LIC utiliza tecnología direccional para transmitir y facilitar la clonación en un vector de expresión. LIC garantiza una alta eficiencia de clonación y elimina la necesidad de ligar y restringir los pasos de digestión enzimática⁶⁰. El método LIC utiliza la ADN polimerasa T4 para crear extremos de 14-21 nucleótidos específicos de cadena sencilla salientes y complementarios en los vectores e insertos de ADN. En este caso los insertos son secuencias del gen *csgA*.

La ADN polimerasa T4 tiene dos actividades enzimáticas: actividad polimerasa 5'–3' y actividad exonucleasa 3'–5'. La actividad exonucleasa elimina los nucleótidos de los extremos 3' del ADN mientras la actividad polimerasa restaura la cadena usando dNTPs y

la cadena de ADN complementaria como plantilla. Este tipo de clonación solo incluye dGTPs en la reacción, alcanzando el equilibrio de ambas actividades de la polimerasa T4, la exonucleasa 3'-5' y polimerasa 5'-3' cesan su actividad en la primera aparición de citosina en el cadena complementaria⁶⁰.

El vector modificado es introducido en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), llevando a cabo su transformación, en espera de la expresión de la proteína recombinante. Las células competentes son aquellas que poseen la capacidad de integrar ADN plasmídico pudiendo ser heredado por las nuevas células todas las veces en que la bacteria se multiplique. El estado de competencia es inducido generando por distintos medios distorsiones en la membrana celular que aumentan su permeabilidad⁶¹. Interesantemente, el vector no es ligado convencionalmente *in vitro*, sino, la formación de enlace covalente entre el vector y el inserto es realizado por el sistema de reparación de la célula bacteriana⁵⁵.

La transformación bacteriana comúnmente se realiza por electroporación, la cual utiliza pulsos eléctricos para permeabilizar transitoriamente las membranas celulares bacterianas y permite el paso del ADN plasmídico a través de las membranas⁶². El método de choque térmico también es utilizado para la transformación bacteriana.

La identificación de transformantes se realiza en medio LB suplementado con ampicilina, las colonias que contienen el vector pLATE 31 son capaces de crecer en este medio. Las colonias son verificadas por PCR en colonia, para confirmar la presencia del inserto de interés se espera un amplificado correspondiente al tamaño del vector pLATE31 más el inserto⁶⁰.

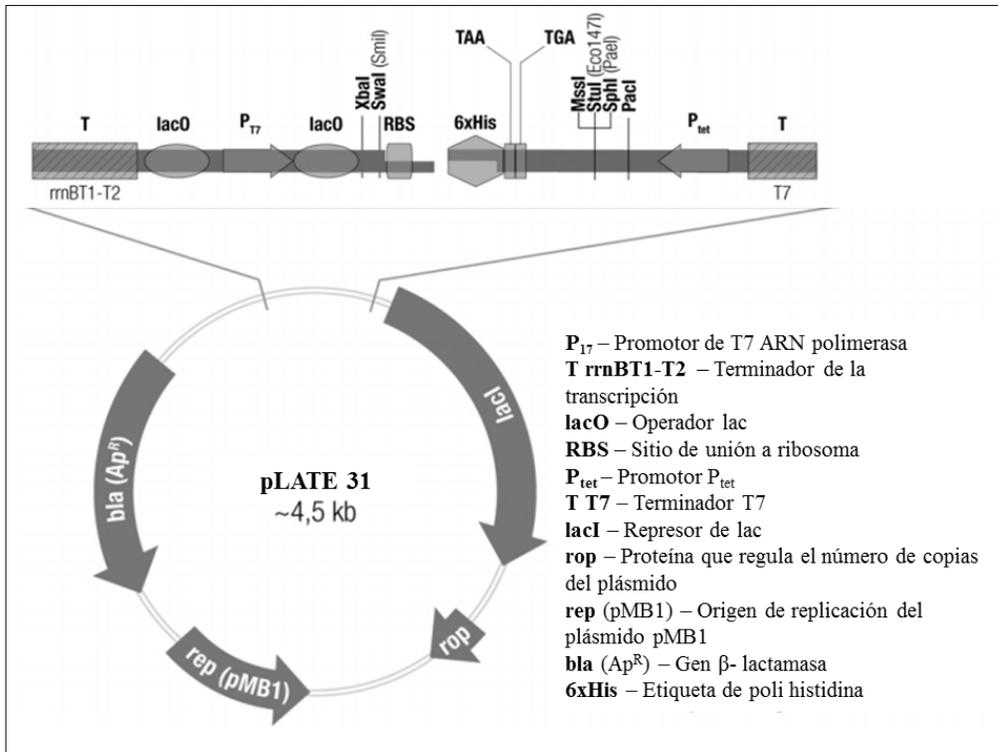


Figura 9. Elementos genéticos del vector pLATE31. El vector de expresión se encuentra lineal y contiene una secuencia de cadena sencilla con especificidad al inserto. El diagrama muestra los elementos que permiten la expresión de interés, el vector pLATE31 usa elementos del bacteriófago T7 para el control de la expresión de genes heterólogos en *E. coli*.

1.3.5 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a níquel

Las proteínas recombinantes son expresadas por *E. coli* transformadas con el vector de expresión y suelen tener un marcaje para facilitar su purificación, siendo uno de los más utilizados, la etiqueta de 6 histidinas (6xHis) en los extremos C o N terminal de la proteína de interés. Es no inmunogénica y a pH 8 son moléculas pequeñas, sin carga, que no afectan la secreción, compartimentalización o plegamiento de la proteína en la célula⁶³.

La etiqueta 6xHis es inmovilizada en superficies quelantes, tal como: la agarosa Níquel-Ácido nitrilotriacético (Ni-NTA)⁶⁴. Esta capacidad es indispensable para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado⁵⁸. El NTA es un quelante tetradentado, que ocupa cuatro de los seis sitios de unión al ligando del ion níquel, mientras dos sitios libres interactúan con la etiqueta 6xHis (**Figura 10**)⁶³. Los residuos de histidina

en la etiqueta 6xHis tienen un pKa de aproximadamente 6.0 y se encontrarán protonados si el pH se reduce (pH 4.5-5.3). En estas condiciones, los residuos 6xHis que están unidos a la proteína ya no podrán unirse a los iones de níquel y se disociarán de la resina Ni-NTA⁶³.

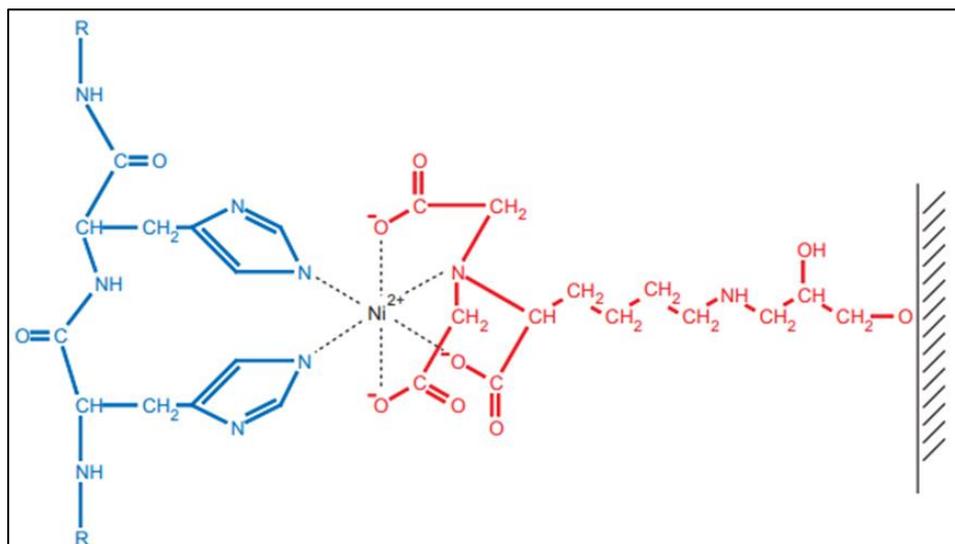


Figura 10. Interacción entre los residuos de histidina y la matriz Ni-NTA. La cromatografía de afinidad por metal inmovilizado tiene su fundamento en la propiedad quelante del ácido nitrilotriacético que interactúa con cuatro de las seis uniones de ligando en el níquel, mientras las dos restantes se acomplejan con los residuos de histidina (“The QIAexpressionist” 2003).

1.3.6 Evaluación de las proteínas por SDS PAGE

La electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica empleada para la separación de proteínas de acuerdo con su peso molecular.

Las proteínas migran a través de una matriz de tamizado bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado⁶⁵. En condiciones reductoras (mercaptoetanol o ditioneol [DTT]) y presencia de un detergente (SDS) se rompen los puentes disulfuro y se genera una carga negativa en las proteínas⁶⁶. Las proteínas amiloideas resisten a agentes desnaturizantes o detergentes y es necesario utilizar un tratamiento con ácido fórmico para su despolimerización. Este ácido al 90% es capaz de despolimerizar sin la degradación

química de las proteínas, sino por la interrupción de las interacciones iónicas⁶⁷.

1.3.7 “Western Blotting”

La técnica de inmunotransferencia o “Western blotting” es un sistema rápido con una alta especificidad en la detección y caracterización de proteínas. Esta técnica se fundamenta en la capacidad de un anticuerpo para reconocer a su antígeno. El “Western blotting” requiere de un procedimiento previo de SDS-PAGE de las proteínas y su posterior transferencia irreversible a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)⁶³. La transferencia se basa en el mismo principio que SDS-PAGE en el que se carga un campo eléctrico para mover las proteínas negativas hacia un electrodo positivo. La transferencia puede ocurrir en condiciones húmedas o semisecas⁶⁸. La membrana se trata con un anticuerpo primario específico a la proteína blanco formando así un complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente, la membrana se trata con un anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP y específico al anticuerpo primario. La membrana se revela comúnmente con el método de detección por quimioluminiscencia cuando la enzima HRP cataliza la oxidación de sustratos por el peróxido de hidrógeno, lo que da como resultado un producto coloreado o fluorescente y la liberación de luz como subproducto de la reacción^{69,70}.

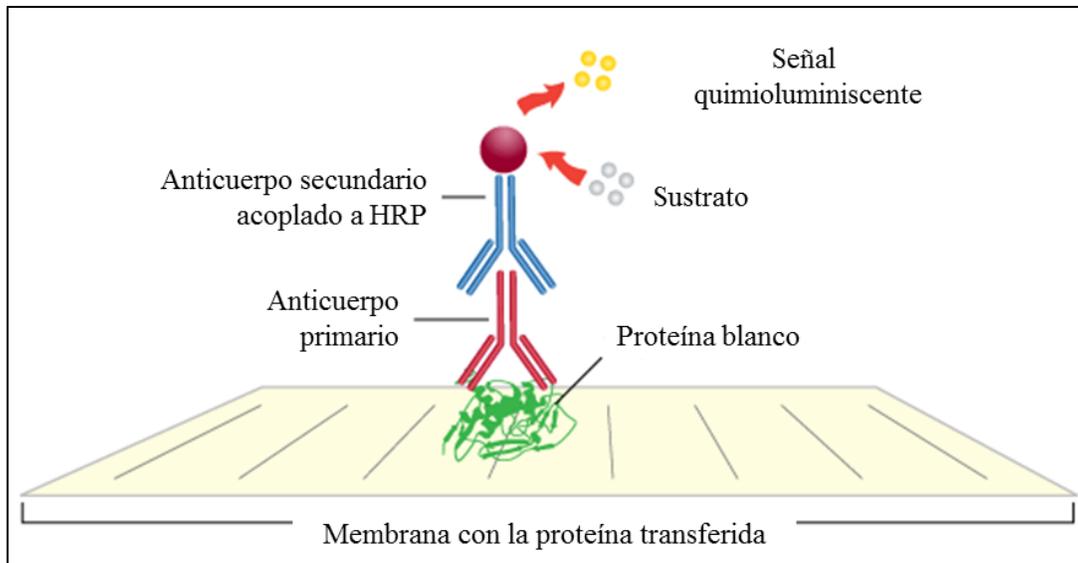


Figura 11. Detección de proteínas por “Western Blotting”. El anticuerpo primario se une a la proteína blanco y posteriormente forma un complejo con el anticuerpo secundario acoplado a HRP. La oxidación del sustrato por enzima HRP dará lugar a una señal quimioluminiscente.

