

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CLONACIÓN MOLECULAR, EXPRESIÓN HETEROLOGA Y
PURIFICACIÓN DE YFML: UNA RNA HELICASA DE LA
FAMILIA DEAD”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANIBAL RAZIEL LARA VÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dr. LUIS GABRIEL BRIEBA DE CASTRO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CLONACIÓN MOLECULAR, EXPRESIÓN
HETEROLOGA Y PURIFICACIÓN DE YFML:
UNA RNA HELICASA DE LA FAMILIA DEAD”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANIBAL RAZIEL LARA VÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dr. LUIS GABRIEL BRIEBA DE CASTRO

SINODALES

Dr. LUIS GABRIEL BRIEBA DE CASTRO _____
DIRECTOR

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ _____
SINODAL

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA _____
SINODAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES _____
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de bacteriología molecular y de bioquímica estructural del Cinvestav Irapuato y del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) respectivamente. Quiero agradecer a la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez y al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro por permitirme haber trabajado y aprendido la manera de trabajar de ambos grupos de manera conjunta. A a mis maestros de carrera por las enseñanzas y conocimientos transmitidos que me permitieron poder aplicarlos durante el desarrollo de esta tesis. A la M. en C. África Islas Robles y a la M. en C. Varinia López Ramírez del grupo de la Dra. Olmedo por sus consejos e ideas aportadas durante el diseño de las construcciones. Así como también a los estudiantes del Dr. Brieba por el apoyo técnico aportado durante la expresión y purificación de la proteína. Y primordialmente, agradezco al apoyo otorgado por mi familia ya que sin su apoyo este trabajo no hubiera podido ser culminado.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 RNA helicasas	3
II.1.1 Proteínas de caja DEAD	4
II.1.1.1 Actividad de las RNA helicasas <i>in vitro</i>	6
II.1.1.2. Unión de las RNA helicasas al RNA	6
II.1.1.3. Actividad ATPasa en las RNA helicasas	7
II.1.1.4. Actividad helicasa	7
II.1.1.5. Otras actividades asociadas a las RNA helicasas	10
II.1.2. RNA helicasas de <i>Bacillus subtilis</i> .	10
III. HIPÓTESIS	12
IV. OBJETIVOS	13
IV.1 General	13
IV.2 Específicos	13
V. METODOLOGÍA	14
V.1 Materiales	14
V.1.1 Enzimas y otros reactivos	14
V.1.2 Oligonucleotidos	15

V.1.3 Kits	15
V.1.4 Columnas	15
V.1.5 Equipo	15
V.2 Métodos	16
V.2.1 Construcción del vector pCold-yfmL	16
V.2.1.1 Preparación del preinóculo	16
V.2.1.2 Extracción de DNA genómico	16
V.2.1.3 Amplificación del gen <i>yfmL</i> mediante PCR	17
V.2.1.4 Digestión enzimática doble	17
V.2.1.5 Purificación de productos de PCR y digestiones enzimáticas	18
V.2.1.6 Reacción de ligación de pCold – yfmL	19
V.2.1.7 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 por electroporación	19
V.2.1.8 Escrutinio genético mediante PCR	20
V.2.1.9 Extracción de DNA plasmídico	20
V.2.1.10 Análisis de plásmidos por restricción enzimática	21
V.2.1.11 Análisis de DNA por electroforesis	21
V.2.2 Transformación de <i>E.coli</i> BL21 Star	22
V.2.3 Inducción de la expresión del gen <i>yfmL</i>	22
V.2.4 Purificación de la proteína YfmL	22
V.2.4.1 Purificación por Cromatografía de afinidad a histidinas.	22
V.2.4.2 Purificación por Cromatografía de intercambio iónico.	23
V.2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	24
VI. RESULTADOS	25
VI.1 Extracción de DNA genómico de <i>B. subtilis</i>	25
VI.2 Amplificación del gen <i>yfmL</i> por PCR	25

VI.3 Análisis de las clonas obtenidas	26
VI.4 Análisis de la inducción de <i>yfmL</i>	28
VI.5 Análisis de las fracciones de proteína obtenida	28
VII. DISCUSIÓN	31
VIII. CONCLUSIONES	36
IX. BIBLIOGRAFÍA	37
X. ANEXOS	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Constantes de actividad de ATPasa de diferentes proteínas de caja DEAD purificadas de <i>E.coli</i>	9
2	Descripción de las cepas utilizadas	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Procesos celulares que involucran a las proteínas DEAD	4
2	Motivos conservados en las proteínas de caja DEAD y su interacción con ATP (adenosin trifosfato)	5
3	Topología de los dos dominios de helicasa tipo RecA	8
4	Modelos de direccionalidad de desenrollamiento en las proteínas DEAD	10
5	Mapa general del vector pCold I	18
6	Crecimiento en placa de <i>B. subtilis</i> y análisis de DNA genómico	25
7	Amplificación por PCR del gen <i>yfmL</i>	26
8	Escrutinio genético mediante PCR de colonia	27
9	DNA plasmídico y ensayo de digestión enzimática con <i>EcoRI</i> y <i>XbaI</i> de las clonas positivas	27
10	Mapa de la construcción pCold-yfmL	28
11	SDS-PAGE al 10% de la Sobreexpresión de la proteína YfmL y análisis de las fracciones después de la lisis celular	29
12	SDS-PAGE de los últimos tres pasos de purificación de YfmL	30

RESUMEN

Las proteínas de caja DEAD son proteínas que se encuentran dentro de una amplia variedad de organismos y se caracterizan por tener actividad de tipo helicasa dependiente de ATP. Se encuentran involucradas en aspectos básicos del metabolismo de los ácidos nucleicos. Las constantes de actividad enzimática obtenidas para algunas de ellas han reflejado diferencias y similitudes significativas entre especies relacionándolo con los aspectos fisiológicos y bioquímicos de cada especie. En *B. subtilis*, una bacteria de gran importancia a nivel industrial, y principal modelo de estudio de los gram positivos hay 5 proteínas de caja DEAD (YfmL, YdbR, YqfR, YxiN y YprA) de las cuales solo YxiN y YdbR han sido caracterizadas bioquímicamente. Con el fin de poder hacer un análisis comparativo de las funciones de estas proteínas con otras ya previamente caracterizadas, en este trabajo se obtuvo la proteína YfmL (42 kDa), para ello se extrajo el DNA genómico de la cepa PY79 de *B. subtilis* y del cual se amplificó el gen *yfmL* de 1128 pb por PCR. Posteriormente se digirió el producto de PCR *yfmL* con *XbaI* y *EcoRI* y el vector de expresión pCold I para formar la construcción pCold-*yfmL*, la cual fue transformada en la cepa huésped *E. coli* TOP10 por electroporación. Las colonias transformantes fueron analizadas por PCR y posteriormente se extrajeron los plásmidos. Se confirmó la presencia del inserto mediante la digestión enzimática de plásmidos con *XbaI* y *EcoRI*. La cepa de *E. coli* BL21–Star fue transformada con la construcción pCold-*yfmL* mediante choque térmico y la expresión fue inducida con IPTG 0.5 mM a 16°C por 21 horas. Posteriormente se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad de histidinas y finalmente por cromatografía de intercambio iónico.

I. INTRODUCCIÓN

La expresión génica es el proceso por el cual la información genética codificada en el ADN es transcrita a RNA donde este a su vez es modificado y procesado para transformar dicha información en proteínas, las cuales ejercen las principales funciones moleculares de los organismos. Entender los mecanismos de regulación del RNA es un punto clave para descifrar los mecanismos de la expresión génica. En los últimos años se han descrito proteínas que tienen la capacidad de interactuar con los ácidos nucleicos; entre estas se encuentran las proteínas de caja DEAD, las cuales se caracterizan por tener actividad DNA o RNA helicasa dependiente de ATP.

Las proteínas DEAD con actividad RNA helicasa participan en la mayoría de los procesos moleculares en los que se involucra RNA (Ej. transcripción, traducción, edición, degradación, entre otros) contienen motivos conservados con funciones específicas, aun no comprobadas con todas las proteínas DEAD reportadas. Las proteínas DEAD se encuentran presentes tanto en eucariontes como en procariontes y, en ellas se presenta una cierta similitud funcional para organismos de diferentes especies. En *Bacillus subtilis*, las proteínas tipo caja DEAD (por sus siglas de secuencia de aminoácidos: Aspartato, Glutamato, Alanina, Aspartato) anotadas como RNA helicasas incluyen 5 miembros (YfmL, YQfR, YdbR, YxiN y YprA)

Aunque es posible hacer comparaciones cuantitativas de proteínas DEAD entre especies bacterianas. Existen diferencias fisiológicas, metabólicas y de género que hacen difícil su comparación. La caracterización bioquímica es una manera de comparar y definir a las proteínas de caja DEAD. El estudio comparativo de proteínas de la caja DEAD en *B. subtilis* es reciente, ya que actualmente se han clonado y caracterizado bioquímicamente dos de estas proteínas (YdbR y YxiN). Con el fin de comparar las proteínas de caja DEAD en *B. subtilis* con las presentes en otras especies y géneros será necesario expresar y purificar las proteínas que

aun no han sido descritas bioquímicamente. La diversidad de proteínas tipo caja DEAD presente en *B. subtilis* permitirá comprender el papel global que juegan este tipo de proteínas en el metabolismo de RNA de esta bacteria, así como obtener evidencias directamente relacionadas con su regulación.

II. ANTECEDENTES

II.1 RNA helicasas

El RNA (ácido ribonucleico por sus siglas en inglés) es probablemente la molécula más diversa, tanto en estructura como en funcionalidad dentro de las células. Entre sus funciones se le denomina la molécula mensajera de la información genética. La funcionalidad de una molécula de RNA depende del correcto doblamiento estructural y de su asociación con otras proteínas o complejos ribonucleo-proteicos (RNP's). Estos procesos dinámicos son probablemente mejor ilustrados en el encorte y empalme del RNA mensajero precursor (pre-mRNA) o la biogénesis ribosomal, donde rearrreglos continuos de RNP's son necesarios para la obtención de un producto maduro. (Bleichert y Baserga, 2007).

