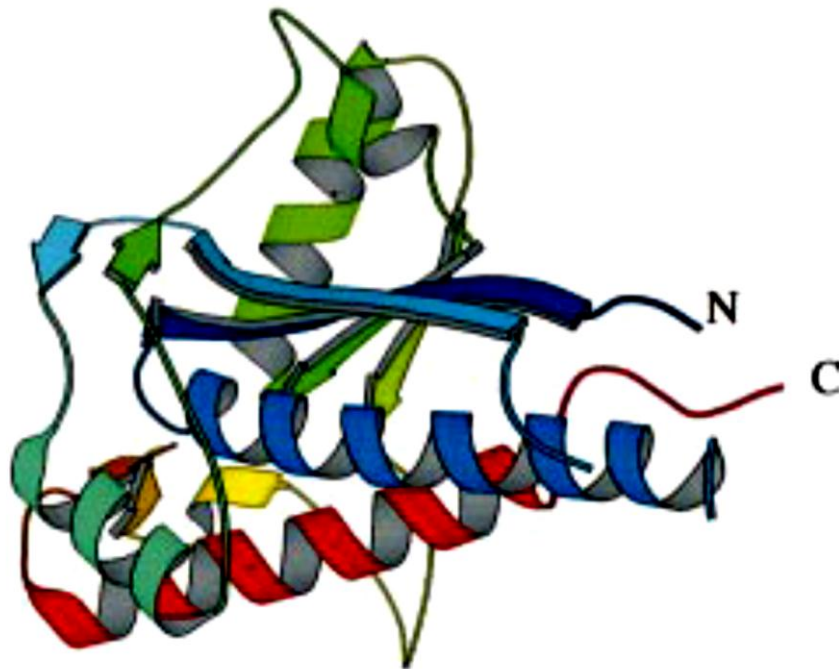




CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN



Trabajo de Fin de Grado

Tania Calvo López

Dirigida por Dra. Ana M^a Rodríguez Torres

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1-3
1. Proteínas de fusión a GST.....	1,2
2. La proteína Ssu72 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,3
OBJETIVOS.....	4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	5-11
1. Líneas celulares.....	5
a. Línea celular de bacterias.....	5
2. Plásmidos.....	5-6
a. VECTOR-GST (pGEX-2TK).....	5,6
b. ScSsu72-GST.....	6
3. Medios de cultivo.....	6-7
a. LBA (Medio Luria-Bertani con Ampicilina).....	6,7
4. Obtención de ácidos nucleicos.....	7
a. Obtención de DNA plasmídico a partir de bacterias.....	7
b. Medida de la concentración de DNA.....	7
5. Métodos de transformación.....	7-8
a. Transformación de bacterias.....	7,8
6. Técnicas de purificación proteica.....	8-9
a. Extractos celulares.....	8
b. Columna cromatográfica de afinidad: Glutathione Sepharose 4B.....	8
c. Diálisis.....	9

ÍNDICE

- d. Determinación de la concentración proteica: Método de Bradford.....9
- 7. Técnicas de caracterización proteica.....9-11
 - a. Electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida: SDS_PAGE.....9,10
 - b. Tinción de geles de acrilamida.....10
 - c. Medida de la actividad enzimática fosfatasa.....10,11

RESULTADOS

- 1. Construcción *in silico* de un plásmido conteniendo la proteína de fusión Ssu72-GST de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.....12-14
 - a. Diseño de cebadores para clonar el gen SSU72 en el vector de expresión pGEX-2TK.....12,13
 - b. Técnica de la PCR para la obtención de DNA del gen SSU72 a insertar en el vector.....13
 - c. Obtención del plásmido SSU72-GST: clonación del gen SSU72 obtenido por PCR en el MSC (sitio de clonaje múltiple) del vector pGEX-2TK.....13,14
- 2. Purificación de dos proteínas de fusión: ScSsu72-GSTp y GSTp...14-19
 - a. Extractos celulares.....14,15
 - b. Columna cromatográfica de afinidad: Glutathione Sepharose 4B.....15,16
 - c. Diálisis.....16,17
 - d. Determinación de la concentración proteica: Método de Bradford.....17
 - e. Electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida: SDS_PAGE.....17,18,19
- 3. Caracterización de la proteína ScSsu72-GSTp.....19-21
 - a. Determinación del peso molecular.....19
 - b. Medida de la actividad enzimática fosfatasa.....19,20,21

CONCLUSIONES.....22

ABREVIATURAS.....23-24

BIBLIOGRAFÍA.....25-26

INTRODUCCIÓN

1. PROTEÍNAS DE FUSIÓN A GST

Las proteínas recombinantes son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una especie o una línea celular distinta a la célula original. Estas proteínas pueden modificarse y llegar a perder su función si se expresan en un organismo diferente a aquel en el que fueron formadas. Un ejemplo muy utilizado de proteína recombinante es la insulina creada *in vitro*.

Dentro de las proteínas recombinantes están las llamadas Proteínas de Fusión, polipéptidos originados al traducirse dos o más genes previamente unidos en pauta de lectura para dar lugar a una única proteína. Estos polipéptidos presentan propiedades distintas a las obtenidas en las proteínas originales que generarían estos genes por separado. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente por tecnología de DNA recombinante y son muy utilizadas tanto en investigación como en terapia biológica. Este tipo de proteínas también se puede encontrar en la naturaleza en las células cancerosas, actuando como oncoproteínas.