2. Planteamiento del problema de investigación

Las ITU son un problema de salud pública y UPEC es el principal agente causal de estas infecciones². El mecanismo de patogenicidad de UPEC inicia con la adherencia de ésta al uroepitelio, mediante apéndices superficiales definidos como fimbrias. El gen *csgA* de la fimbria curli está ampliamente distribuido en las cepas clínicas de UPEC. La importancia de la fimbria curli en la adhesión y colonización de UPEC fue descrita en células de vejiga. Recientemente, los curli fueron descritos como un factor de aptitud de UPEC, siendo estos un apoyo en la colonización y en la modulación de la respuesta inmune en el tracto urinario. La proteína estructural CsgA interacciona con proteínas de la matriz extracelular y del suero, sin embargo, el receptor en el tracto urinario, no ha sido descrito.

2.1 Justificación

La purificación de la proteína recombinante CsgA y sus motivos estructurales serán la base para en un futuro lograr identificar el receptor específico de la fimbria curli en el tracto urinario. Los motivos o estructuras supersecundarias son la combinación de varias unidades simples de estructura secundaria que están organizadas con una geometría específica, en este caso, láminas β antiparalelas⁷¹. La proteína CsgA es insoluble por su característica amiloidea, por esta razón, obtener los motivos estructurales solubles permitirá realizar ensayos de interacción con proteínas de membrana de células de vejiga y riñón. Estos datos apoyarán en la descripción del mecanismo de patogenicidad de UPEC en el tracto urinario.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Establecer un sistema de expresión en *E. coli* para purificar una proteína recombinante CsgA y/o sus motivos estructurales, como una molécula soluble

2.2.2 Objetivos particulares

- Realizar el análisis bioinformático para la amplificación de las secuencias de interés
- Generar los plásmidos recombinantes para la expresión de la proteína CsgA y sus motivos estructurales
- Transformar los plásmidos recombinantes en células competentes de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3)
- Estandarizar las condiciones de purificación de la proteína CsgA y sus motivos estructurales

3. Materiales y Métodos

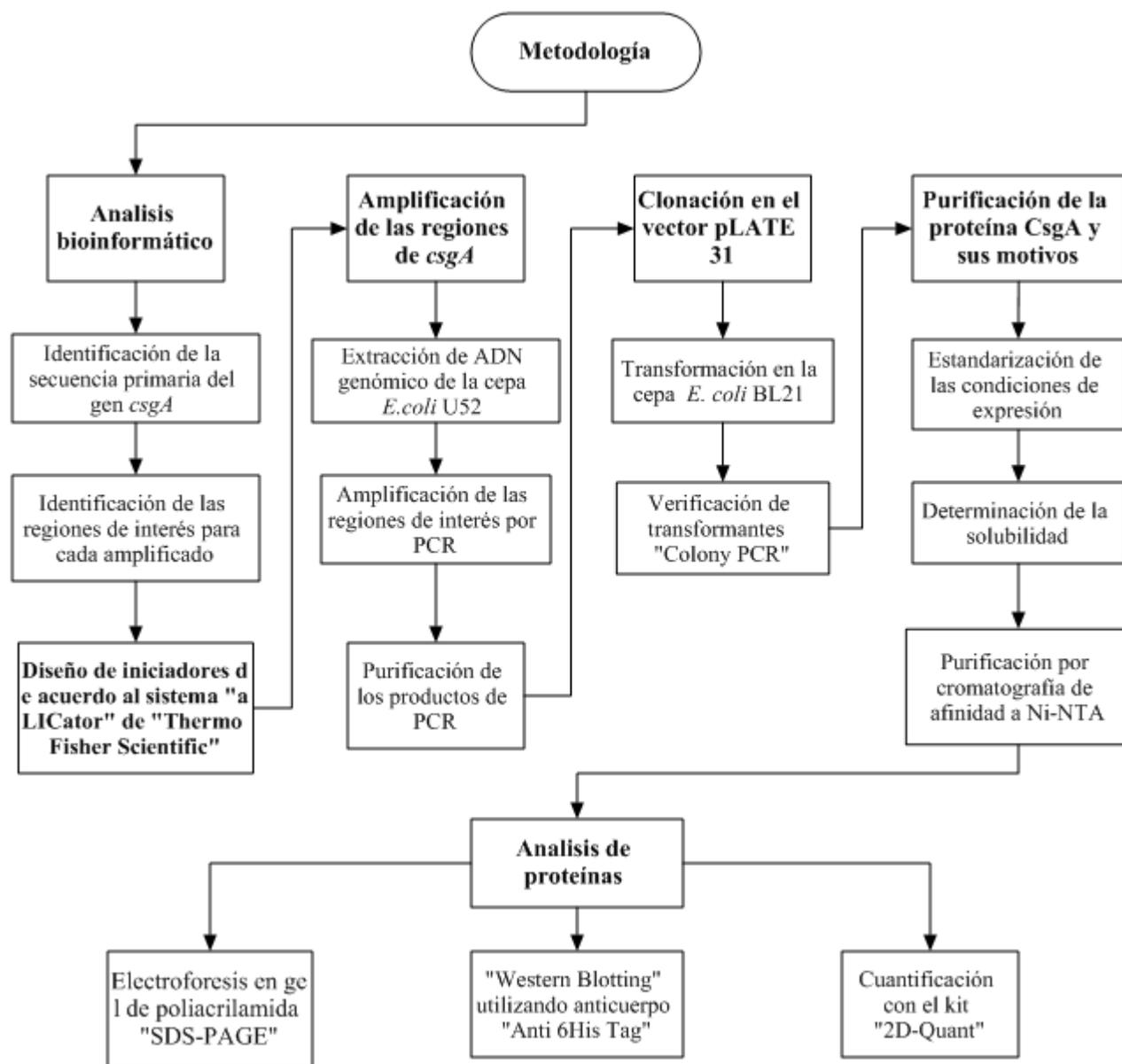


Figura 12. Diagrama de flujo. En este proyecto se siguió la metodología sintetizada en el presente diagrama de flujo.

3.1 Análisis bioinformático

La secuencia primaria del gen *csgA* se obtuvo de la base de datos del NCBI, mientras la secuencia de aminoácidos se generó con la herramienta “Translate” de ExPasy. En la secuencia primaria de *csgA* se identificó la región de secreción, nucleación y las 5 repeticiones de láminas beta antiparalelas (**Figura 13**)⁷². La proteína CsgA conteniendo la secuencia nucleadora N22 fue definida como “CsgA N”, mientras la proteína CsgA solo conteniendo las repeticiones R1 a R5 fue definida como “CsgA R” (**Figura 13**). El motivo 1 (M1) incluyó desde la región N22 hasta la repetición 2 y el motivo 2 (M2) las repeticiones 2 y 3, mientras, el motivo 3 (M3) las repeticiones 4 y 5 (**Figura 13**).

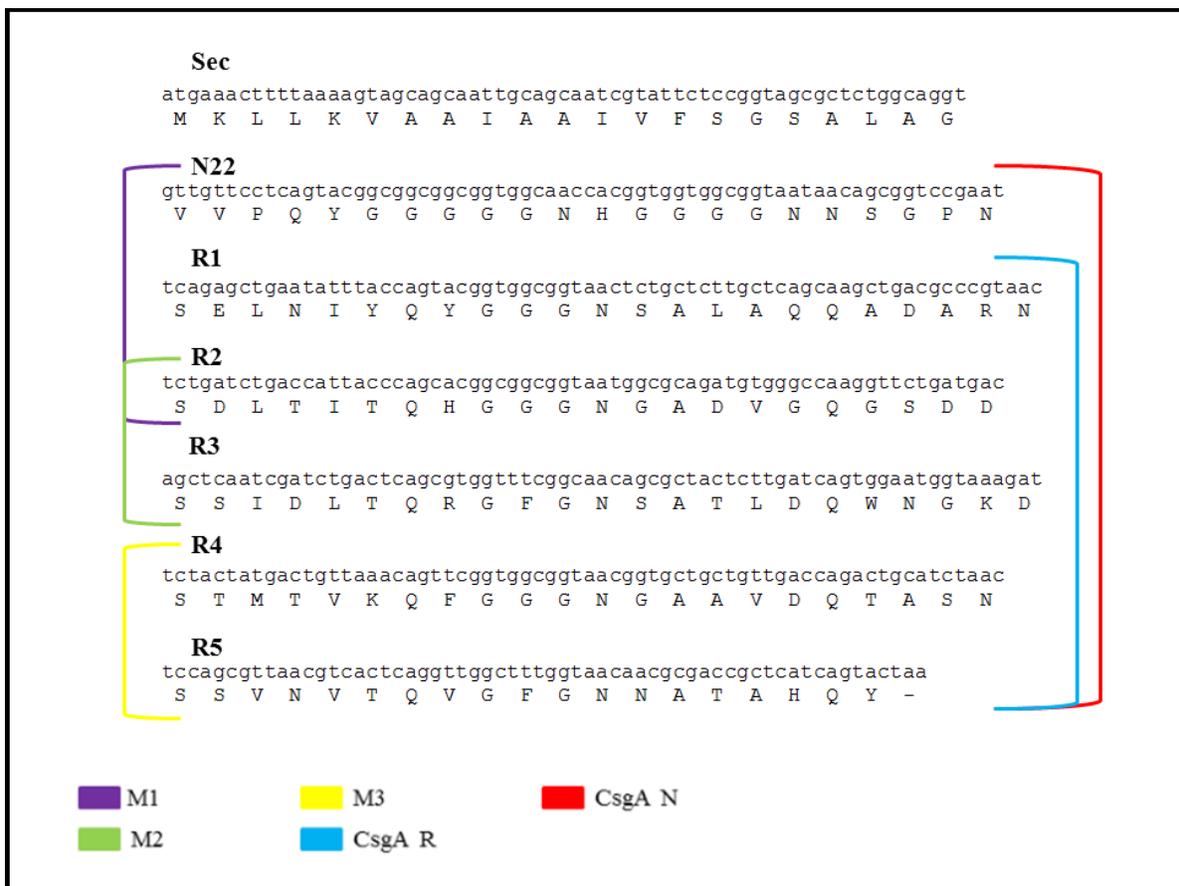


Figura 13. Esquema que representa los fragmentos del gen *csgA*. El diseño de los iniciadores para la amplificación de estas secuencias permitirá insertarlas en un vector de clonación.

Los iniciadores se diseñaron de acuerdo al sistema “aLICator” de “Thermo Scientific” y cada par fue analizado con la herramienta oligo analyzer de IDT para conocer el tamaño, porcentaje de GC y temperatura de fusión (T_m). Así mismo fue evaluada la tendencia de cada par de iniciadores a formar dímeros y otras estructuras secundarias. Los motivos fueron seleccionados por sus propiedades fisicoquímicas y de interacción, mientras una revisión amplia de otros estudios fue también realizada. La predicción de las propiedades fisicoquímicas de CsgA y sus motivos fue realizada con la herramienta "ProtParam" de ExPASy.