Diferentes proteínas interactúan con las moléculas de RNA, las cuales ayudan desdoblándolas de manera correcta. Un grupo de proteínas de unión al RNA que previene que el RNA de cadena sencilla forme arreglos no funcionales o uniones inapropiadas con otras proteínas, son las RNA helicasas. Las RNA helicasas catalizan la separación de cadenas dobles de RNA (dsRNA por sus siglas en inglés) de manera dependiente de la energía de ATP (Adenosin-Trifosfato). Participan en todos los aspectos del metabolismo del RNA (Figura 1), que incluyen la transcripción del RNA, edición del RNA, encorte y empalme del mRNA, exportación del RNA, procesamiento del RNA ribosomal, degradación del RNA, formación del extremo 3' terminal y la traducción de mRNA (RNA mensajero) en proteína (Rocak y Linder, 2004; Cordin y col., 2005).

Experimentos genéticos y bioquímicos en *Sacharomyces cerevisiae* como en otros organismos han indicado diversas funciones celulares de las proteínas de la caja DEAD. Estas incluyen la biogénesis ribosomal (Ej. elf4AIII, Rok1, Sbp4 y Dbp10), splicing del pre-mRNA (Ej. Prp28, Prp5 y Sub2), transporte del mRNA (Ej. Dbp5 y

Sub2), iniciación de la traducción (Ej. eIF4A, Ded1 y Vasa), expresión genética en organelos (Ej. Mss116, Mrh4 y Cyt-19) y degradación de RNA (Ej. RhIB, Dbp2 y Dhh1). (Rocak y Linder, 2004)

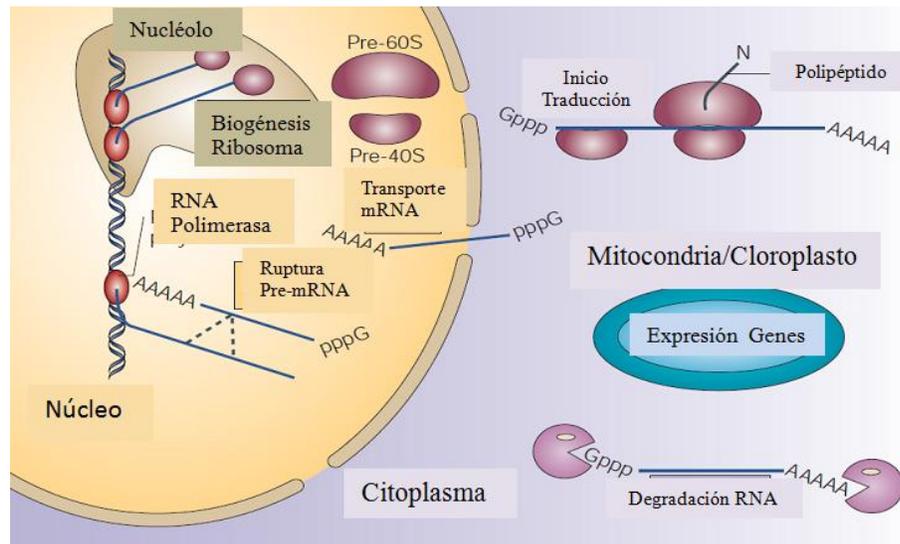


Figura 1. Procesos celulares que involucran a las proteínas DEAD. Adaptado de Rocak y Linder, 2004.

II.1.1 Proteínas de caja DEAD

Con base a los sitios conservados en su secuencia, las RNA y DNA helicasas pueden ser agrupadas dentro de cinco superfamilias (SF1-SF5). La mayoría de las RNA helicasas pertenecen a la superfamilia 2 (SF2). Las superfamilias 1 y 2 contienen de siete a nueve motivos conservados que constituyen el núcleo helicasa (Figura 2). Estructuralmente las helicasas SF1 y SF2 presentan dos dominios tipo RecA (Figura 3), las similitudes estructurales indican la utilización de mecanismos similares en sus actividades enzimáticas. Las proteínas de caja DEAD pertenecen a la SF2 y se caracterizan por tener nueve motivos conservados a los que se les ha designado diversas funciones (Figura 2). Se encuentran presentes en genomas representativos de una amplia variedad de organismos y su nombre se debe al

código en letra asignado a las iniciales de los 4 aminoácidos conservados que conforman el motivo II (Aspartato - Glutamato - Alanina - Aspartato) o motivo Walker B (Rocak y Linder, 2004; Gorbalenya y Koonin, 1993).

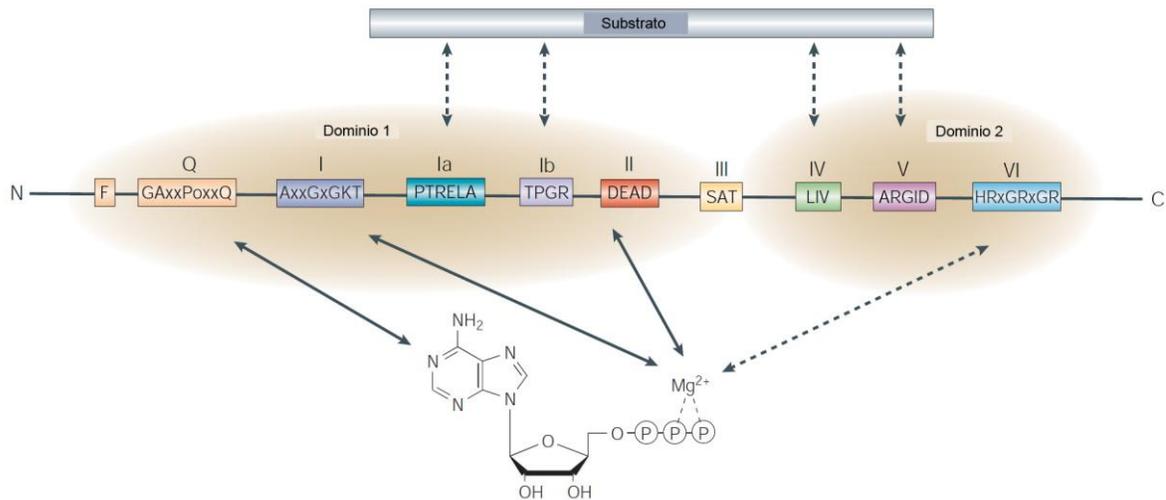


Figura 2. Motivos conservados en las proteínas de caja DEAD y su interacción con ATP (adenosin trifosfato). Adaptado de Rocak y Linder, 2004. En base al alineamiento de secuencias se ha demostrado la presencia de 9 motivos conservados en las proteínas de la caja DEAD. Motivos Q, I, II y VI se unen a ATP y son requeridos para su hidrólisis. Motivo III es requerido para la actividad helicasa. Motivos Ia, Ib, IV y V sugieren ser requeridos para la unión del sustrato, aunque información bioquímica de tal evento es aun inexistente.

El desenrollamiento de dsRNA se consideraba como la principal actividad de las proteínas de caja DEAD. Aunque la actividad de desenrollamiento ha sido probada en algunas proteínas representativas de la familia, otras proteínas de la caja DEAD han sido implicadas en funciones no tan comunes como el remodelamiento de estructuras de RNA, disociación de complejos de RNA- Proteína o alineamiento de cadenas de RNA por lo que también se les conoce como chaperonas de RNA o RNPasas (Fairman y col., 2004; Yang y Jankowsky, 2005; Cheng y col., 2005; Linder, 2006; Rajkowitsch y col., 2007).

II.1.1.1 Actividad de las RNA helicasas *in vitro*

En comparación al número de proteínas de la caja DEAD que se encuentran disponibles dentro de las bases de datos, solo algunas pocas han sido caracterizadas bioquímicamente. Entre las principales actividades enzimáticas que se han encontrado son la capacidad de unión al RNA, actividad ATPasa y actividad RNA helicasa. Sin embargo, la información obtenida durante dichos ensayos debe ser tomada con precaución, debido a que la actividad *in vitro* puede ser afectada por parámetros como la naturaleza de los sustratos utilizados, la inhabilidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales de proteínas de caja DEAD eucariotas expresadas en sistemas procariontes, así como la carencia de cofactores específicos que se encuentran *in vivo* (Silverman y col., 2003).

II.1.1.2. Unión de las RNA helicasas al RNA

La mayoría de las proteínas de la caja DEAD han demostrado tener la capacidad de unirse a cualquier molécula de RNA, lo que estimula su actividad de ATPasa. Los ensayos bioquímicos demuestran que existe cooperación entre la unión del RNA y la unión a ATP: la unión del RNA es más fuerte en presencia de ATP o de un análogo de ATP no hidrolizable, pero disminuye en la presencia de ADP o un análogo de ADP hidrolizable. Sin embargo, otras como la helicasa DbpA de *E. coli* demuestran tener una mayor especificidad ($K_d = 20$ nM) por la unión de una estructura específica de tallo y asa (H92) del RNA ribosomal (rRNA) 23S localizada en el centro peptidil transferasa en el ribosoma maduro bacteriano. La especificidad de la mayoría de las proteínas de caja DEAD está otorgada por la interacción con otros componentes RNP's *in vivo* (Cordin y col., 2005). Evidencia reciente sugiere que la actividad de unión al RNA puede estar influenciada por la región próxima al núcleo helicasa (Collins y col., 2009; Fan y col., 2009; Napetsching y col., 2009; von Moeller y col., 2009)

II.1.1.3. Actividad ATPasa en las RNA helicasas

La actividad de ATPasa, representada como la capacidad de hidrolizar la molécula de ATP estimulada por la presencia de moléculas de RNA. La información obtenida hasta el momento demuestra que en general la estimulación de la actividad ATPasa no requiere un sustrato específico. El cuadro 1 muestra los parámetros enzimáticos para la actividad ATPasa de algunas proteínas de caja DEAD, las afinidades de las proteínas de caja DEAD por ATP (expresadas como constante de Michaelis-Menten, K_m) pueden ir desde los 50 a 1000 μM y la eficiencia enzimática (expresada como la constante de catalización, K_{cat}) desde los 3 min^{-1} a los 600 min^{-1} ; demostrando la amplia diversidad que poseen las RNA helicasas en ensayos *in vitro*. Ensayos bioquímicos utilizando la proteína DEAD eIF-4A (la RNA helicasa modelo en eucariontes) mutada en la posición alanina 66 reemplazado por valina [eIF-4A(A66V)] demostraron tener efecto disminuido sobre la hidrólisis de ATP cuando fue comparado con la enzima silvestre eIF-4A (Rozen y col., 1990; Blum y col., 1992; Pugh y col., 1999; Caruthers y McKay, 2002; Tanner y col., 2003; Cordin y col., 2004; Shen y col., 2007)

II.1.1.4. Actividad helicasa

La actividad RNA helicasa es representada como la habilidad para desenrollar dsRNA dependiente de ATP, sello característico de la mayoría de las proteínas de caja DEAD. Los ensayos bioquímicos hasta el momento han demostrado que la actividad helicasa se ve significativamente reducida cuando se utilizan análogos no hidrolizables de ATP o ADP. La naturaleza del sustrato ha mostrado ser un parámetro que influye en la actividad helicasa significativamente. De acuerdo al tipo de sustrato utilizado se puede obtener información acerca de la procesividad (cantidad de nucleótidos disociados) y la direccionalidad (sentido en el que la proteína es colocada sobre el sustrato y avanza sobre este). La mayoría de las

proteínas de la caja DEAD se muestran con baja procesividad y dirección inespecífica (Figura 4A).