3.2 Amplificación de *csgA* y las regiones que codifican sus motivos estructurales

La amplificación fue realizada por PCR utilizando como cadena molde el ADN genómico de la cepa clínica UPEC 529U-0712. La cepa fue sembrada en caldo Luria-Bertani (LB) e incubada toda la noche en agitación a 37°C. El ADN genómico fue extraído siguiendo el protocolo del kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de Promega basado en una purificación de cuatro pasos; El primer paso es la lisis de las células, el segundo una digestión de RNasa. A continuación, las proteínas celulares se eliminan mediante un paso de precipitación con sal, que precipita las proteínas pero deja el ADN genómico de alto peso molecular en solución. Finalmente, el ADN genómico se concentra y desala mediante precipitación con isopropanol⁷³. La concentración y pureza del ADN obtenido fueron evaluadas por espectrofotometría de UV de espectro completo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, mientras la calidad con electroforesis en gel de agarosa.

Las condiciones de reacción establecidas fueron las siguientes: 30 ciclos de predesnaturalización por 2 minutos a 98°C, desnaturalización por 15 segundos a 98°C, alineamiento por 30 segundos a 60°C, extensión 30 segundos a 72°C y una extensión final de 1 minuto a 72°C.

Los productos de PCR fueron purificados siguiendo el protocolo del kit “DNA Clean & Concentrator Kit” de “Zymo Research” que facilita la eliminación de ADN polimerasas y dNTP libres⁷⁴. El ADN eluido fue utilizado para la clonación en el vector de expresión pLATE31.

3.3 Reacción de clonación en el vector pLATE31

La clonación se realizó de acuerdo al protocolo del manual “aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System” de “Thermo Scientific”⁶⁰. La mezcla de reacción de LIC para obtener los extremos cohesivos incluyó:

- 1) 0.1 picomoles de producto de PCR purificado
- 2) 2 μ L de 5X tampón LIC
- 3) 1 μ L de polimerasa T4 (1 U/ μ L)
- 4) agua libre de nucleasas cuanto baste para 10 μ L

La mezcla de reacción LIC fue incubada durante 5 minutos y esta fue detenida adicionando 0.6 μ L de EDTA (0.5 M). La reacción de alineamiento conteniendo el inserto con los extremos cohesivos fue adicionada con 1 μ L del vector pLATE31 e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Posterior a la incubación, la reacción de alineamiento fue concentrada para su transformación en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) por el método de electroporación.

3.4 Transformación del vector de expresión por electroporación

Las bacterias para ser transformadas por electroporación, necesitan en un estado electrocompetente.

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) fue cultivada por toda la noche en 5mL de caldo LB a 37°C y en agitación continua. El subcultivo de la cepa fue realizado en 20 mL de caldo LB y fue incubado en agitación a 37°C por 3 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 540nm. El cultivo fue centrifugado 10 min a 4000 rpm a 4°C para obtener el paquete celular y este fue lavado 4 veces con agua inyectable estéril para eliminar las sales y moléculas del medio de cultivo.

La mezcla de vector e inserto fue incubada a 4°C para favorecer la unión y alineamiento de la construcción con la bacteria. Esta suspensión contenía 100 µL de bacterias con 3µL de reacción de clonación y fue colocada en una celda de electroporación. La celda conteniendo la suspensión fue electroporada aplicando un pulso de 1800 V usando un " ECM 399 Electroporation System" de "BTX Harvard Aparatus". Inmediatamente, la suspensión celular fue recuperada en 1 mL de caldo LB atemperado e incubada una hora para su recuperación. Las bacterias transformadas fueron sembradas en una placa de agar LB suplementado con ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C.

3.5 Verificación de transformantes por PCR en colonia

Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por su crecimiento en LB suplementado con ampicilina; las cuales contienen el vector pLATE31 con su gen asociado a la resistencia a ampicilina. Estas colonias transformantes fueron verificadas también por PCR para confirmar la presencia del inserto del ADN clonado. Cada colonia obtenida fue colocada en la mezcla de reacción (PCR Master Mix de Promega) conteniendo iniciadores

específicos para el vector. La PCR fue realizada durante 25 ciclos con las siguientes condiciones: predesnaturalización por 3 minutos a 95°C, desnaturalización por 30 segundos a 94°C, alineamiento por 30 segundos a 58°C y un tiempo de extensión de 1 minuto a 72°C. La amplificación fue evaluada un gel de agarosa 1.5 % mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio, esperando detectar bandas correspondientes con la talla molecular del vector.

3.6 Verificación de la expresión de proteínas y ensayos de solubilidad

La expresión de proteínas es regulada por el operón *lac* y es inducida por isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Este compuesto es un análogo no hidrolizable de la lactosa capaz de unirse al represor LacI⁷⁵.

Las bacterias transformadas con su correspondiente vector de expresión fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. A partir de este cultivo, 50 μL fueron inoculados en 10 mL de caldo LB e incubados a 37°C durante 3 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 540nm.

Una alícuota de 5 mL fue obtenida y utilizada como control sin inducir; mientras el resto fue suplementado con 1 mM de IPTG e incubada en agitación a 37°C durante 5 horas.

Ambas muestras (inducida y sin inducir) fueron centrifugadas a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos y el paquete celular fue resuspendido en 3μL de tampón de carga para SDS-PAGE (62.5 mM Tris-HCl, 25% glicerol, 2% SDS, β mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol). La muestra fue lisada por ebullición durante 10 minutos y 12μL fueron analizados por SDS-PAGE al 14%. Esta técnica fue efectuada en una cámara de electroforesis vertical “Mini-PROTEAN Tetra Cell” a 100V durante dos horas utilizando una fuente de poder “PowerPac HC High- Current Power Supply” de Bio Rad.

Bajo las mismas condiciones, ambos pellets (inducido y sin inducir) fueron resuspendidos en 500 µl de tampón de sonicación (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol; pH 8) suplementado con 1 mg/mL de lisozima. La lisis completa de las células bacterianas fue realizada por sonicación con 65% de amplitud durante 5 minutos, utilizando intervalos de pulsos de 10 segundos. El lisado fue centrifugado a 4°C durante 10 min a 4000 rpm y el paquete celular obtenido fue considerado la fracción insoluble y el sobrenadante definido como la fracción soluble. Ambas fracciones fueron analizadas por duplicado usando SDS-PAGE, de los cuales, uno fue teñido con azul de Coomassie para evaluar la expresión de la proteína y el otro utilizado para Western blotting.

3.7 “Western blotting”

El gel de poliacrilamida fue transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las almohadillas fueron humedecidas en tampón de transferencia (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.1% SDS) y una fue colocada en la celda de electro transferencia semi húmeda “Trans-Blot SD Semi-Dry Cell” de Bio-Rad. La membrana de PVDF fue activada con metanol y colocada encima de la almohadilla, sobre esta, fue colocado el gel, seguido de la segunda almohadilla. La fuente de poder “PowerPac HC High- Current Power Supply” fue ajustada para el corrimiento a 20V por una hora.

La membrana de PVDF fue teñida con rojo Ponceau para confirmar la transferencia, lavada y bloqueada con TBS-leche al 5% durante toda la noche a 4°C. La membrana bloqueada fue lavada tres veces con TBS-Tween al 0.05% e incubada por una hora con 1 mL del anticuerpo primario IgG de ratón “Anti-6X His tag®” de abcam diluido 1:1000. El anticuerpo primario fue lavado tres veces e incubado durante una hora con 1mL de anticuerpo secundario “Rabbit Anti-Mouse IgG H&L (HRP)” acoplado a HRP en dilución

1:1000 con TBS. El revelado fue realizado con el kit “Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate” y visto con el sistema de imagen “FUSION-FX7-SPECTRA”⁷⁶.

3.8 Purificación de la proteína CsgA y sus motivos estructurales

Los resultados obtenidos en los ensayos de solubilidad determinaron las condiciones de expresión y purificación de las proteínas CsgA N y R, incluyendo los motivos 1 al 3. Interesantemente los motivos M1 y M3 fueron purificados en condiciones nativas, mientras las proteínas CsgA N y R, incluyendo el M2 fueron purificados por condiciones desnaturalizantes.

La purificación en condiciones nativas fue realizada como se describe a continuación:

- 1) Las cepas de *E. coli* BL21 con los plásmidos pLATE-*csgAM1* y pLATE-*csgAM3* fueron cultivadas e inducidas bajo las condiciones establecidas en la sección de “Verificación de la expresión de proteínas y ensayos de solubilidad”
- 2) El cultivo inducido fue centrifugado a 4°C a 5,500 rpm durante 15 minutos y el paquete celular fue pesado
- 3) Por cada gramo de bacteria se le adicionaron 5 mL de tampón de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazol; pH 8) suplementado con 1 mM de lisozima e incubando 30 minutos en hielo
- 4) La solución de bacterias fue sonicada en hielo durante 10 minutos con intervalos de 10 segundos de pulsos a una amplitud de 65%
- 5) La solución bacteriana sonicada fue suplementada con 100 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C

6) El sobrenadante fue separado e incubado en agitación con 3 mL de la resina Ni-NTA durante 1 hora a 4°C

7) La resina Ni-NTA fue empaquetada en una columna de vidrio para su proceso de lavado y elución. Los lavados se realizaron por triplicado con 10 mL de solución de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol; pH 8), mientras la elución fue realizada con 5 mL de solución de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol; pH 8) y almacenadas a -20°C hasta su uso.

La purificación en condiciones desnaturalizantes fue realizada como se describe a continuación:

1) Las cepas de *E. coli* BL21 con los plásmidos pLATE-*csgaM2*, pLATE31-*csgaN* y pLATE31-*csgaR* fueron cultivadas e inducidas bajo las condiciones establecidas en la sección de “Verificación de la expresión de proteínas y ensayos de solubilidad”

2) El cultivo inducido fue centrifugado a 5,500 rpm durante 15 minutos a 4°C y el paquete celular fue obtenido

3) El paquete celular fue resuspendido en 20 mL de tampón desnaturalizante (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 6 M GuHCl; pH 8) e incubado durante 3 días a temperatura ambiente

4) Posterior a la desnaturalización de todos los componentes bacterianos, esta solución fue sonicada y empaquetada en una columna de vidrio para su proceso de lavado y elución. Los lavados se realizaron por triplicado con 10 mL de solución de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol; pH 8), mientras la elución fue realizada con 5 mL de solución de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol; pH 8) y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Las proteínas obtenidas de ambas purificaciones fueron evaluadas por SDS-PAGE al 14% a 100V durante dos horas y “Western blotting”, mientras la cuantificación de estas fue realizada usando el kit "2-D Quant" de "GE Healthcare" el cual funciona precipitando cuantitativamente las proteínas y dejando sustancias interferentes en la solución. El ensayo se basa en la unión específica de los iones de cobre a las proteínas, las proteínas precipitadas se resuspendieron en una solución que contiene cobre y el cobre no unido se mide con un agente colorimétrico. Por lo tanto, la intensidad del color es inversamente proporcional con la concentración de proteínas.⁷⁷.

3.9 Diálisis

Las proteínas obtenidas en condiciones desnaturalizantes fueron replegadas mediante diálisis en las condiciones descritas por Luna-Pineda y colaboradores en 2016; usando un gradiente de urea de 7 a 1 M en tampón de diálisis (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM y EDTA 0,5 mM). La incubación se realizó durante 24 h a 4°C y las proteínas fueron conservadas en tampón de diálisis sin urea a -70° C⁷⁸.

3.10 Despolimerización con ácido fórmico

La proteína CsgA, así como sus motivos estructurales, posee estructura amiloidea y el ácido fórmico permite la desagregación de estas proteínas amiloideas para su corrimiento por SDS-PAGE. Las proteínas fueron secadas por una hora al vacío a 65°C utilizando el equipo "SAVANT ISS110 SpeedVac Concentrator" de Thermo Electron Corporation. Posteriormente, fue añadido el ácido fórmico al 90% en proporción 1:5 e incubado por 24 horas a -70°C. La mezcla proteína/ ácido fórmico fue secada al vacío y a 65°C durante dos horas hasta lograr la evaporación total del líquido, en seguida, la pastilla fue resuspendida en

12 μ L del tampón 1 (20mM Tris-HCl, 2% SDS y 50mM DTT)⁶⁷.