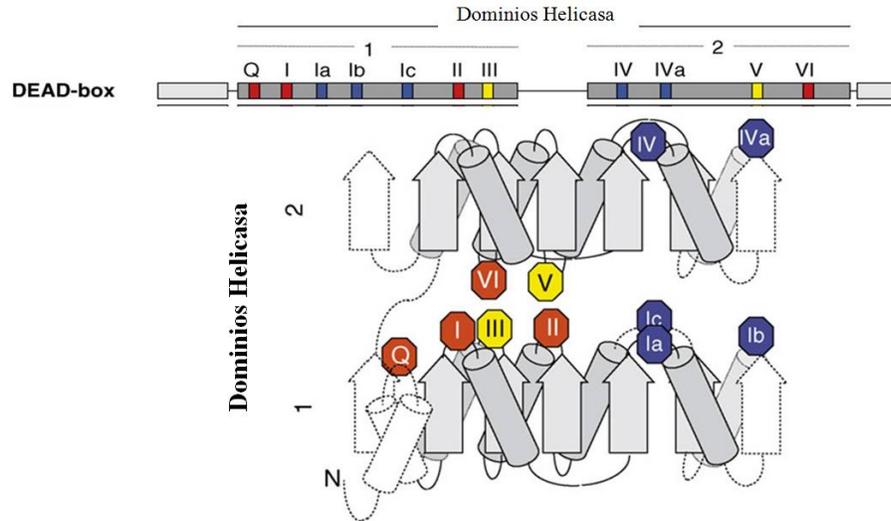


Figura 3. Topología de los dos dominios de helicasa tipo RecA. Adaptado de Jankowsky y Fairman, 2007. Las proteínas de la caja DEAD muestran dos dominios estructuralmente similares al dominio de la Recombinasa A de *E. coli*. Elementos con líneas continuas están presentes en todas las estructuras SF1 y SF2; elementos con líneas punteadas no están presentes en todas las proteínas. La posición de los motivos conservados es indicada por octógonos numerados.

La carencia de dirección es atípica cuando se comparan con otras proteínas de la familia SF2. No obstante, para algunas otras proteínas DEAD como DbpA en *E. coli*, se ha demostrado actividad helicasa particularmente con dirección única 3' → 5' (Figura 4B). Otro parámetro que afecta la actividad helicasa en los ensayos bioquímicos es la estabilidad del sustrato de RNA utilizado. Por ejemplo: la actividad helicasa de la proteína DEAD eIF4A es dependiente de la proteína de unión al RNA eIF4B cuando se utilizan moléculas de RNA con $\Delta G = -146 \text{ kJ mol}^{-1}$. Sin embargo, cuando se utilizan moléculas de RNA donde $\Delta G = -67$ a -104 kJ mol^{-1} eIF4A muestra actividad helicasa en ausencia de eIF4B (Rogers y col., 1999).

Cuadro 1. Constantes de actividad de ATPasa de diferentes proteínas de caja DEAD purificadas de *E. coli*. Adaptado de Cordin y col., 2005. Se muestra la afinidad de la enzima por su sustrato (K_m) y la velocidad de catalización (K_{cat}); nd (no disponible) * Xp54 / p68 / eIF4A fueron purificadas de *X. laevi*, células humanas y reticulocitos de ratón respectivamente.

Proteína	Especificidad por NTP	$K_{m,ATP}$	$k_{cat,ATP}$	Especificidad por RNA
DP103	ATP/dATP	nd	nd	No específica
eIF4A	ATP/dATP/nd	80 μ M	3 min^{-1}	No específica
eIF4A*	ATP/dATP	330 μ M	0.3 min^{-1}	No específica
p68	ATP/dATP	nd	nd	dsRNA > ssRNA > dsDNA > ssDNA
p68*	ATP/nd	100–1000 μ M	nd	No específica
RHII/Gu β	ATP/nd	nd	nd	No específica
Dbp5	ATP/nd	nd	nd	No específica, tRNA, poly(A),(U),(C),(G)
Dbp9	ATP/nd	nd	nd	DNA dependiente; RNA inhibido
eIF4A*	ATP/dATP	470 μ M	nd	poly(A), No específica
Prp5	ATP/dATP	nd	140 min^{-1}	No específica, estimulación incrementada por U2 snRNA
Rok1	ATP/nd	nd	nd	poly(A),(U),(C),(G)
Xp54	ATP/nd	nd	nd	nd
An3	ATP/dATP	65 μ M	9 min^{-1}	<i>X. laevi</i> RNA total
Vasa	ATP/nd	nd	nd	RNA independiente
AtDRH1 (<i>A. thaliana</i>)	ATP/dATP	nd	nd	poly(A) > poly(dT) > poly(dC) > poly(U) = poly(C)
eIF4A (germen de trigo)	ATP/nd	93 μ M	12.5 min^{-1}	No específica
ChrC (<i>A. sp</i>)	ATP/dATP	nd	nd	No específica, preferencia por rRNA
CsdA (<i>E. coli</i>)	ATP/nd	nd	90 min^{-1}	No específica
DbpA (<i>E. coli</i>)	ATP/dATP	120 μ M	580 min^{-1}	H89–H92 de 23S rRNA
Hera (<i>T. thermophilus</i>)	ATP/dATP	360 μ M	nd	16S y 23S rRNA
SmrB-YxiN	ATP/dATP	170 μ M	28 min^{-1}	H89–H92 de 23S rRNA
YxiN (<i>B. subtilis</i>)	ATP/dATP	230 μ M	210 min^{-1}	H89–H92 de 23S rRNA

II.1.1.5. Otras actividades asociadas a las RNA helicasas

A pesar de que el término helicasa implica la separación de un complejo doble o dúplex de RNA, también se les ha asociado con la disociación de complejos de RNA-Proteína (actividad RNPasa) y al alineamiento de RNA de doble cadena (dsRNA), lo que demuestra el papel importante que podrían llevar a cabo las proteínas de caja DEAD en la regulación de la expresión génica en un organismo (Fairman y col., 2004; Uhlmann-Schiffler y col., 2006; Yang y Jankowsky, 2005).

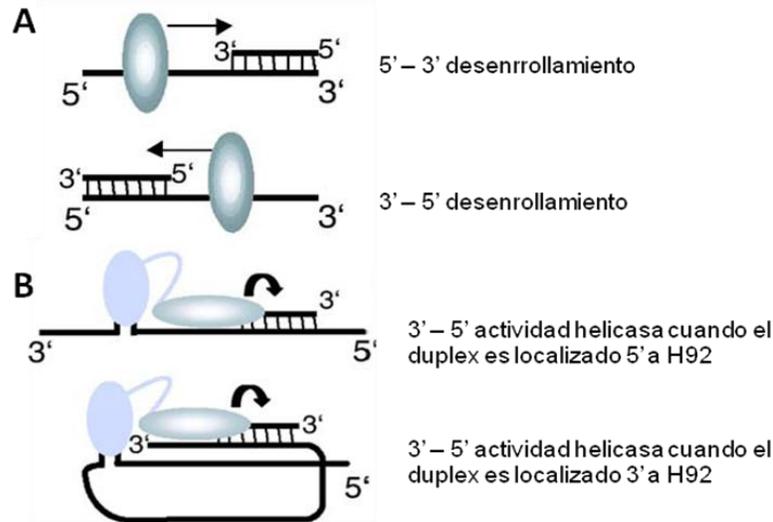


Figura 4. Modelos de direccionalidad del desenrollamiento en las proteínas DEAD. Adaptado de Cordin y col., 2005. A) La direccionalidad es probada usando dúplex de RNA con extremos 5' y/o 3' libres. Dependiendo de su dirección, una helicasa dada preferirá el desenrollamiento de uno o del otro lado. B) DbpA es una helicasa con direccionalidad 3' - 5' y por lo tanto se necesita de un dúplex con un extremo 3' libre.

II.1.2. RNA helicasas de *Bacillus subtilis*.

El estudio de las proteínas de caja DEAD ha sido principalmente enfocado a organismos eucariontes y en donde el mayor porcentaje de los estudios realizados

en procariontes se han llevado a cabo para las proteínas DEAD de *E. coli*, de los cuales se ha demostrado diferencias particulares comparados con organismos superiores. Sin embargo, la diversidad genética que existe entre los procariontes es muy amplia por lo que se ha hecho vislumbrar la necesidad de estudiar otros organismos con otras características particulares (lost y col., 2006; Marsden y col., 2006).

B. subtilis es una bacteria modelo Gram positiva que tiene la capacidad de esporular. En 1997, se dio a conocer la secuencia completa de su genoma, dejando entrever la presencia de 5 secuencias codificantes (*yfmL*, *ydbR*, *yqfR*, *YxiN* y *yprA*) para RNA helicasas. La proteína YxiN ha sido la más estudiada, estudios genéticos y bioquímicos han revelado que YxiN tiene cambios conformacionales en solución y que participa en la biogénesis de la subunidad 23S del ribosoma (Kunst y col., 1997; Kossen y Uhlenbeck, 1999; Karginov y col., 2005; Wang y col., 2007; Karow y Klostermeier, 2009).

Así mismo, se ha reportado incremento en la expresión de los genes *ydbR* y *yqfR* cuando *B. subtilis* se incubaba a 16° C y a través de análisis de resonancia fluorescente (FRET) ha sido posible identificar la cooperación de la proteína YqfR con la proteína de choque en frío CspA, sugiriendo de esta manera, que las proteínas de caja DEAD podrían regular su expresión cuando la bacteria crece a diferentes temperaturas. Para la proteína YdbR, se ha descrito su actividad helicasa, ATPasa y de unión RNA e interesantemente se demostró que cuando se muta, afecta el grado de crecimiento de *B. subtilis* a 37°C (Hunger y col, 2006; Ando y Nakamura, 2006).