El buffer de carga para PAGE fue añadido a la muestra y neutralizado con Tris-HCl 1M hasta alcanzar el vire de amarillo a azul para su análisis por SDS- PAGE. Adicionalmente, el SDS-PAGE para los motivos estructurales fue modificado, adicionando 5 μ L de una solución alcohólica del colorante rojo Congo al 0.2% antes del tratamiento con el ácido fórmico. Los geles fueron preparados al 18% con 30% urea, siguiendo el protocolo "Very Low Molecular Weight Proteins Electrophoresis Protocol" recuperado de bio-101⁷⁹.

4. Resultados

4.1 Diseño de iniciadores y predicción de propiedades fisicoquímicas

Los iniciadores obtenidos a partir de la secuencia de CsgA presentaron una longitud entre 42 y 44 bases, los cuales incluyen las secuencias complementarias al vector pLATE31 de 19 bases para el 5' y de 21 bases para el 3'. El análisis de las secuencias de cada oligonucleótido proporcionó datos como: su temperatura de fusión (T_m) y el porcentaje de enlaces Guanina-Citosina (%GC) descritos en la **Tabla 1**. Estos datos fueron empleados para establecer las condiciones de PCR.

Tabla 1. Iniciadores para la amplificación de las distintas regiones del gen *csgA*.

Nombre	Secuencia	Tamaño (bases)	%GC	T_m (°C)
F- N22	AGAAGGAGATATAACTATGGGTGTTGTTTCCTCAGTACGGCGGCG	44	50	67.5
F- R2	AGAAGGAGATATAACTATGTCTGATCTGACCATTACCCAGCACG	44	43.2	64.3
F- R4	AGAAGGAGATATAACTATGTCTACTATGACTGTAAACAGTTCG	44	34.1	60.2
R- R2	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTCATCAGAACCTGGCCAC	42	59.5	71.4
R- R4	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTTAGATGCAGTCTGGTCAAC	42	54.8	69.1
R- R5	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGACTGATGAGCGGTCGCGTT	42	59.5	71.9

La predicción de las características fisicoquímicas de cada variante de la proteína CsgA incluye el peso molecular, número de aminoácidos y punto isoelectrico teórico descritos en la **Tabla 2**. Estos datos fueron esenciales para establecer las condiciones de la SDS-PAGE en cada proteína y variables de esta.

Tabla 2. Predicción de las propiedades fisicoquímicas de la proteína CsgA y sus motivos estructurales.

Proteína	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	pI teórico
CsgA N	140	14.1	5.72
CsgA R	117	12.1	5.58
M1	76	7.5	5.78
M2	53	5.6	5.63
M3	49	5.1	7.06

4.2 Amplificación de *csgA* y las regiones que codifican sus motivos estructurales

La secuencia que codifica para la proteína CsgA R fue amplificada y clonada en un estudio previo⁷⁸. La secuencia para la proteína CsgA N es de 396 pares de bases (pb), sin embargo, los extremos complementarios al vector pLATE 31 aumentaron el fragmento amplificado con 436 pb (**Figura 14A**). Las secuencias que codifican para los motivos estructurales de CsgA fueron específicos y tuvieron los siguientes pesos moleculares: M1 mostró un amplificado de 244 pb y M2 con 173 pb, mientras, el amplicón M3 mostró 163 pb (**Figura 14B**).

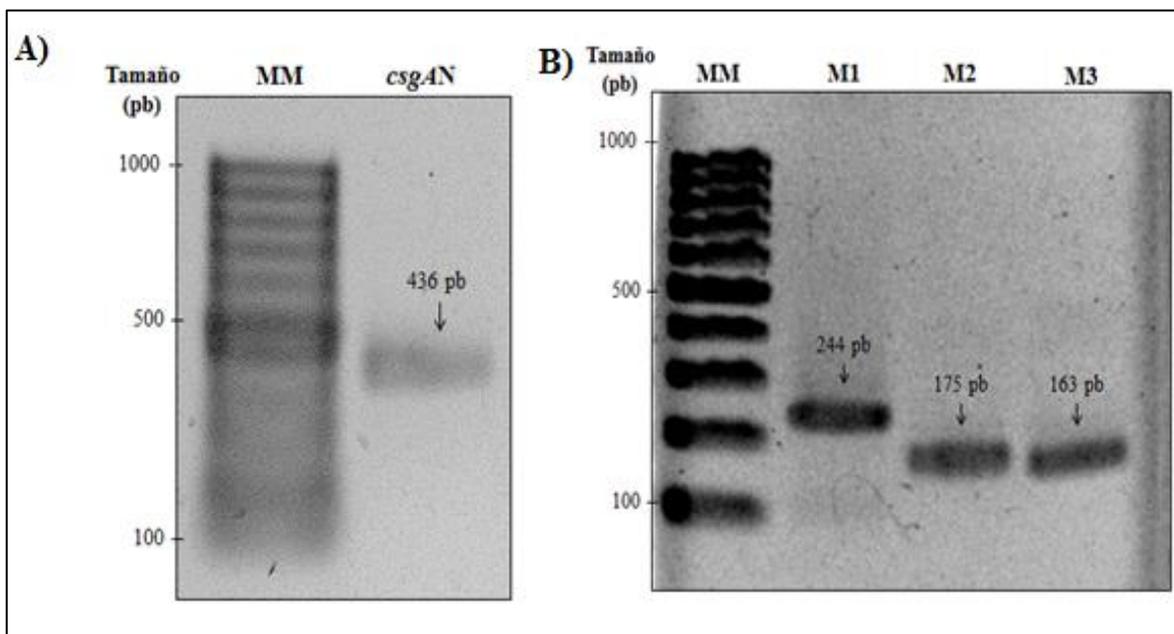


Figura 14. Amplificación de las secuencias que codifican para la proteína CsgA N y sus motivos estructurales. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los diferentes amplicones generados por PCR. A) El carril MM corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) y el carril *csgAN* corresponde al amplicón *csgAN* de 436 pb. B) El carril MM corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb, mientras, los motivos estructurales están incluidos en los carriles M1, M2 y M3 con amplicones de 244, 175 y 163 pb, respectivamente.

Los amplicones obtenidos fueron purificados por columna y mostraron el mismo patrón al obtenido en el gel de agarosa previo. La cuantificación de los diferentes amplicones mostraron las siguientes concentraciones: *csgA N* con 34.7 ng/ μ L, M1 90.37 con ng/ μ L, M2 con 70.7 ng/ μ L y M3 con 37 ng/ μ L. Adicionalmente, la relación A_{260}/A_{280} fue obtenida entre 1.7 y 1.9, indicativo de la pureza de los diferentes amplicones. Los amplicones purificados fueron utilizados para la clonación en el vector pLATE31, los cuales fueron definidos como: 1) pLATE31-*csgAN*; 2) pLATE31-*csgAM1*; 3) pLATE31-*csgAM2*; y 4) pLATE31-*csgAM3*.

4.3 Verificación de la clonación y transformación de los vectores de expresión

La verificación de transformantes consiste en identificar las colonias en las que se insertó el vector correctamente amplificando la secuencia del plásmido. El análisis por PCR de las 4 colonias obtenidas para el vector pLATE31-*csgAN* mostró amplicones específicos sólo en las colonias 2 y 3 con un amplificado de 601 pb (**Figura 15**).

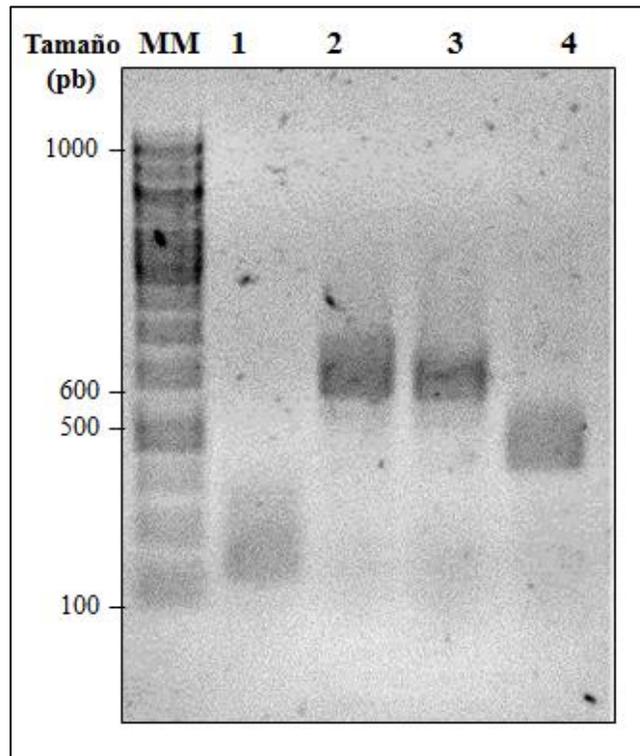


Figura 15. Verificación por PCR de probables transformantes con el vector de expresión pLATE31-*csgAN*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los amplicones generados por PCR en colonia. En el carril definido como MM se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder), mientras los carriles numerados (1-4) corresponden a las colonias transformadas. Las colonias 2 y 3 presentan amplicones específicos de 601 pb y fueron definidos como transformantes positivas al vector pLATE31-*csgAN*.

Cinco colonias probables transformantes con el vector pLATE31-*csgA*M1 fueron también evaluadas por PCR, mostrando solo 3/5 colonias el amplicón específico de 449 pb (**Figura 16A**). Mientras, cuatro colonias probables transformantes con el vector pLATE31-*csgA*M2 y cinco con pLATE31-*csgA*M3 mostraron los amplicones de 380 y 368 pb, respectivamente correspondientes al tamaño del vector insertado en cada caso (**Figura 16B**).

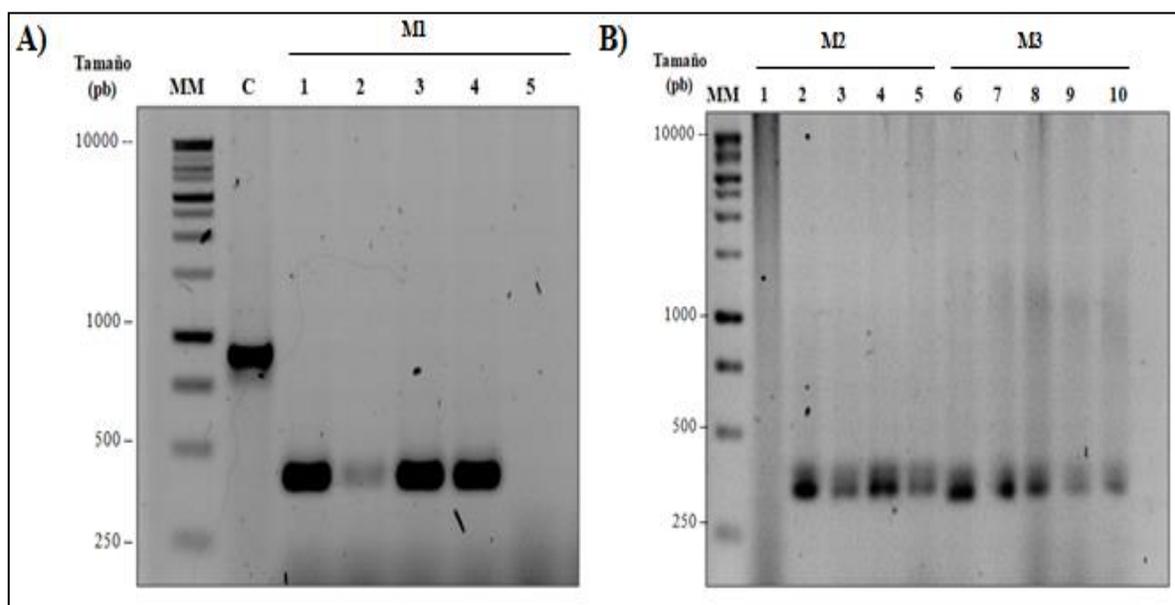


Figura 16. Verificación por PCR de las probables transformantes con los vectores pLATE31- *csgA* M1, pLATE31- *csgA* M2 y pLATE31- *csgA* M3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los amplificados generados por PCR en colonia. A) El carril MM corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb (1 Kb Plus DNA Ladder) y el carril C al plásmido control pLATE31-Cm. Los carriles 1-5 corresponden a colonias transformadas con el vector pLATE31-*csgA*M1 y las colonias positivas (1,3 y 4) muestran un amplicado de 449 pb. B) El carril marcado como MM corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb (1 Kb Plus DNA Ladder), mientras los carriles 1-5 corresponden a las colonias transformadas con el vector pLATE31-*csgA*M2. Los carriles 6-10 corresponden a colonias transformadas con el vector pLATE31-*csgA*M3 y las colonias positivas muestran amplicados de 380 y 368 pb, respectivamente.

4.4 Determinación de la solubilidad y condiciones de expresión de las proteínas

La proteína CsgA R fue detectada en la fracción insoluble, confirmando lo reportado previamente⁷⁸. Esta proteína tiene un peso molecular aproximado de 12.1 kDa, sin embargo, la evaluación con “Western blotting” mostró una banda de aproximadamente 36 kDa en la fracción insoluble, probablemente por la formación de agregados amiloideos (**Figura 17A**). Mientras, la evaluación por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie mostró la sobre expresión de esta proteína en el peso molecular identificado por “Western blotting” en la fracción insoluble posterior a la inducción con IPTG (**Figura 17B**).

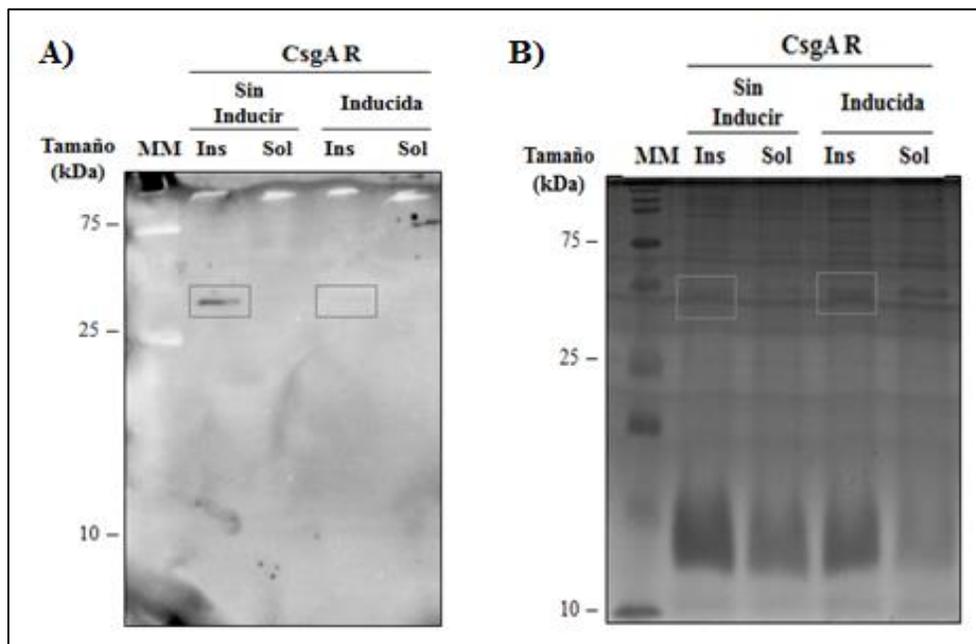


Figura 17. Ensayo de solubilidad para la proteína CsgA R. Análisis de las fracciones solubles e insolubles por “Western Blotting” y SDS-PAGE para la proteína CsgA R. A) Membrana de “Western Blotting” usando anticuerpo anti 6x his tag y revelado por quimioluminiscencia. B) SDS- PAGE y posterior tinción azul de Coomassie de las fracciones soluble e insoluble con o sin inducción con IPTG 1 mM.

Bajo las mismas condiciones, la proteína CsgA N fue identificada en la fracción insoluble con un peso molecular de aproximadamente de 38 kDa por la probable oligomerización de esta proteína (**Figura 18**). Sin embargo, tres bandas poco visibles fueron identificadas en la fracción insoluble con peso molecular de aproximadamente 14, 38 y 84 kDa (**Figura 18**).

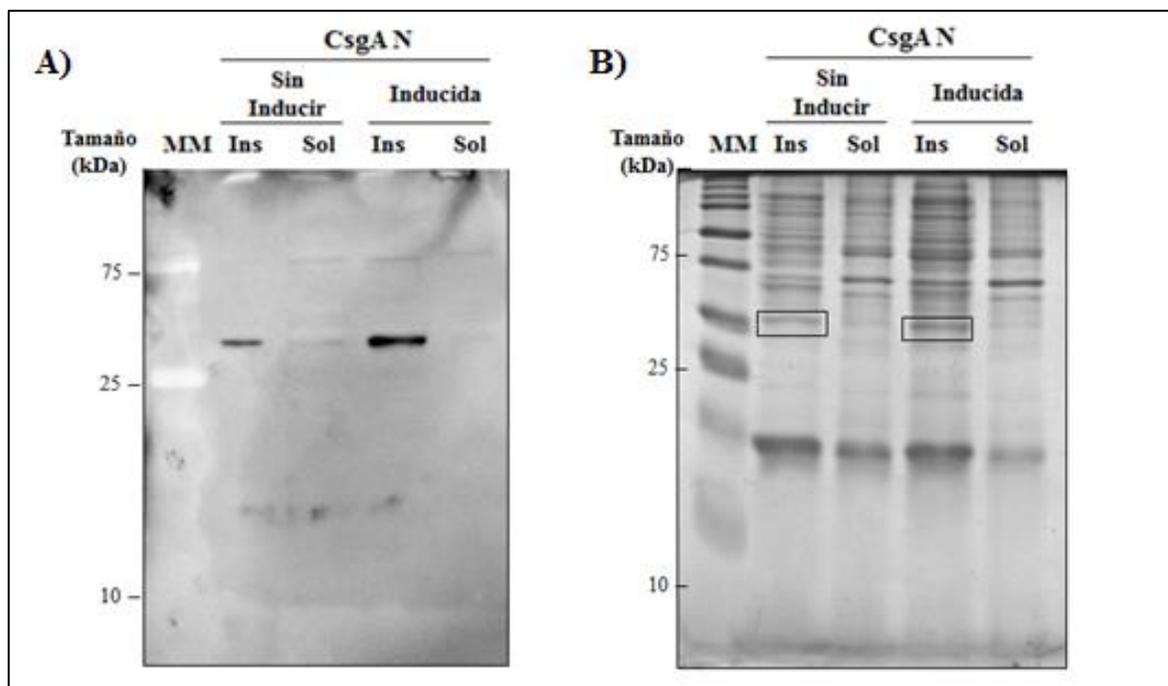


Figura 18. Evaluación de la solubilidad para la proteína CsgA N. Análisis de las fracciones solubles e insolubles por Western Blotting y SDS-PAGE para la proteína CsgA N. A) Membrana de Western Blotting usando anticuerpo anti 6x his tag y revelado por quimioluminiscencia. B) SDS- PAGE y posterior tinción azul de Coomassie de las fracciones soluble e insoluble con o sin inducción con IPTG 1 mM.

Por otro lado, los motivos M1, M2 y M3 de la proteína CsgA fueron identificados en ambas fracciones (soluble e insoluble) con diferentes conformaciones oligoméricas (**Figuras 19-21**). Sin embargo, solo en las fracciones solubles se identifica una banda de bajo peso molecular para los motivos M1 y M2 de la proteína CsgA (**Figura 19 y 21**). Las bandas de menor peso molecular del motivo M3 fueron identificadas en la fracción

insoluble (**Figura 21**). Estos datos fueron la base para la selección de la purificación en condiciones nativas para los motivos estructurales de la proteína CsgA.

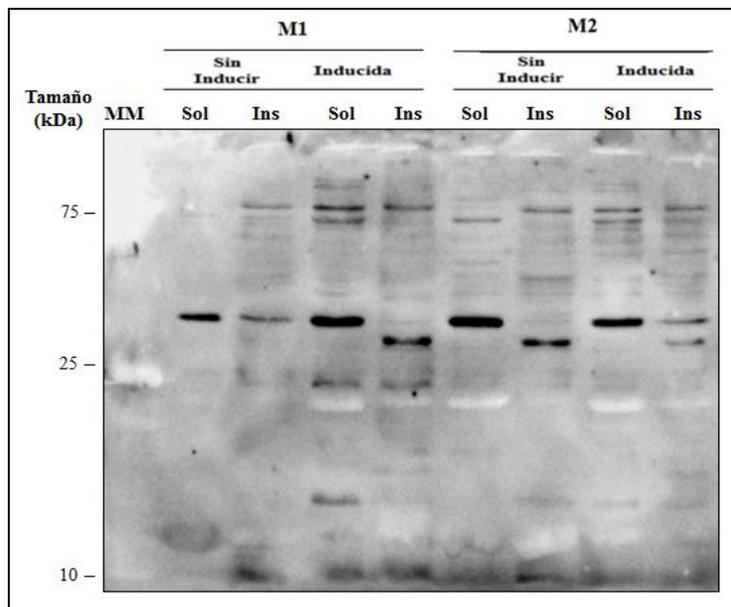


Figura 19. Evaluación por Western blotting de la solubilidad de los motivos estructurales M1 y M2. Análisis de Western blotting usando un anticuerpo anti 6x his tag y revelado por quimioluminiscencia. En ambos casos se evaluó las fracciones solubles e insolubles sin inducir e inducidas con 1 mM de IPTG.

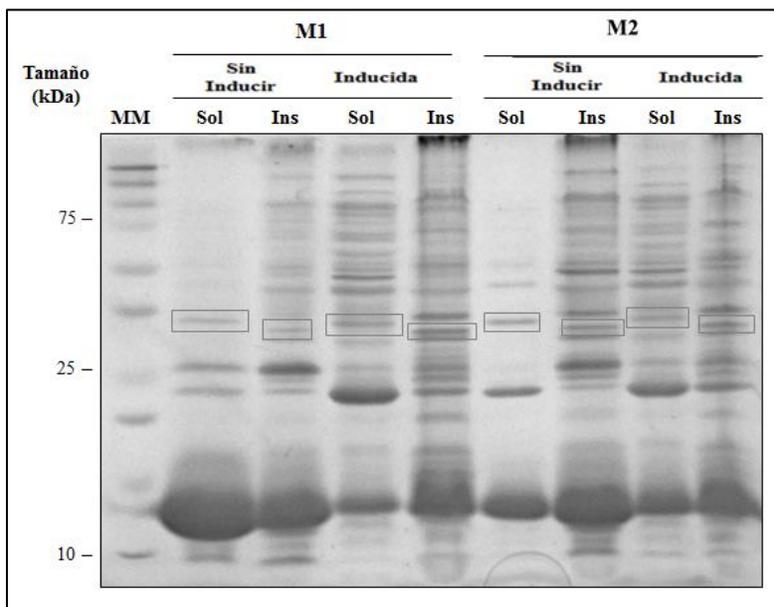


Figura 20. Evaluación por SDS-PAGE de la solubilidad de los motivos estructurales M1 y M2. Análisis de SDS- PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie para las fracciones solubles e insolubles de los motivos estructurales M1 y M2 de la proteína CsgA. En ambos casos se evaluaron las fracciones solubles e insolubles sin inducir e inducidas con 1 mM de IPTG.