Por otro lado las proteínas YfmL y YprA no han sido asociadas a ningún tipo de función fisiológica o bioquímica, pero la presencia de la caja DEAD indica que se tratan de RNA helicasas dependientes de ATP aunque su actividad y otras propiedades bioquímicas particulares de cada una no han sido ensayadas aún (Kunst y col, 1997)

III. HIPÓTESIS

La clonación del gen *yfmL* en el vector de expresión pCold I permitirá sobreproducir la proteína recombinante YfmL y el esquema de purificación utilizado: lisis celular, cromatografía de afinidad y cromatografía por intercambio iónico permitirá obtener cantidades sustanciales de esta.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Establecer los parámetros adecuados para la obtención de la RNA helicasa recombinante YfmL.

IV.2 Específicos

- Diseñar una construcción molecular para la clonación y expresión del gen yfmL en el vector pCold-yfmL.
- Inducir la expresión de la helicasa recombinante YfmL en un sistema bacteriano.
- Purificar la RNA helicasa YfmL mediante una cromatografía de afinidad e intercambio iónico.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

Cuadro 2. Descripción de las cepas utilizadas

Nombre	Genotipo
<i>B. subtilis</i> PY79	Protótrofo derivado de <i>B. subtilis</i> 168
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> λ-
<i>E. coli</i> BL21Star	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)

V.1.1 Enzimas y otros reactivos

Los reactivos y enzimas empleados fueron los siguientes:

- Enzima *EcoRI* 20,000 U y Enzima *XbaI* 10,000 U (Invitrogen)
- PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen)
- T4 DNA ligasa 5,000 Unidades (Invitrogen)
- Lisozima 20,000 Unidades (usbcorp)
- Vector de expresión de choque frío pCold I (Takara)
- Soporte para cromatografía de intercambio iónico Macro-Prep High S (Bio-Rad)

V.1.2 Oligonucleotidos

- pFyfmL 5'-CCCGAATTCACGCAAACTTGGCCATTT
EcoRI
- pRyfmL 5'-GCTTCTAGA CTTCTTTTTATTTCTGTCT
XbaI

V.1.3 Kits

- QIAGEN Plasmid Mini Kit (25) (Qiagen)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- QuickGene DNA tissue kit S (Fujifilm)

V.1.4 Columnas

- Columna HisTrap de 1 ml. (GE Healthcare)
- Columna preempacada de flujo gravitacional para cromatografía de intercambio iónico de 9 cm. Prefilled Poly-Prep (Bio-Rad)

V.1.5 Equipo

- Quickgene – Mini80 (Fujifilm)
- Termociclador 2720 de 96 placas (Applied Biosystems)
- Sistema de documentación de geles Gel Doc XR (Bio-Rad)
- Electroporador Gene pulser (Bio-Rad)
- Prensa Francesa (Thermo)
- Equipo para electroforesis de proteínas (GE Healthcare)
- Equipo para electroforesis de ácidos nucleicos (Bio-Rad)

V.2 Métodos

V.2.1 Construcción del vector pCold-yfmL

V.2.1.1 Preparación del preinóculo

Se preparó un preinóculo de *B. subtilis* PY79 en cajas de petri con agar Luria Bertani (LB) (por cada litro de medio 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, ajustado a pH 7,5 con NaOH) e incubando a 28°C durante una noche. Posteriormente se transfirieron las colonias obtenidas a medio líquido (LB) y se incubaron a 37°C durante toda una noche.

V.2.1.2 Extracción de DNA genómico

Se centrifugó 1 ml de medio del cultivo previamente obtenido en el paso anterior a 4500 rpm / 3 min y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. A continuación, se resuspendió la pastilla en 100 µL de agua y se agregaron 2 µL de amortiguador Tris (pH 7.5) y 0.05 gr de lisozima liofilizada y se incubó a 30 min / 37°C en agitación. Posteriormente fueron agregados 20 µL de Proteinasa K (EDT), 20 µL de Tritón X-100 y 180 µL de amortiguador de lisis (LDT) y se mezcló por vortex a máxima velocidad durante 15 segundos, con incubación a 65°C / 20 min.

Posteriormente se dio un pulso de micro centrífuga y se adicionaron 240 µL de etanol puro, mezclando por vortex durante 15 segundos, y finalmente se dio un último pulso de micro centrífuga. A continuación, se transfirió el lisado a través de una columna incluida en el dispositivo Quickgene – Mini 80 y se realizaron 3 lavados con 600 µL de amortiguador de lavado (WDT), por último se utilizaron 30 µL de agua MiliQ para eluir el DNA y se guardó a – 4°C hasta su uso.

del gen *cspA*, el cual codifica para una de las proteínas de choque frío que permiten la expresión de genes a bajas temperaturas, integra el elemento potenciador de la traducción (TEE), una pequeña secuencia peptídica que permite la sobreexpresión de las proteínas, la secuencia de resistencia a Ampicilina (Amp^r), un sitio múltiple de clonación en donde se encuentran los sitios de restricción de las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, y además una cola de seis histidinas que permite la purificación de la proteína (Figura 5).

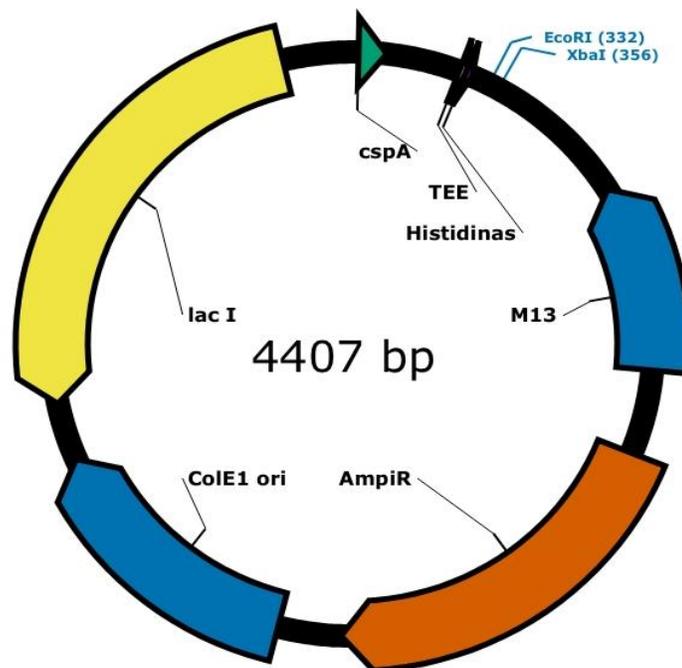


Figura 5. Mapa general del vector pCold I.

V.2.1.5 Purificación de productos de PCR y digestiones enzimáticas

Los productos de reacción de PCR y digestión enzimática se purificaron utilizando el Kit QIAquick PCR Purification (Qiagen): Se agregaron 5 volúmenes de amortiguador PB por cada volumen de muestra, luego se colocó una columna QIAquick spin sobre un tubo colector de centrifuga y se agregó la muestra a purificar, la cual fue centrifugada durante 30 – 60s a 13,000 rpm. Luego se desechó la muestra contenida en el tubo colector y se lavo la columna, agregando 0.75 ml

de amortiguador PE sobre la columna y después se centrifugó por 30 – 60s a 13,000 rpm, se desechó el eluido contenido en el tubo colector y se centrifugó la muestra durante 1 min. A continuación, se colocó la columna sobre un tubo colector limpio de 1.5 ml y se agregó 30 μ L de agua para eluir, se dejó reposar por 1 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min.

V.2.1.6 Reacción de ligación de pCold – yfmL

Se realizaron las siguientes reacciones de ligación ajustando a un volumen final de 30 μ L e incubando a 16°C durante toda una noche:

- A) 6 μ L de Agua, 6 μ L de amortiguador (5X), 4 μ L del vector pCold doble digerido, 12 μ L del fragmento yfmL doble digerido y 2 μ L de enzima Ligasa
- B) Control de ligación: 16 μ L de agua, 6 μ L de amortiguador (5X), 4 μ L de pCold sin digerir y 2 μ L de la enzima Ligasa.

V.2.1.7 Transformación de *E. coli* TOP10 por electroporación

Para llevar a cabo la transformación de las células se descongeló un vial de células electrocompetentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen) y se mezcló con 5 μ L del producto de la reacción de ligación sobre una membrana de diálisis para eliminar las sales presentes. Posteriormente se colocó la reacción en el fondo de la celda de electroporación (previamente colocada en hielo), y se agregaron 50 μ L de las células mezclándose cuidadosamente y se electroporó a 2.5 volts en el equipo Gene pulser. A continuación, se resuspendieron las células en 400 μ L en medio líquido (LB) y se mantuvieron a 37°C con agitación durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm / 3 min y se decantó el sobrante para resuspender la pastilla en 200 μ L de medio líquido (LB) y se sembró por extensión en placa (medio LB con 100 μ g/mL de ampicilina) a 37°C durante toda una noche.

V.2.1.8 Escrutinio genético mediante PCR

Posteriormente se analizaron las transformantes obtenidas las cuales fueron seleccionadas al azar, para lo cual, se llevó a cabo una reacción de PCR para buscar la presencia del fragmento de 1128 pb, utilizando las siguientes condiciones para cada reacción:

7 μ L de la Mezcla SuperMix High Fidelity (Invitrogen), 1 μ L de oligo pFyfml, 1 μ L de oligo pRyfmL

- | | | |
|------------------------|---|-----------|
| 1. - 94°C / 5 min | } | 1 ciclo |
| 2. - 94°C / 30 s | | 30 ciclos |
| 3. - 50° C / 1 min | | |
| 4.- 70° C / 1 min 30 s | | |
| 5.- 72° C / 8 min | | 1 ciclo |

V.2.1.9 Extracción de DNA plasmídico

Las colonias positivas obtenidas fueron transferidas a un medio líquido (10 ml de medio LB con 100 μ g /mL de ampicilina), y se incubaron a 37°C con agitación durante toda una noche en donde posteriormente fueron extraídos los plásmidos utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen):

Se centrifugaron los cultivos celulares a 13,000 rpm / 3 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 300 μ L de amortiguador P1, luego se agregó 300 μ L de amortiguador P2 mezclando cuidadosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se agregaron 300 μ L de amortiguador P3, y se colocaron en hielo durante 5 min seguido de una centrifugación a velocidad máxima durante 10 min en donde se eliminó el sobrenadante. Al mismo tiempo, se equilibró una columna QIAprep agregando 1 ml de amortiguador QBT (dejando fluir). A continuación se aplicó el sobrenadante

obtenido previamente sobre la columna y se hicieron lavados con 1 ml de amortiguador QC, se eluyó el DNA plasmídico añadiendo 800 μ L de amortiguador QF y se precipitó con 560 μ L de isopropanol a temperatura ambiente, centrifugando a 10,000 rpm / 30 min y decantando el sobrenadante cuidadosamente. Finalmente, la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm / 5 min, decantando y resuspendiendo en un volumen de 30 μ L de agua.

V.2.1.10 Análisis de plásmidos por restricción enzimática

Se analizaron los plásmidos obtenidos mediante digestión enzimática con las enzimas *XbaI* y *EcoRI* con objeto de confirmar los resultados obtenidos mediante PCR. Para cada plásmido extraído se prepararon 4 tubos de reacción (A, B, C y D). En donde todos los tubos de reacción contenían 1 μ L de plásmido extraído y 1 μ L de amortiguador más lo siguiente:

- A) 7 μ L de agua.
- B) 1 μ L de *XbaI* y 7 μ L de agua
- C) 1 μ L de *EcoRI* y 7 μ L de agua
- D) 1 μ L de *XbaI*, 1 μ L de *EcoRI* y 6 μ L de agua

Posteriormente se incubó a 37°C durante 1 hora 30 minutos y después de la reacción de digestión se inactivaron las enzimas calentando a 65°C durante 10 min los tubos de reacción.

V.2.1.11 Análisis de DNA por electroforesis

Las extracciones de DNA genómico, DNA plasmídico, digestiones enzimáticas y las reacciones de PCR se cargaron (5 - 10 μ L) en un gel de electroforesis de agarosa al 1% y se corrió a 110 o 120 volts utilizando amortiguador TAE 1X durante 1 hora. Se tiñeron los geles en solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 10 min y se visualizaron utilizando el software Quantity One (Biorad)

V.2.2 Transformación de *E.coli* BL21 Star

Se transformaron células competentes de *E. coli* con la construcción generada pCold-yfmL mediante el método de choque térmico:

Se mezclaron 20 μ L de células BL21 Star con 1 μ L del DNA plasmídico (pCold – yfmL) y se incubó en hielo durante 30 min, aplicando un choque térmico de 45°C durante 45 s. Posteriormente se agregó medio LB y se incubó 1h / 37°, utilizando 200 μ L para sembrar en cajas con ampicilina (100 μ g/ml) e incubando a 37° C durante toda una noche.

V.2.3 Inducción de la expresión del gen *yfmL*

Se recolectaron y se colocaron las colonias transformadas en medio LB (100 mg /ml de ampicilina) y se incubaron a 37°C hasta una densidad óptica de 0.6. Posteriormente se incubó en hielo por 30 min y se indujo con 0.5 mM de IPTG con agitación constante a 16°C durante 21 hrs. Antes y después de la inducción se recuperaron alícuotas las cuales fueron resuspendidas en amortiguador de carga para proteínas. (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol y 20% de glicerol)

V.2.4 Purificación de la proteína YfmL

V.2.4.1 Purificación por Cromatografía de afinidad a histidinas.

La purificación inicial se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad de histidinas: se cosecharon las células BL21 previamente inducidas por centrifugación a 3500 rpm / 30 min a 4°C y se mantuvieron a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento. Posteriormente se resuspendieron en 25 ml de

amortiguador de lisis (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM de NaCl) y se lisaron a 6.81 MPa. Luego se centrifugó a 15,000 rpm / 30 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a una columna previamente equilibrada con níquel. Posteriormente se adicionaron 15 ml de Amortiguador de Lisis (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM de NaCl), 15 ml de amortiguador L2 (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl y 10 mM Imidazol) y 3 ml de amortiguador de elución (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl y 500 mM Imidazol) a través de la columna.

La proteína eluída fue dializada en amortiguador de diálisis (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 M DTT y 2 mM EDTA). Se recolectaron alícuotas en cada paso de purificación en amortiguador de proteínas (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% Azul de Bromofenol y 20% de Glicerol) para su posterior análisis por SDS – PAGE.

V.2.4.2 Purificación por Cromatografía de intercambio iónico.

Se utilizó una columna pre empacada Poly-Prep de 10 ml y se agregaron aproximadamente 2 ml de resina de poliestireno tipo S (Macro – Prep High S Support, Bio-Rad), posteriormente se agregó la proteína previamente purificada yfmL-His₆. Luego fueron colocados a través de la columna 1 ml de los siguientes amortiguadores:

- A) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 50 mM NaCl
- B) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 100 mM NaCl
- C) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 150 mM NaCl
- D) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 200 mM NaCl
- E) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 300 mM NaCl
- F) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 400 mM NaCl
- G) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 600 mM NaCl
- H) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 800 mM NaCl
- I) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 1 M NaCl

J) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 1.5 M NaCl

K) 50 mM Tris – HCl pH 6.8, 1 M DTT, 0.5 M EDTA y 2 M NaCl

Se colectaron 15 μ L de cada una de las muestras eluidas en amortiguador de carga de proteínas (100mM Tris-HCl pH 6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0.2% Azul de Bromofenol y 20% de glicerol) y se conservó el eluido a - 4°C hasta su uso. Posteriormente, se dializó la proteína previamente purificada en amortiguador de diálisis con 50% de glicerol (50mM Tris pH 7.5, 200mM NaCl, 1M DTT y 2mM EDTA), durante una noche y se conservó a - 20°C.

V.2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Durante cada paso de purificación fueron recogidos alícuotas de 50 – 100 μ L, las cuales fueron posteriormente analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% utilizando el equipo de electroforesis de proteínas de GE Healthcare a las siguientes condiciones de corrida: 180 V / 1 hr. Posteriormente el gel se tiñó con azul de coomassie y se visualizó en una lámpara uv.

VI. RESULTADOS

VI.1 Extracción de DNA genómico de *B. subtilis*

Se purificó el DNA genómico de la cepa *B. subtilis* PY79 (Figura 6A) utilizando el QuickGene DNA tissue kit S (Fujifilm) descrito en la metodología y se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como se observa en la Figura 6B no hubo degradación durante el proceso de purificación.

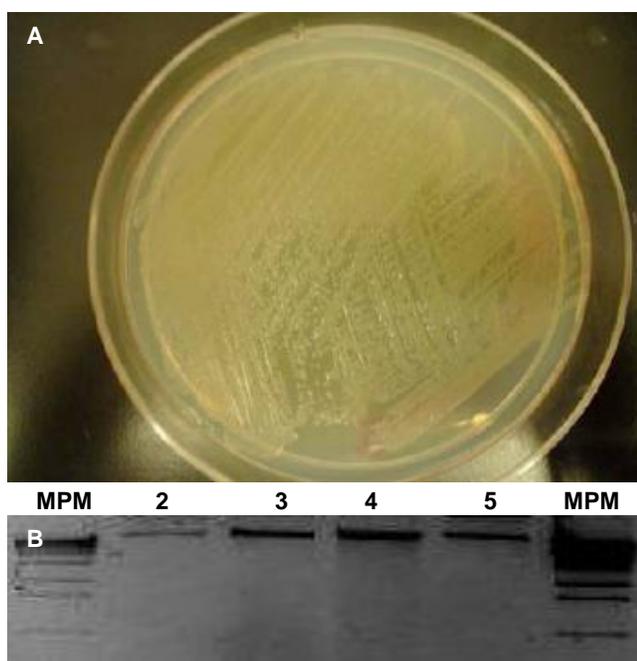


Figura 6. Crecimiento en placa de *B. subtilis* y análisis de DNA genómico. A) Cepa *B. subtilis* PY79 en placa de agar LB. B) En los carriles 2 – 5 perfil de electroforesis de muestras de DNA genómico purificado y en los carriles 1 y 6 (MPM) Marcador de peso molecular. Volumen cargado de 5 μ L.

VI.2 Amplificación del gen *yfmL* por PCR

Se logró la amplificación del gen *yfmL* codificante para una RNA helicasa tipo DEAD mediante PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores pFyfmL y pRyfmL

El tamaño estimado del fragmento es de 1128 pb, en la Figura 7 se muestra el resultado del perfil de electroforesis de DNA obtenido de la amplificación por PCR.

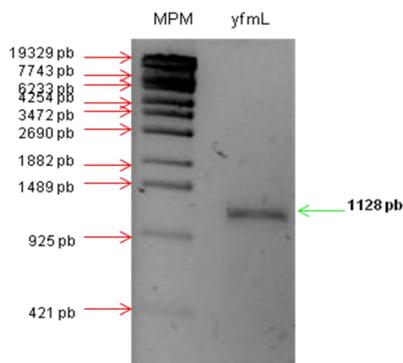


Figura 7. Amplificación por PCR del gen *yfmL*. En el carril izquierdo marcador de peso molecular (MPM), y en el carril derecho fragmento de 1128 pb amplificado por PCR del gen *yfmL*. Volumen cargado de 2 μ L del MPM y 5 μ L del producto de PCR *yfmL*.