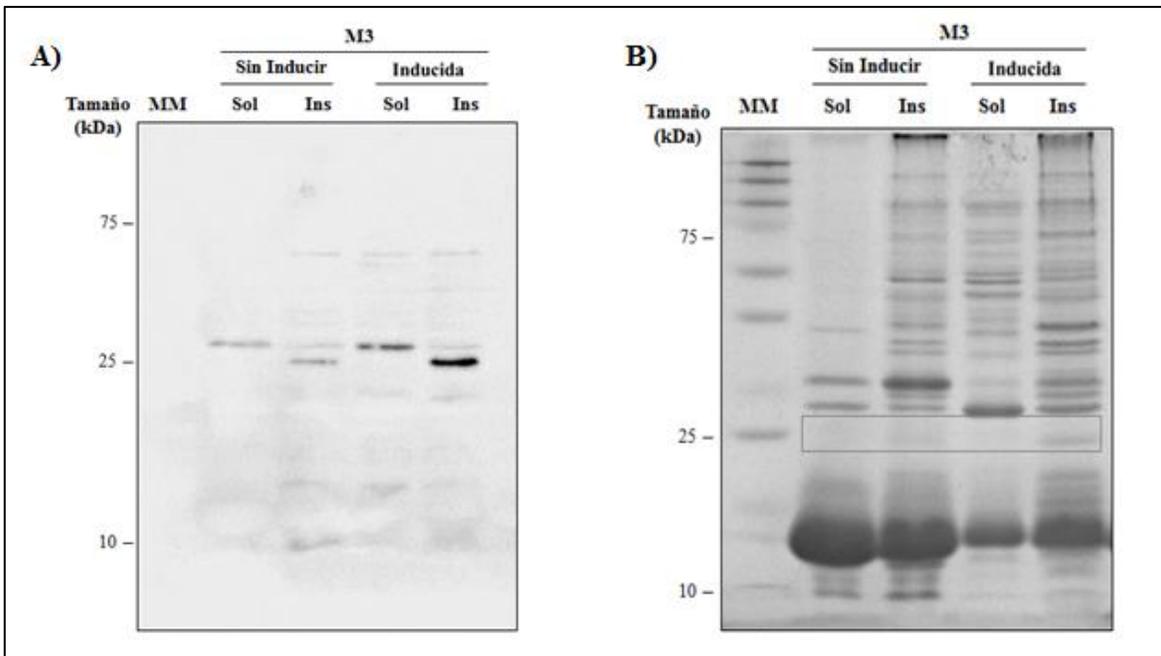


Figura 21. Evaluación de la solubilidad del motivo estructural M3. Análisis de las fracciones solubles e insolubles por “Western Blotting” y SDS-PAGE para el motivo estructural M3 de la proteína CsgA. A) Membrana de “Western Blotting” usando anticuerpo anti 6x his tag y revelado por quimioluminiscencia. B) SDS- PAGE y posterior tinción azul de Coomassie de las fracciones soluble e insoluble con o sin inducción con IPTG 1 mM.

4.5 Purificación de la proteína CsgA y sus motivos estructurales

Todos los motivos estructurales de la proteína CsgA fueron purificados en condiciones nativas, sin embargo, solo los motivos M1 y M3 fueron identificados posterior al análisis por SDS-PAGE (**Figura 22**). Interesantemente, la elución del motivo M1 mostró cinco bandas de diferente peso molecular, indicando la formación de agregados proteicos oligoméricos (**Figura 22A**). Mientras, la elución del motivo M3 mostro un mayor grado de agregación con 9 o más bandas identificadas posterior al análisis de SDS-PAGE (**Figura 22B**).

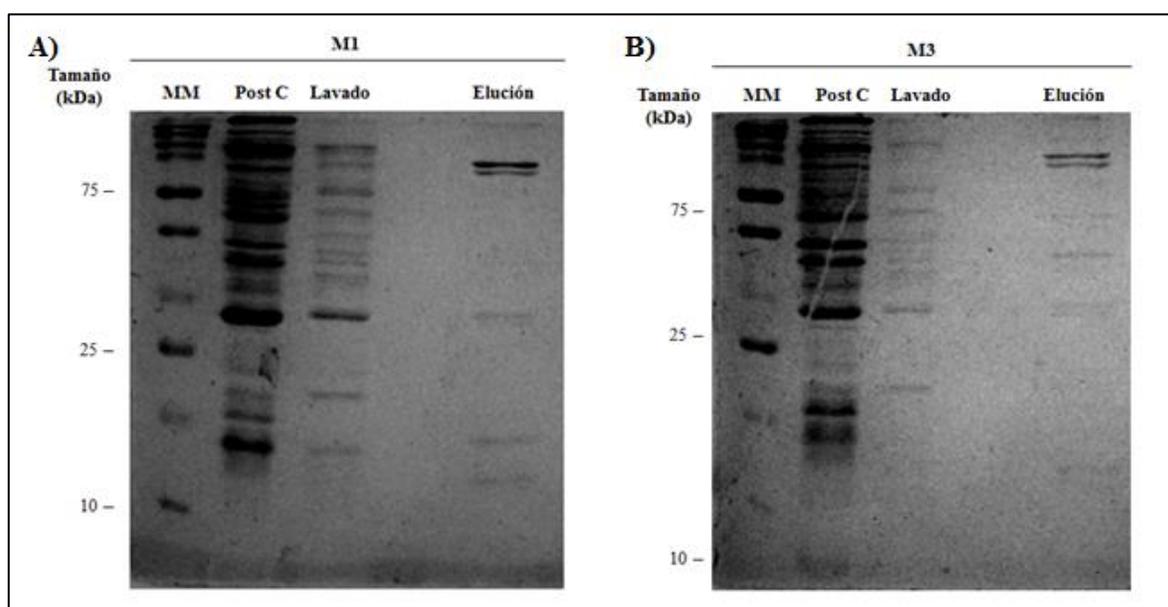


Figura 22. SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación bajo condiciones nativas de los motivos estructurales M1 y M3. SDS- PAGE al 14% y posterior tinción con azul de Coomassie de los motivos estructurales M1 (A) y M3 (B). En ambos casos el carril MM corresponde al marcador de peso molecular dual color de BioRad, mientras los siguientes carriles fueron definidos como a continuación: post columna (Post C), lavado y elución de los motivos estructurales de la proteína CsgA.

El motivo estructural M2 fue purificado nuevamente usando condiciones desnaturizantes, incluyendo las proteínas CsgA R, CsgA N (**Figuras 23 y 24**). La elución del motivo M2

mostró bandas de diferentes pesos moleculares con una banda de mayor intensidad de aproximadamente 20 kDa, sugiriendo la formación de agregados, aun bajo las condiciones desnaturizantes (**Figura 23**). La elución de la proteína CsgA N mostró un menor número de bandas, pero de mayor peso molecular bajo las mismas condiciones de purificación (**Figura 23**).

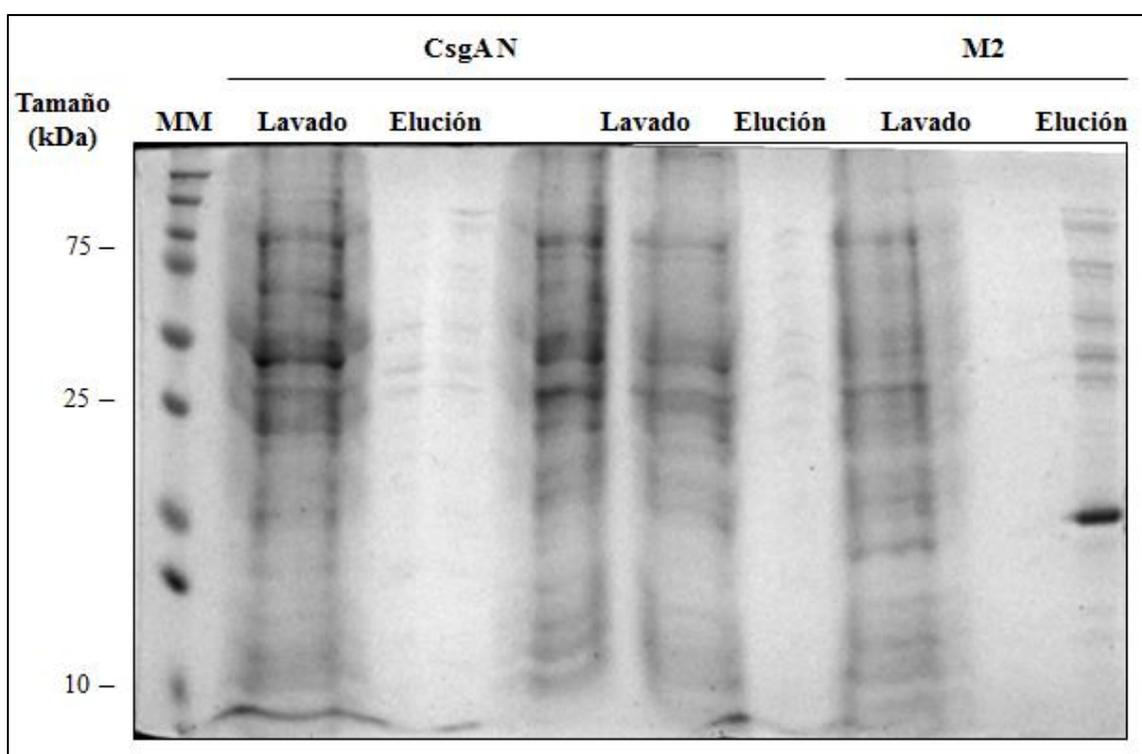


Figura 23. SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación bajo condiciones desnaturizantes de la proteína CsgA N y su motivo estructural M2. SDS- PAGE al 16% y posterior tinción con azul Coomassie de la proteína CsgA N y su motivo estructural M2. El carril MM corresponde al marcador de peso molecular dual color de BioRad, mientras los siguientes carriles fueron definidos como a continuación: post columna (Post C), lavado y elución para cada caso.

Interesantemente, la elución de la proteína CsgA R mostró una banda de aproximadamente 12 kDa bajo las mismas condiciones de purificación (**Figura 24**). Estos datos indican que las condiciones con el agente caotrópico fue capaz de desnaturalizar a la proteína CsgA R y mantenerla en estado monomérico (**Figura 24**).

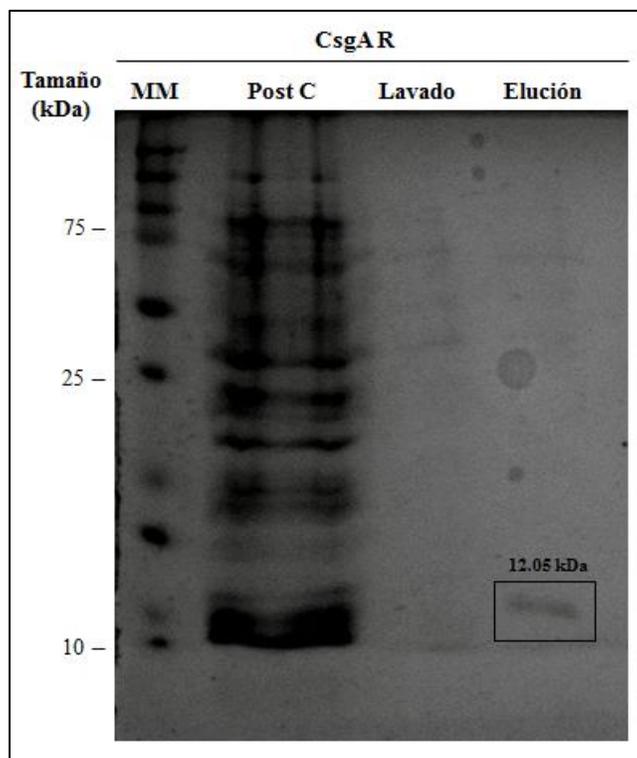


Figura 24. SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación bajo condiciones desnaturalizantes de la proteína CsgA R. SDS- PAGE al 16% y posterior tinción con azul Coomassie de la proteína CsgA R. El carril MM corresponde al marcador de peso molecular dual color de BioRad, mientras los siguientes carriles fueron definidos como a continuación: post columna (Post C), lavado y elución de la proteína CsgA R.