VI.3 Análisis de las clonas obtenidas

Una vez obtenido el producto de PCR *yfmL*, éste fue clonado en el vector pCold I como se describe en la metodología. Posteriormente se seleccionaron quince colonias obtenidas de la transformación genética al azar y fueron analizadas por PCR y digestión enzimática. La Figura 8 muestra el resultado del perfil de electroforesis de DNA de la amplificación por PCR del gen *yfmL* de las colonias seleccionadas. Como se puede observar las clonas 1, 4 y 8 forman parte de las clonas que contienen el fragmento *yfmL* de 1128 pb. Una vez obtenidos los resultados de las clonas positivas por PCR se extrajeron los plásmidos de éstas utilizando el método de lisis alcalina utilizando el kit de extracción de plásmidos de QIAGEN[®] descrito en la metodología (Figura 9A) y se llevo a cabo un ensayo de restricción enzimática en donde los plásmidos extraídos fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* con lo que fue posible confirmar la presencia del inserto de 1128 pb (Figura 9B carriles 5 - 9). La construcción obtenida se denominó pCold-

yfmL (Figura 10). Esta construcción fue posteriormente secuenciada por el método de Sanger, para descartar la presencia de mutaciones (Resultados no mostrados)

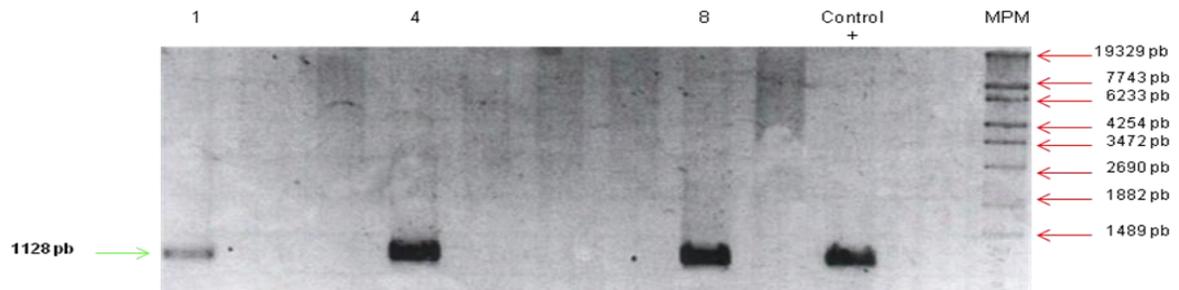


Figura 8. Escrutinio genético mediante PCR de colonia. En el carril 1, 4 y 8 se muestran las clonas que adquirieron el fragmento yfmL de 1128 pb. En el carril 10 el control positivo de reacción y en el carril 12 el marcador de peso molecular Se cargó todo el volumen (10 μ L) del producto obtenido de la reacción de PCR y 2 μ L de MPM.

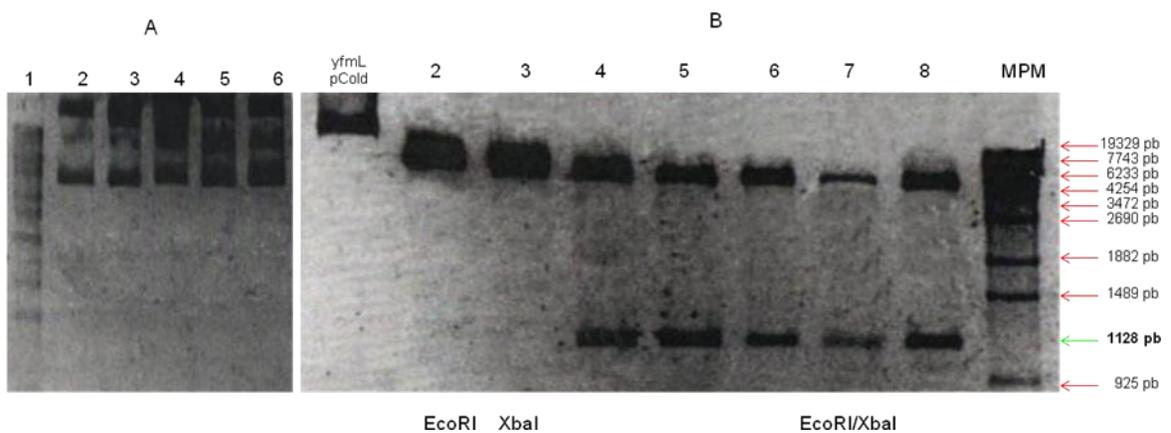


Figura 9. DNA plasmídico y ensayo de digestión enzimática con *EcoRI* y *XbaI* de las clonas positivas. A) En el carril 1 se muestra el Marcador de peso molecular. Los carriles 2 - 6 muestran los plásmidos aislados. Volumen cargado por muestra (10 μ L). B) El carril 1 muestra la construcción pCold-yfmL no digerida. El carril 2 muestra la construcción pCold-yfmL digerida con *EcoRI*. El carril 3 muestra una la construcción pCold-yfmL digerida con *XbaI*. Los carriles 4 al 8 muestran los diferentes plasmidos extraídos digeridos con *EcoRI* y *XbaI* las cuales liberaron el fragmento de 1128pb.El carril 9 muestra el marcador de peso molecular.

VI.4 Análisis de la inducción de *yfmL*

Se transformó la cepa de *E. coli* BL21 Star con la construcción pCold-*yfmL*, se creció en medio líquido LB hasta una densidad óptica de 0.6. Posteriormente se indujo la expresión de *yfmL* con IPTG como se describe en la metodología. El análisis de la fracción proteica por SDS-PAGE después la inducción con IPTG durante 21 horas (Figura 11 carril 2) mostró la presencia de una banda con mayor intensidad en comparación con la fracción proteica sin inducir (Figura 11 carril 1), lo que indica la inducción de la expresión proteica y que concuerda con el peso teórico aproximado de 42kDa dado por su composición de aminoácidos presentes en la proteína.

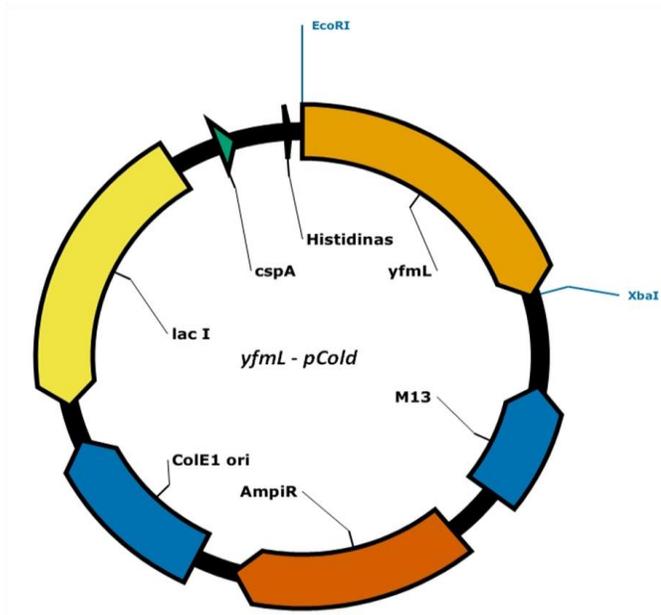


Figura 10. Mapa de la construcción pCold-*yfmL*. Entre los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* se encuentra el gen *yfmL* de 1128 pb.

VI.5 Análisis de las fracciones de proteína obtenida

Como se observa en el análisis de las fracciones por SDS – PAGE (Figura 11), la proteína recombinante es encontrada tanto en la fracción soluble como en la pastilla (Figura 11 carril 3 y 4), lo que permitió su posterior purificación por

cromatografía de afinidad. Las células cosechadas después de la inducción fueron lisadas con la prensa francesa a 6.81 MPa y se separó la fracción soluble del extracto celular por centrifugación. Esta fracción se inyectó en una columna de afinidad a histidinas, previamente equilibrada con níquel (Figura 11 carril 5). La proteína unida a la matriz se eluyó de la columna aumentando la concentración de Imidazol de 10 mM a 500 mM como se describe en la metodología. (Figura 11 carriles 6 – 8).

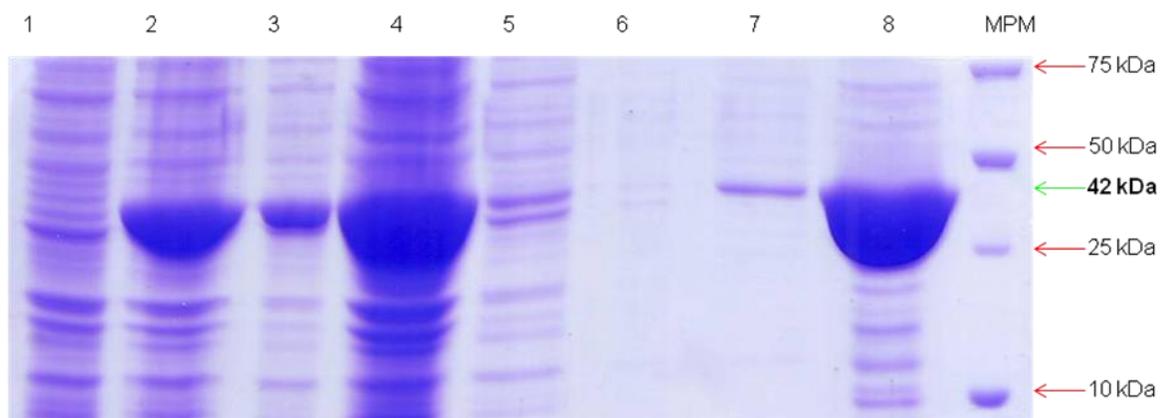


Figura 11. SDS-PAGE al 10% de la Sobreexpresión de la proteína YfmL y análisis de las fracciones después de la lisis celular. La expresión se llevo a cabo en 1L de medio LB con 0.5 mM de IPTG a 16°C durante 21h. (1) sin inducir (2) inducción con IPTG 0.5 M (3) fracción soluble (4) pastilla (5) fracción total (6) primer lavado con 200 mM NaCl (7) segundo lavado con 10 mM de Imidazol (8) proteína eluida con 500 mM Imidazol (MPM) Marcador de peso molecular de 250 kDa Precision Plus Protein Standards de Bio-Rad.

VI.6 Purificación por Cromatografía de intercambio iónico

La fracción de proteína purificada por cromatografía de afinidad contenía otras proteínas de no interés (Figura 11 carril 8), por lo que se llevó a cabo un paso intermedio de purificación para eliminarlas de la muestra mediante diálisis como se describe en la metodología (Figura 12 carril 1). Posteriormente se llevó a cabo un

segundo paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico para poder separar las especies de proteínas presentes en base a su carga eléctrica en donde se decidió utilizar como matriz catiónica de tipo S. La proteína se eluyó utilizando un gradiente de NaCl desde 50 mM a 2 M a un pH de 6.8. La concentración de elución de la proteína fue de 1000 mM de NaCl. (Figura 12 carril 2)

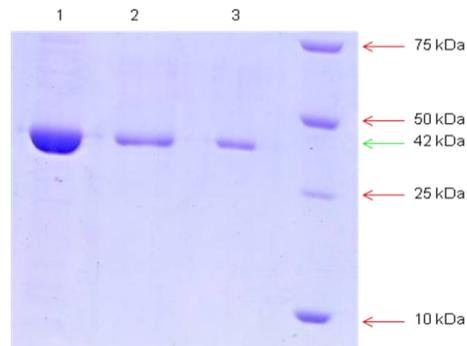


Figura 12. SDS-PAGE de los últimos tres pasos de purificación de YfmL (1) Proteína recombinante YfmL dializada después de su purificación por cromatografía de afinidad (2) fracción correspondiente a la proteína eluida con 1000 mM de NaCl durante la cromatografía por intercambio iónico. (3) proteína recombinante yfmL dializada en glicerol al 50% después de su purificación por cromatografía de intercambio iónico.

Una vez determinada la fracción en que la proteína se encontraba, se llevó a cabo una segunda diálisis utilizando glicerol al 50% con el objetivo de conservar la proteína a una temperatura de - 20°C y en donde se utilizó un regulador con 50mM Tris pH 7.5, 200mM NaCl, 1M DTT y 2mM EDTA. El resultado obtenido se analizó por SDS-PAGE (Figura 12 carril 3).

VII. DISCUSIÓN

La biología molecular se ha desarrollado satisfactoriamente en las últimas décadas permitiendo una revolución en el desarrollo de nuevas tecnologías que derivan de ésta. El desarrollo de estas nuevas tecnologías así como las posibles fusiones con otras tecnologías existentes permiten abordar los retos científicos y tecnológicos con nuevos enfoques y de una manera más eficiente. Una de estas tecnologías en auge es la biología o genómica estructural, la cual se enfoca en el análisis molecular de las estructuras biológicas tales como ácidos nucleicos y proteínas con objeto de resolver sus funciones. El impacto de esta tecnología ya está presente, para inicios del año 2005 el 44% de las estructuras resueltas se utilizaron técnicas de genómica estructural. Así también es importante conocer los aspectos bioquímicos de las proteínas. El avance en la correlación función – estructura de las proteínas permitirá diseñar proteínas con nuevas actividades catalíticas.

Un grupo de proteínas conocidas como RNA helicasas de la familia DEAD o proteínas de caja DEAD han comenzado a centrar la atención de la investigación relacionada con la regulación de la expresión génica. Es decir, todos aquellos procesos moleculares que van desde la transcripción de una molécula de DNA hasta la formación de una proteína a partir de un RNA mensajero (Latchman, 2005). El estudio de las proteínas de caja DEAD ha sido enfocado a diferentes organismos debido a que se han encontrado algunas diferencias particulares que ayudan a entender los mecanismos de regulación propios de estos. Por ejemplo: YxiN que es la proteína homóloga de DbpA en *E. coli* que participa en la degradación del RNA mediante la interacción con la subunidad 23S del RNA ribosomal, la especificidad que tiene al RNA es menor que la de DbpA, lo cual puede reflejar el hecho de que YxiN se une más estrechamente a todos los RNAs. Esta estrecha interacción con el RNA podría potenciar el las interacciones no específicas RNA – proteína (Kossen y Uhlenbeck, 1999).

Entre las estrategias utilizadas para estudiar la estructura – función de las proteínas DEAD se encuentran los sistemas de producción o expresión de proteínas. Dentro de los sistemas de producción de proteínas heterólogas existe una gran diversidad de microorganismos, entre ellos las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como las células de mamífero y células de insecto entre otros más. Sin embargo, *E. coli* ha permanecido como el sistema de producción más atractivo debido a su capacidad de crecer a densidades altas utilizando diferentes sustratos, su genética bien caracterizada y la amplia diversidad de cepas y vectores de clonación comerciales que son compatibles. Entre las cepas de *E. coli* más utilizadas para la expresión de genes se encuentran BL-21, K-12, Origami y sus derivados.

En este trabajo experimentamos la expresión de la RNA helicasa YfmL en las cepas BL21 Star y BL21 Rosetta 2 (Resultados no mostrados) de las cuales obtuvimos resultados positivos solo con BL21 Star, lo cual hace énfasis en el fondo genético que posee cada una. BL21 Star es deficiente de ribonucleasas lo cual incrementa la estabilidad de los RNA mensajeros y BL21 Rosetta 2 contiene un plásmido extra (pRARE) con RNAs de transferencia no comunes en *E. coli* (Mairhofer y col., 2010), por lo que se sugiere la incompatibilidad del sistema de codones utilizado en BL21 Rosetta 2 con el utilizado por la proteína YfmL.

Otro aspecto que debe ser considerado es el vector que se va a utilizar, en donde las características que posea el vector serán uno de los puntos clave para una exitosa expresión y poder así desarrollar una estrategia de purificación. Aquí por ejemplo: Se utilizó el vector de expresión pCold I en donde su principal característica que lo diferencia de muchos de los vectores disponibles es que contiene la secuencia promotora CspA, la cual codifica para una proteína de choque frío que permite la expresión de proteínas a baja temperatura por permitir la adaptación climática de *E. coli* de 37°C a 15°C. Este hecho en particular, facilita la solubilidad de la proteína y por lo tanto disminuye la formación de cuerpos de inclusión, un problema muy común en la producción de proteínas recombinantes y

que dificulta el proceso de purificación, la reacción de agregación se favorece a altas temperaturas debido a la fuerte dependencia de la temperatura sobre las interacciones hidrofóbicas que determinan la reacción de agregación. Al reducir la temperatura hay una parcial eliminación de proteasas de choque térmico, lo que explica el incremento de la estabilidad y el correcto doblamiento de las proteínas a baja temperatura (Sorensen y Mortensen, 2005).

Curiosamente se ha reportado la interacción entre la RNA helicasa de *B. subtilis* YqfR con CspA lo que sugiere un posible rol de las proteínas DEAD en la adaptación al frío, tema que ha sido recientemente tratado para las proteínas DEAD de *E. coli* en comparación con sus homólogas en *Pseudoalteromonas haloplanktis* y *Colwellia psychrerythraea* desde el punto de vista relacionado con las constantes de actividad enzimática (Cartier y col., 2010)

Aunque encontramos una significativa proporción de proteína en la fracción insoluble, obtuvimos la suficiente cantidad de proteína para su purificación en la fracción soluble. Las etiquetas de afinidad son una herramienta muy importante para facilitar la purificación de proteínas recombinantes, las mas comúnmente utilizadas son las de poli-histidinas (His-tag) y las de glutatión S - transferasa (GST). La inclusión de etiquetas de histidinas dentro de la proteína permite su purificación utilizando el sistema IMAC (Immobilized Metal-ion affinity chromatography), el cual se basa en la quelación de iones metálicos; el ion metálico es acomplejado e inmovilizado en una matriz, en este caso se produce la unión del grupo imidazol de la histidina con el ion metálico (Níquel). Sin embargo, este sistema no es recomendado para proteínas que contengan iones metálicos o ricas en cisteínas e histidinas, debido a que se produce una unión inespecífica e indeseable durante el proceso de purificación (ARNAu y col., 2006). En este caso durante el primer lavado con 200 mM de NaCl se eliminaron las interacciones electroestáticas no específicas y aunque en el lavado con 10 mM de Imidazol se pierde una cantidad considerable de proteína que presenta uniones inespecíficas,

la cantidad de proteína que permaneció al final con 500 mM de Imidazol fue considerable.

Consideramos que las características del vector pCold I tuvieron un fuerte soporte para la exitosa expresión y para la purificación de yfmL. Sin embargo, el método de disrupción celular utilizado (prensa francesa) afectó de manera positiva la cantidad de proteína obtenida. La purificación por histidinas permitió la recuperación de una cantidad considerable de proteína, pero además trajo consigo la copurificación de otras proteínas indeseables. En estos casos es recomendable volver a pasar la proteína por la columna de histidinas o llevar a cabo una diálisis que también elimina los iones presentes en la proteína (Amersham Pharmacia Biotech, 2000).

La cromatografía de intercambio iónico es una de las técnicas de purificación de alta resolución más utilizadas en la separación de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas con base a la diferencia en sus cargas electrónicas. El principio de separación se basa en las interacciones reversibles que existen entre una proteína y una matriz iónica, las cuales pueden ser controladas para permitir la unión o elución de la proteína (Amersham Biosciences, 2004). Una proteína se puede unir a una matriz iónica siempre y cuando su pH esté por arriba o debajo de su punto isoeléctrico (pI), ya que cuando la proteína se encuentre a un pH igual a su pI su carga neta será igual a 0, por lo que no podrá interactuar con ningún tipo de matriz. La elección de una matriz depende del pI de la proteína y de su estructura, cuando la proteína tenga un pH por arriba de su pI se unirá a una matriz catiónica y cuando la proteína tenga un pH por debajo de su pI se unirá a una matriz aniónica (Bonner, 2007).

En este caso debido a que la proteína se encontraba en un pH de 7.5, debajo de su pI teórico de 9.6 y debido a que se encontró estable en estas condiciones, se decidió utilizar una matriz de tipo S, la cual contiene el grupo SO_3^- , el cual es un fuerte intercambiador catiónico y la cual es ideal para purificar proteínas neutras y

básicas, la elección de un amplio gradiente de elución con NaCl desde 50 mM a 2 M permitió obtener la proteína con una mayor pureza que la obtenida durante la cromatografía de afinidad. Así entonces, al aumentar la fuerza iónica las interacciones débiles de las especies proteicas fueron eliminadas al inicio y como era de esperarse la proteína eluyó en una de las concentraciones más altas de sales (1M). Aunque en dicho proceso se elimina una cantidad muy significativa de proteína, nosotros decidimos utilizarla debido a que nos asegura la obtención de una proteína pura, conteniendo un solo tipo de especie proteica, lo cual ayudara a reducir el error de valores de actividad enzimática que podría existir al realizar los ensayos enzimáticos utilizando diferentes tipos de especies proteicas.

Existe frecuentemente la necesidad para guardar las proteínas purificadas por largos periodos de tiempo, por lo que es de vital importancia que la proteína permanezca estable y activa biológicamente. El método de conservación seleccionado y la naturaleza de la proteína determinarán el tiempo por el cual esta se mantendrá estable (Cutler, 2004). El método que se utilizo fue la diálisis en glicerol al 50% el cual permite la conservación de la proteína en estado líquido a -20°C hasta por 1 año. Por otro lado será necesario considerar el efecto que puede tener el glicerol sobre la actividad enzimática. También será necesario cuantificar la proteína obtenida para poder calcular los rendimientos obtenidos y para poder saber las cantidades necesarias a utilizar en los ensayos bioquímicos, los cuales nos darán una mayor visión acerca de las funciones en las que puede participar YfmL y nos permitirán obtener datos que puedan ser comparables a los obtenidos para otros organismos similares. Sin embargo, podría esperarse a obtener constantes pequeñas en las actividades ensayadas como ya se ha reportado para otras proteínas DEAD, debido a que las proteínas DEAD se encuentran interactuando con otras proteínas in vivo, hecho que afecta la actividad enzimática in vitro.