4.6 El tratamiento con ácido fórmico despolimeriza los agregados proteicos

El ácido fórmico ha sido descrito como un agente que permite la despolimerización de proteínas con características amiloideas tal como la proteína CsgA. El tratamiento de la proteína CsgA N con este ácido mostró que la despolimerización es dependiente del tiempo (Figura 25).

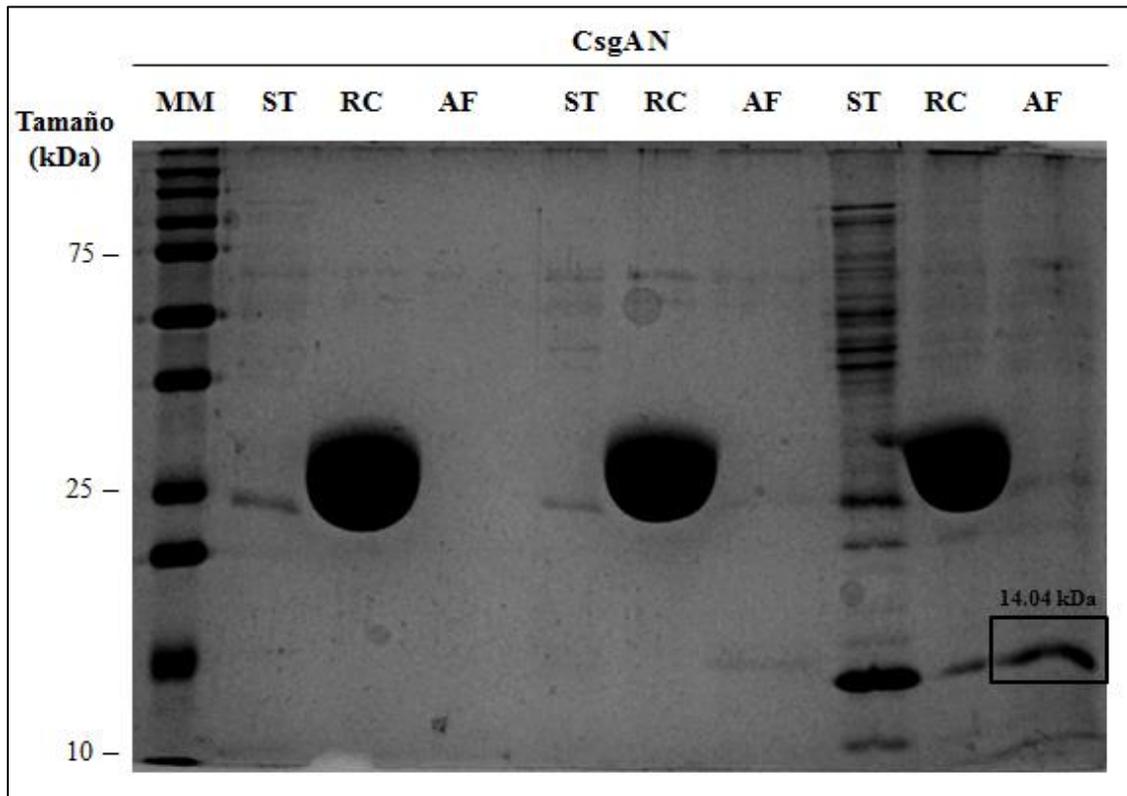


Figura 25. Tratamiento de la proteína CsgA N con rojo Congo y ácido fórmico al 90%. Análisis de SDS-PAGE 16% con posterior tinción con azul de Coomassie, previamente las muestras fueron tratadas con 50 μ L de ácido fórmico, secadas y resuspendidas en amortiguador de carga 2X. El carril MM corresponde al marcador de peso molecular, mientras el carril ST corresponde a las proteínas sin tratamiento; el carril RC corresponde al tratamiento previo con rojo Congo; y el carril AF corresponde al tratamiento previo con ácido fórmico.

Los motivos estructurales fueron también tratados con ácido fórmico al 90% y solo bajo esta condición se pudo identificar los motivos estructurales M1, M2 y M3 en estado monomérico con un peso molecular de 7.5, 5.6 y 5.1 kDa, respectivamente (**Figura 26**).

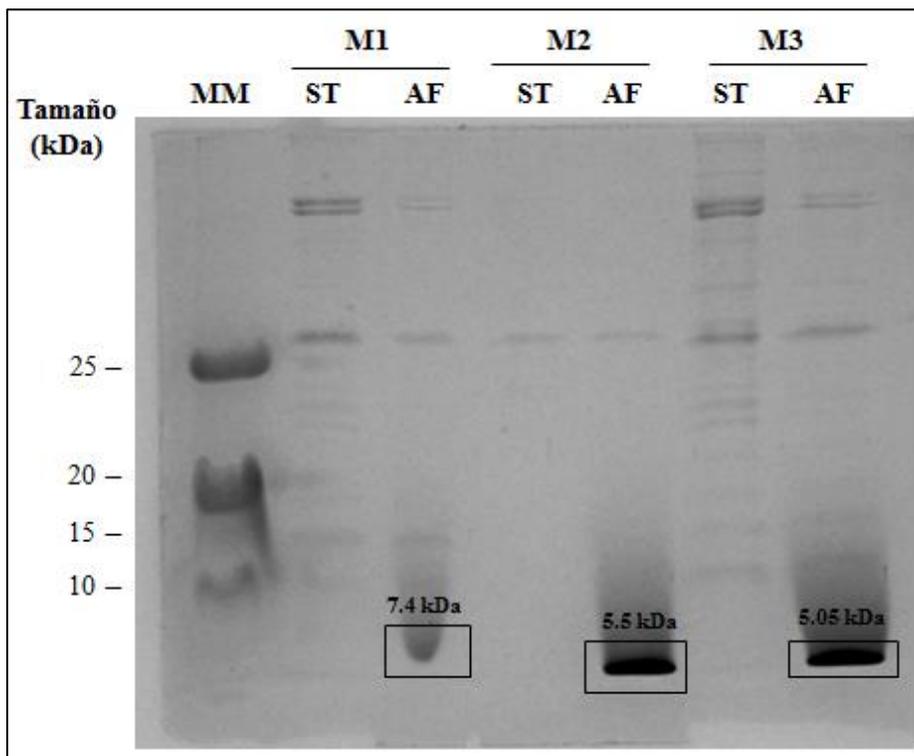


Figura 26. Tratamiento de los motivos estructurales de la proteína CsgA con ácido fórmico al 90%. Análisis de SDS-PAGE 16% con posterior tinción con azul de Coomassie, previamente las muestras fueron tratadas con 50 μ L de ácido fórmico, secadas y resuspendidas en amortiguador de carga 2X. El carril MM corresponde al marcador de peso molecular, mientras el carril ST corresponde a las proteínas sin tratamiento y el carril AF corresponde al tratamiento previo con ácido fórmico.

5. Discusión

La proteína CsgA, subunidad estructural de la fimbria curli, establece una primera interacción con la célula hospedadora, mejorando la colonización de UPEC en el tracto urinario³⁸. El encontrar una variante de CsgA soluble permitiría profundizar en el estudio del papel esta fimbria en el mecanismo de patogenicidad de UPEC y en un futuro identificar su receptor en el tracto urinario. La solubilidad de las proteínas se encuentra estrechamente relacionada con su correcto plegamiento y función.

En este estudio fue generado un sistema para la clonación y expresión de la proteína recombinante CsgA, así como sus motivos estructurales. Los iniciadores para cada variante de la proteína fueron diseñados con las regiones descritas para el sistema LIC⁶⁰. En todos los diseños, la región Sec que codifica para el péptido señal fue eliminada. El péptido señal (Sec) se encuentran en el extremo N-terminal de las proteínas destinadas a ser secretadas⁸⁰. Esta secuencia generalmente se elimina en la proteína madura o también llamada procesada, permitiendo la presencia de la proteína CsgA en el espacio citoplasmático para su posterior purificación.

La capacidad de CsgA de unirse a proteínas ha sido descrita en otros estudios. Los péptidos sintéticos responsables de la unión a proteínas de suero humano fueron descritos por Olsén y colaboradores⁴⁴. Estos péptidos se encuentran en la región amino y carboxilo de CsgA, abarcando N22-R1 y R4-R5; además, estos fueron descritos como solubles⁴⁴. La proteína CsgA y sus variantes tuvieron diferencias importantes en la expresión y solubilidad. CsgA N, CsgA R y M2 fueron insolubles, las cuales fueron identificadas en cuerpos de inclusión. La característica amiloidea de CsgA fue confirmada por SDS-PAGE en este estudio y por otros grupos de investigación, formando agregados intracelulares^{60,81}. Los cuerpos de inclusión fueron solubilizados con hidrócloruro de guanidina, un agente

caotrópico que rompe interacciones electrostáticas entre las proteínas y permite la desnaturalización de CsgA⁸². Adicionalmente, las proteínas fueron dializadas para replegar después de la purificación y eliminar contaminantes para su posterior uso⁸³.

Los motivos estructurales M1 y M3 fueron solubles, sin embargo también forman agregados. La formación de agregados ocurre por la presencia de segmentos que pueden formar una interfaz estrechamente complementaria con otro segmento idéntico o por interacciones inespecíficas entre estas⁸⁴. Un estudio realizado por Perov y colaboradores mostró la capacidad amiloidea entre las diferentes regiones de CsgA. Las regiones ₄₅LNIYQY₅₀, ₄₇IYQYGG₅₂ y ₁₃₇VTQVGF₁₄₂ tuvieron la mayor capacidad amiloidea, interesantemente estas secuencias están comprendidas en las repeticiones R1 y R5⁸⁵. El motivo M1 generado en este estudio contiene dentro de su secuencia a ₄₅LNIYQY₅₀ y ₄₇IYQYGG₅₂. Mientras, el motivo M3 contiene la secuencia ₁₃₇VTQVGF₁₄₂. Es importante mencionar que estos motivos estructurales también contienen la secuencia descrita en CsgA como responsable de la interacción con diferentes proteínas de suero, tales como: fibronectina, fibrinógeno, plasminógeno, activador tisular de plasminógeno, H- cininógeno, factor XII, antígeno MHC-I y β_2 -microglobulina⁴⁴. Por esta razón, los motivos estructurales M1 y M3 generados en este estudio pueden ser candidatos en un futuro para la identificación del receptor de la fimbria curli en el tracto urinario.

Las proteínas y sus motivos estructurales formaron agregados resistentes a SDS y DTT, por este motivo fueron tratadas con ácido fórmico al 90% para su despolimerización. El ácido fórmico a diferencia de otros ácidos y tratamientos no degrada las proteínas por la ruptura de los enlaces peptídicos⁶⁷. Este tratamiento permitió identificar a las proteínas en su estado monomérico, confirmando así la funcionalidad del sistema para la obtención de la proteína recombinante CsgA y sus motivos estructurales.

La expresión de CsgA y sus motivos estructurales podría optimizarse realizando modificaciones en las condiciones de expresión a las que es sometida la bacteria con la finalidad de obtener fragmentos monoméricos. Por otro lado, técnicas más finas de purificación y caracterización son requeridas para los candidatos solubles M1 y M3.

La proteína CsgA tiene características fisicoquímicas amiloideas y su naturaleza es generar agregados moleculares, por este motivo, es complicado obtener una conformación soluble de la proteína completa. Los motivos estructurales pueden ser una estrategia viable para obtener una molécula soluble, como fue el caso de M1 y M3, sin embargo, estas pueden formar agregados posterior a la purificación por efecto de la concentración y la temperatura. Estos motivos son importantes en la interacción con proteínas de suero y de la matriz extracelular, sin embargo no se tienen ningún antecedente de la capacidad de estos de unirse algún componente proteico de membrana de las células de vejiga y/o riñón. Los siguientes estudios requieren de análisis finos como: ensayo de retardo de movilidad electroforético (Electrophoretic Mobility Shift Assay), espectrometría de masas-MALDI TOF/TOF y calorimetría de titulación isotérmica.