VIII. CONCLUSIONES

- Se clonó el gen *yfmL* de *B. subtilis* en el vector de expresión pCold I.
- Se expresó satisfactoriamente la proteína DEAD YfmL en células de *E. coli* BL21 Star utilizando la inducción con IPTG 0.5 mM a 16°C
- Se purificó la proteína mediante una columna de afinidad a histidinas, seguido de una cromatografía de intercambio iónico (matriz tipo S) con un gradiente de 50 mM a 2M de NaCl.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Amersham Biosciences. 2004.** Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods. 1a ed., Amersham Biosciences, Suecia: 11-25
- Amersham Pharmacia Biotech. 2000.** The Recombinant Protein Handbook Protein Amplification and Simple Purification. 1a ed., Amersham Pharmacia Biotech AB, Suecia: 65
- Ando, Y., y Nakamura, K. 2006.** Bacillus subtilis DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 70(7):1606-1615.
- ARNAu, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J. 2006.** Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. Protein expression and Purification. 48:1-13
- Bleichert, F., Baserga, S.J. 2007.** The long unwinding road of RNA helicases. Molecular Cell 27:339–352
- Blum, S., Schmid, S.R., Pause, A., Buser, P., Linder, P., Sonenberg, N., Trachsel, H. 1992.** ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academic of Sciences (PNAS) 89:7664–7668
- Bonner, P. 2007.** Protein Purification The Basics. 1a ed., Taylor and Francis Group, Estados Unidos: 79-83
- Cartier, G., Lorieux, F., Allemand, F., Dreyfus, M., Bizebar, T. 2010.** Cold Adaptation in DEAD-Box Proteins. Biochemistry. 49: 2636-2646
- Caruthers, J.M., McKay, D.B. 2002.** Helicase structure and mechanism. Current Opinion in Structural Biology.12:123 –133.
- Chandonia J., y Brenner, S. 2006.** The Impact of Structural Genomics: Expectations and Outcomes. Science. 311, 347- 351
- Cheng Z., Coller J., Parker R., Haiwei S. 2005.** Crystal structure and functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p. RNA. 11:1258–1270

Collins, R., Karlberg, T., Lehtio, L., Schutz, P., van den Berg, S., Dahlgren, L.G., Hammarstrom, M., Weigelt, J., y Schuler, H. 2009. The DExD/H-box RNA helicase DDX19 is regulated by an α -helical switch. *The Journal of Biological Chemistry*. 284, 10296–10300.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K. y Linder, P. 2005. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37.

Cordin, O., Tanner, N.K., Doere, M., Linder, P., y Banroques, J. 2004. The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. *The EMBO Journal*. 23: 2478–2487.

Cutler, P. 2004. *Methods in Molecular Biology Protein Purification Protocols*. 2da ed., Human Press, Nueva Jersey: 323-343.

Fairman, M.E., Maroney, P.A., Wang, W., Bowers, H.A., Gollnick, P., Nilsen, T.W., Jankowsky, E. 2004. Protein displacement by DExH/D RNA helicases without duplex unwinding. *Science* 304: 730–734

Fan, J.S., Cheng, Z., Zhang, J., Noble, C., Zhou, Z., Song, H., y Yang, D. 2009. Solution and crystal structures of mRNA exporter Dbp5p and its interaction with nucleotides. *Journal of Molecular Biology*. 388, 1–10.

Gellisen, G. 2005. *Production of Recombinant Proteins Novel Microbial and Eukariotic Expression Systems*. 1a. ed. Wiley-VCH, Alemania: 7-37.

Gorbalenya y Koonin, E.V. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology*. 3, 419–429.

Hunger, K., Beckering, C.L., Wiegeshoff, F., Graumann, P.L., Marahiel, M.A. 2006. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Bacteriology*. 188, 240–248

Iost, I., Dreyfus, M., Linder, P. 2006. DEAD-BOX RNA Helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 34:4189–97.

Jankowsky, E., y Fairman, M.E. 2007. RNA helicases - one fold for many functions. *Current Opinion in Structural Biology*. 17, 316–324.

Karginov, F.V., Caruthers, J.M., Hu, Y., McKay, D.B., Uhlenbeck, O.C. **2005.** YxiN is a modular protein combining a DEx(D/H) core and a specific RNA-binding domain. *JouRNAI of Biological Chemistry*, . 280, 35499–35505.

Karow, A.R., y Klostermeier, D. **2009.** A conformational change in the helicase core is necessary but not sufficient for RNA unwinding by the DEAD box helicase YxiN. *Nucleic Acids Research*. 37: 4464-4471.

Kossen, K., y Uhlenbeck, O.C. **1999.** Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Research*. 27, 3811–3820.

Kunst, F. et al. **1997.** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249–256.

Latchman, D.S. **2005.** Gene Regulation A eukaryotic perspective. 5a. ed., Taylor & Francis Group, Reino Unido: 39-75.

Linder, P. **2006.** Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Research*. 34: 4168-4180.

Mairhofer, J., Wertz, J., Flanagan, B., Ross, M., Landick, R., Karp, P., Reshma, P. S. **2010.** http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes

Marsden, S., Nardelli, M., Linde,r P., McCarthy, J.E. **2006.** Unwinding single RNA molecules using helicases involved in eukaryotic translation initiation. *JouRNAI of Molecular Biology*. 361:327–335.

Napetschnig, J., Kassube, S.A., Debler, E.W., Wong, R., Blobel, G., y Hoelz, A. **2009.** Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup214 and the DEAD-box helicase Ddx19. *Proceedings of the National Academic of Sciences (PNAS)*. 106:3089-3094

Pugh, G.E., Nicol, S.M., Fuller-Pace, F.V. 1999. Interaction of the *Escherichia coli* DEAD box protein DbpA with 23 S ribosomal RNA. *JouRNAI of Molecular Biology*. 292: 771–778

Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M.F., Konrat, R., Blasi, U., and Schroeder, R. **2007.** RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biology*. 4: 118-130.

Rocak, S., y Linder, P. 2004. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*. 5: 232-241

Rogers, G.W., Richter N.J., Merrick W.C. 1999. Biochemical and Kinetic Characterization of the RNA Helicase Activity of Eucaryotic Initiation Factor 4A. *JouRNAI of Biological Chemistry*. 274: 12236–44

Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., Sonenberg, N. 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular Cell Biology*. 10: 1134-1144

Shen, J., Zhang, L., Zhao, R. 2007. Biochemical characterization of the ATPase and helicase activity of UAP56, an essential pre-mRNA splicing and mRNA export factor. *JouRNAI of Biological Chemistry*. 282:22544–22550.

Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G., Lin R.J. 2003. DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* 312:1–16.

Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 4:1

Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques J., Doere M., Linder P. 2003. The Q motif: A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Molecular Cell*. 11 (1), pp. 127-138.

Uhlmann-Schiffler, H., Jalal, C., Stahl, H.N. 2006. Ddx42p—a human DEAD box protein with RNA chaperone activities *Nucleic Acids Research*. 34, 10–22

von Moeller, H., Basquin, C. and Conti, E. 2009. The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. *Nature Structural and Molecular Biology*. 16, 247-254

Wang, S., Overgaard, M.T., Hu, Y., McKay, D.B. 2007. The *Bacillus subtilis* RNA Helicase YxiN is Distended in Solution. *Biophysical JouRNAI*. 94:L01–L03

Yang, Q., Jankowsky, E. 2005. ATP- and ADP-dependent modulation of RNA unwinding and strand annealing activities by the DEAD-box protein DED1. *Biochemistry*. 44:13591–13601.

X. ANEXOS

Información relevante de la proteína YfmL

Secuencia de Aminoácidos:

MTQTPWFLHNAQSFIQENWNASGFQKPTPVQEQAQLIMDGKDVIAESPTGTGKT
LAYALPVLERIKPEQKHPQAVILAPSRELVMQIFQVIQDWKAGSELRAASLIGGANV
KKQVEKLLKHPHIIVGTPGRVFEKAKKLMHEVKTIVLDETDQLVLPEHRETMKQI
IKTTLRDRQLLCFSATLKKETEDVLRQAQPEVLRKQVRSKAEAGKVKHQYLICDQ
RDKVKLLQKLSRLEGMQALVFVRDIGNLSVYAEKLAYHHVELGVLHSEAKKMER
KIIATFEDGEFPLLLATDIAARGLDIENLPYVIHADIPDEDGYVHRSGRTGRAGKEGV
LSLVTKLEESKLLKMAKGLGVELSEAVYAGGKTK

Numero de aminoácidos: 376

Peso molecular: 42189.1 Da

Punto isoeléctrico teórico: 9.21

Composición de aminoácidos

Ala (A)	32	8.5%
Arg (R)	17	4.5%
Asn (N)	7	1.9%
Asp (D)	16	4.3%
Cys (C)	2	0.5%
Gln (Q)	22	5.9%
Glu (E)	33	8.8%
Gly (G)	23	6.1%
His (H)	12	3.2%
Ile (I)	22	5.9%
Leu (L)	44	11.7%

Lys (K)	41	10.9%
Met (M)	8	2.1%
Phe (F)	9	2.4%
Pro (P)	15	4.0%
Ser (S)	15	4.0%
Thr (T)	19	5.1%
Trp (W)	3	0.8%
Tyr (Y)	7	1.9%
Val (V)	29	7.7%

Número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 49

Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 58

Composición atómica:

Estructura secundaria:

Carbón	C	1889
Hidrogeno	H	3096
Nitrógeno	N	524
Oxígeno	O	545
Sulfuro	S	10

Alfa hélice: 60.64%
Cadena extendida: 9.84%
Rollo aleatorio: 29.52%

Formula: $C_{1889}H_{3096}N_{524}O_{545}S_{10}$

Número total de átomos: 6064

Índice de inestabilidad:

El índice de estabilidad es de 33.92

Esto clasifica a la proteína como estable

Localización celular: Citoplasma