6. Conclusiones

Se realizó el análisis bioinformático y se logró amplificar las secuencias de interés del gen *csgA* con lo que se generaron exitosamente los plásmidos recombinantes pLATE31-*csgAN*, pLATE31-*csgAM1*, pLATE31-*csgAM2* pLATE31-*csgAM3* para la expresión de la proteína CsgA y sus motivos estructurales.

Se pudo establecer un sistema de expresión en *E. coli* para la proteína CsgA y sus motivos estructurales, sin embargo solo M1 y M3 fueron identificadas como moléculas solubles. Estos motivos podrán ser usados en un futuro para la búsqueda del receptor de curli en el tracto urinario.

7. Referencias

1. Asadi Karam, M. R., Habibi, M. & Bouzari, S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic Escherichia coli. *Mol. Immunol.* **108**, 56–67 (2019).
2. Luna-Pineda, V. M. *et al.* Urinary tract infections, immunity, and vaccination. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **75**, 67–78 (2018).
3. Foxman, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **28**, 1–13 (2014).
4. Smelov, V., Naber, K. & Bjerklund Johansen, T. E. Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. *Eur. Urol. Suppl.* **15**, 71–80 (2016).
5. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic Escherichia coli. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30784763>.
6. Yan, F. & Polk, D. B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**, 565–571 (2004).
7. Russo, T. A. & Johnson, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**, 1753–1754 (2000).
8. Wiles, T. J., Kulesus, R. R. & Mulvey, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. *Exp. Mol. Pathol.* **85**, 11–19 (2008).
9. Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S. H., Khan, M. S. & Sheerin, N. S. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad. Med. J.* **81**, 83–86 (2005).
10. Lloyd, A. L., Rasko, D. A. & Mobley, H. L. T. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **189**, 3532–3546 (2007).
11. Emody, L., Kerényi, M. & Nagy, G. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22 Suppl 2**, 29–33 (2003).
12. Lüthje, P. & Brauner, A. Virulence factors of uropathogenic E. coli and their interaction with the host. *Adv. Microb. Physiol.* **65**, 337–372 (2014).
13. Thumbikat, P. *et al.* Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000415 (2009).
14. Justice, S. S., Lauer, S. R., Hultgren, S. J. & Hunstad, D. A. Maturation of intracellular Escherichia coli communities requires SurA. *Infect. Immun.* **74**, 4793–4800 (2006).
15. Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8829–8835 (2000).
16. Zhang, G., Meredith, T. C. & Kahne, D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 779–785 (2013).
17. Honko, A. N. & Mizel, S. B. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol. Res.* **33**, 83–101 (2005).

18. Wang, X., Hammer, N. D. & Chapman, M. R. The Molecular Basis of Functional Bacterial Amyloid Polymerization and Nucleation. *J. Biol. Chem.* **283**, 21530–21539 (2008).
19. Tursi, S. A. & Tükel, Ç. Curli-Containing Enteric Biofilms Inside and Out: Matrix Composition, Immune Recognition, and Disease Implications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **82**, (2018).
20. Hufnagel, D. A., Depas, W. H. & Chapman, M. R. The Biology of the Escherichia coli Extracellular Matrix. *Microbiol. Spectr.* **3**, (2015).
21. Barnhart, M. M. & Chapman, M. R. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 131–147 (2006).
22. Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W. & Collinson, S. K. Thin aggregative fimbriae enhance Salmonella enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 295–301 (1998).
23. Hu, L. Prevalence of curli genes among Cronobacter species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation. *Int. J. Food Microbiol.* **265**, 65–73 (2018).
24. Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R. & Leiva, J. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* **28**, 163–175 (2005).
25. Evans, M. L. & Chapman, M. R. Curli biogenesis: order out of disorder. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 1551–1558 (2014).
26. Chapman, M. R. *et al.* Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**, 851–855 (2002).
27. Wang, X. & Chapman, M. R. Sequence determinants of bacterial amyloid formation. *J. Mol. Biol.* **380**, 570–580 (2008).
28. Hammar, M., Bian, Z. & Normark, S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6562–6566 (1996).
29. Hammer, N. D., Schmidt, J. C. & Chapman, M. R. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12494–12499 (2007).
30. Taylor, J. D. *et al.* Atomic resolution insights into curli fiber biogenesis. *Struct. Lond. Engl.* **19**, 1307–1316 (2011).
31. Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R. & Henderson, I. R. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* **17**, 139–145 (2009).
32. Robinson, L. S., Ashman, E. M., Hultgren, S. J. & Chapman, M. R. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol. Microbiol.* **59**, 870–881 (2006).
33. Wang, X., Smith, D. R., Jones, J. W. & Chapman, M. R. In vitro polymerization of a functional Escherichia coli amyloid protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 3713–3719 (2007).
34. Wang, X., Zhou, Y., Ren, J.-J., Hammer, N. D. & Chapman, M. R. Gatekeeper residues in the major curlin subunit modulate bacterial amyloid fiber biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 163–168 (2010).
35. Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1405–1412 (2010).
36. Nelson, R. *et al.* Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773–778 (2005).

37. Luna-Pineda, V. M. *et al.* Features of urinary *Escherichia coli* isolated from children with complicated and uncomplicated urinary tract infections in Mexico. *PLoS One* **13**, e0204934 (2018).
38. Luna-Pineda, V. M. *et al.* Curli of Uropathogenic *Escherichia coli* Enhance Urinary Tract Colonization as a Fitness Factor. *Front. Microbiol.* **10**, 2063 (2019).
39. Cordeiro, M. A., Werle, C. H., Milanez, G. P. & Yano, T. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Braz. J. Microbiol.* **47**, 414–416 (2016).
40. Hollenbeck, E. C. *et al.* Phosphoethanolamine cellulose enhances curli-mediated adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 10106–10111 (2018).
41. Tükel, C. *et al.* Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell Host Microbe* **6**, 45–53 (2009).
42. Bian, Z., Yan, Z. Q., Hansson, G. K., Thorén, P. & Normark, S. Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J. Infect. Dis.* **183**, 612–619 (2001).
43. Rapsinski, G. J. *et al.* Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect. Immun.* **83**, 693–701 (2015).
44. Olsén, A. *et al.* Identification of Two Protein-binding and Functional Regions of Curli, a Surface Organelle and Virulence Determinant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34568–34572 (2002).
45. Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S. & Normark, S. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7**, 523–536 (1993).
46. Bian, Z., Brauner, A., Li, Y. & Normark, S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* **181**, 602–612 (2000).
47. Coagulación Sanguínea. <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/blood-coagulation-sp.php>.
48. Pham, P. V. Chapter 19 - Medical Biotechnology: Techniques and Applications. in *Omics Technologies and Bio-Engineering* (eds. Barh, D. & Azevedo, V.) 449–469 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1.
49. Nason, A. & Cifuentes, J. L. *Biología*. (Limusa, 2011).
50. Green, M. R., Sambrook, J. & Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012).
51. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1135–1145 (2008).
52. Velázquez, L. P. A. Extracción y purificación de ADN. 26.
53. Krebs, J. E., Goldstein, E. S. & Kilpatrick, S. T. *Lewin's GENES XII*. (Jones & Bartlett Learning, 2017).
54. High-Fidelity DNA Polymerases & Master Mixes—Thermo Scientific - MX. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-pcr/thermo-scientific-pcr-enzymes-master-mixes/high-fidelity-dna-polymerases-master-mixes-thermo-scientific.html>.

55. gel electrophoresis | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/definition/gel-electrophoresis-286/>.
56. Aaij, C. & Borst, P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **269**, 192–200 (1972).
57. Bonasera, V., Alberti, S. & Sacchetti, A. Protocol for high-sensitivity/long linear-range spectrofluorimetric DNA quantification using ethidium bromide. *BioTechniques* **43**, 173–174, 176 (2007).
58. Vectores de clonación y expresión | Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743892>.
59. 3.4 Vectores de clonación y expresión - Biología Molecular. *StuDocu* <https://www.studocu.com/es-ar/document/universidad-nacional-de-san-luis/biologia-molecular/apuntes-de-clase/34-vectores-de-clonacion-y-expresion/3242799/view>.
60. aLICator LIC Cloning & Expression System - MX. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-cloning/alicator-cloning-system.html>.
61. Competent Cells - Principles And Methods Of its Preparation. *BYJUS* <https://byjus.com/biology/competent-cells/>.
62. Grosser, M. R. & Richardson, A. R. Method for Preparation and Electroporation of *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1373**, 51–57 (2016).
63. The QIAexpressionist - (EN) - QIAGEN. <https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>.
64. Sulkowski, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* **3**, 1–7 (1985).
65. How SDS-PAGE Works - Bitesize Bio. <https://bitesizebio.com/580/how-sds-page-works/>.
66. The principle and Procedure of Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *How Biotech* <https://howbiotech.com/the-principle-and-procedure-of-polyacrylamide-gel-electrophoresis-sds-page/> (2019).
67. Hazeki, N., Tukamoto, T., Goto, J. & Kanazawa, I. Formic acid dissolves aggregates of an N-terminal huntingtin fragment containing an expanded polyglutamine tract: applying to quantification of protein components of the aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 386–393 (2000).
68. Bh, B. & ari. Western Blot Technique: Principle, Procedures and Uses. *Learn Microbiology Online* <https://microbeonline.com/western-blot-technique-principle-procedures-advantages-and-disadvantages/> (2017).
69. The Principle and Procedure of Western Blot – Creative Proteomics Blog. <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/the-principle-and-procedure-of-western-blot/>.
70. Chemiluminescent Western Blotting - MX. [//www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html](https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html).

71. Biopolímeros-Módulo3_5_4_1.
http://facultatciencies.uib.cat/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo3/modulo3_5_4_1.htm.
72. csgA - Major curlin subunit precursor - Escherichia coli (strain K12) - csgA gene & protein.
<https://www.uniprot.org/uniprot/P28307>.
73. Wizard® Genomic DNA Purification Kit. <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/wizard-genomic-dna-purification-kit/>.
74. DNA Clean & Concentrator-5. ZYMO RESEARCH <https://www.zymoresearch.com/products/dna-clean-concentrator-5>.
75. Marbach, A. & Bettenbrock, K. lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J. Biotechnol.* **157**, 82–88 (2012).
76. Sustrato Immobilon quimoluminiscente de HRP para transferencias ‘Western’ | WBKLS0500.
http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Immobilon-Western-Chemiluminescent-HRP-Substrate,MM_NF-WBKLS0500?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_UG.
77. 2-D Quant Kit. GE Healthcare Life Sciences <https://www.gelifesciences.com/en/gr/shop/protein-analysis/protein-sample-preparation/sample-cleanup/2-d-quant-kit-p-02012>.
78. Luna-Pineda, V. M. *et al.* Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic Escherichia coli. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 135 (2016).
79. Rivera, C., Rosales, J., Freites-Perez, J. & Rodriguez, E. Very Low Molecular Weight Proteins Electrophoresis Protocol. *BIO-Protoc.* **8**, (2018).
80. Signal peptide. <https://www.uniprot.org/help/signal>.
81. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M. & Panda, A. K. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microb. Cell Factories* **14**, (2015).
82. Monera, O. D., Kay, C. M. & Hodges, R. S. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **3**, 1984–1991 (1994).
83. Dialysis Methods for Protein Research - MX. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.html>.
84. Goldschmidt, L., Teng, P. K., Riek, R. & Eisenberg, D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 3487–3492 (2010).
85. Perov, S. *et al.* Structural Insights into Curli CsgA Cross- β Fibril Architecture Inspire Repurposing of Anti-amyloid Compounds as Anti-biofilm Agents. *PLOS Pathog.* **15**, e1007978 (2019).