A la hora de purificar o detectar una proteína de fusión lo más sencillo es utilizarlas fusionadas a otras proteínas por medio del extremo amino o carboxi-terminal, de esta forma, se evita que se formen cuerpos de inclusión, se mejora el plegamiento molecular y se limita la degradación proteolítica. Las proteínas más utilizadas para ello son la proteína A de estafilococo, la G de estreptococo, la proteína de unión a maltosa (MBP) y la glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* (Smith *et al.*, 1988).

El uso de GST (Figura 1) es muy útil a la hora de realizar la purificación proteica por medio de una cromatografía de afinidad en la que el glutatión se encuentra inmovilizado en una matriz de "Sepharose". Al pasar la solución proteica por la columna, la proteína quedará unida al ligando, mientras que el resto de componentes son lavados a través de ella. Posteriormente esta proteína se podrá eluir, con la ayuda de un buffer, en condiciones no desnaturizantes de forma que se preserve la función y la antigenicidad de la proteína. Todo esto hace que sea muy utilizado en procesos de diagnóstico.

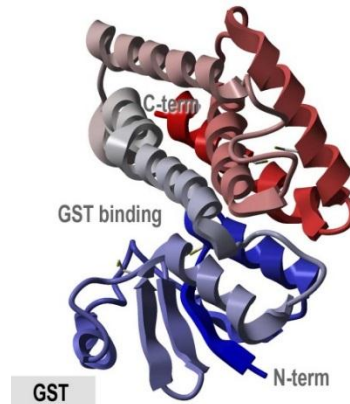


Figura 1.- Estructura cristalográfica de Glutatión S-Transferasa

Las proteínas de fusión a GST se obtienen insertando un gen de una proteína a estudio, o parte de este (por ejemplo un dominio proteico específico), en el sitio de múltiple clonaje y en pauta de lectura de un vector pGEX (que contiene el gen GST) (Amersham Biosciences Handbook, 1994).

2. LA PROTEÍNA Ssu72 DE *Saccharomyces cerevisiae*

La proteína Ssu72 (Figura 2) es una de las fosfatasas principales del dominio carboxilo terminal (CTD) de Rpb1, la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II. La combinación de modificaciones covalentes en CTD es un paso clave en múltiples funciones relacionadas con la expresión génica en el núcleo. Los niveles de fosforilación de Ser5 son esenciales para la elongación, terminación y re-inicio transcripcional así como en el procesamiento del RNA. La proteína Ssu72 fue inicialmente caracterizada en *Saccharomyces cerevisiae*, y está altamente conservada en los organismos eucariotas como en humanos.

Esta proteína tiene la habilidad de actuar como una tirosin-fosfatasa *in vitro* (Meinhart, A., *et al.* 2003) defosforilando específicamente la Ser5-P del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II. (Rodríguez Torres. A.M., *et al.* 2013).

Ssu72

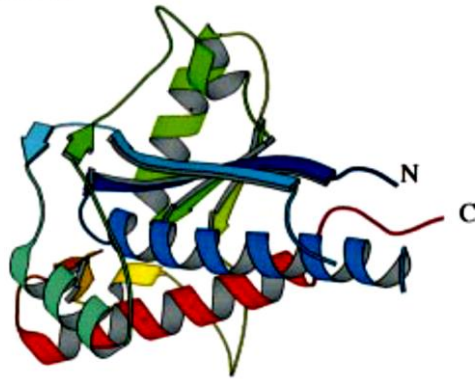


Figura 2.- Estructura tridimensional de Ssu72 de *Saccharomyces cerevisiae*

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La obtención de una proteína de fusión es una estrategia muy utilizada para su posterior purificación y caracterización, ya que con ello se puede conseguir un extracto proteico abundante y de buena calidad sin necesidad de partir de una gran cantidad de muestra biológica. Para ello nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Construcción *in silico* de un plásmido conteniendo la proteína de fusión ScSsu72-GST de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Purificación de dos proteínas de fusión: ScSsu72-GSTp y GSTp.
3. Caracterización de la proteína ScSsu72-GSTp.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

a. LÍNEA CELULAR DE BACTERIAS

Línea celular	Genotipo	Fuente
BL21-(DE3)	<i>hsdS, gal</i> (Δ clts857, <i>ind-1, Sam7, nin-5, lacUV5-T7 gene 1</i>)	Studier F.W., Moffatt B.A., 1986

Tabla 1. Línea celular de bacterias.

BL21(DE3) (Tabla 1): Las cepas bacterianas DE3 contienen el gen de la T7 RNA Polimerasa controlado por el promotor lacUV5. La expresión es inducida con IPTG. Estas cepas proporcionan un alto nivel de expresión y de fácil inducción. Se usa con proteínas no tóxicas.

2. PLÁSMIDOS

Para la realización de este estudio, se emplearon los plásmidos detallados a continuación:

a. VECTOR-GST (pGEX-2TK)

Las proteínas de fusión a GST se obtienen al insertar el gen de la proteína a estudio en el sitio de múltiple clonaje "MCS" de uno de los vectores pGEX (Figura 3). Su expresión está bajo el control del promotor tac, el cual es inducido por el análogo de la lactosa: isopropyl β -D thiogalactosido (IPTG). Además contiene el gen lacIq, cuyo producto es una proteína represora que se une a la región operadora del promotor del gen tac, lo que controla la sobreexpresión del gen insertado hasta la inducción por IPTG.

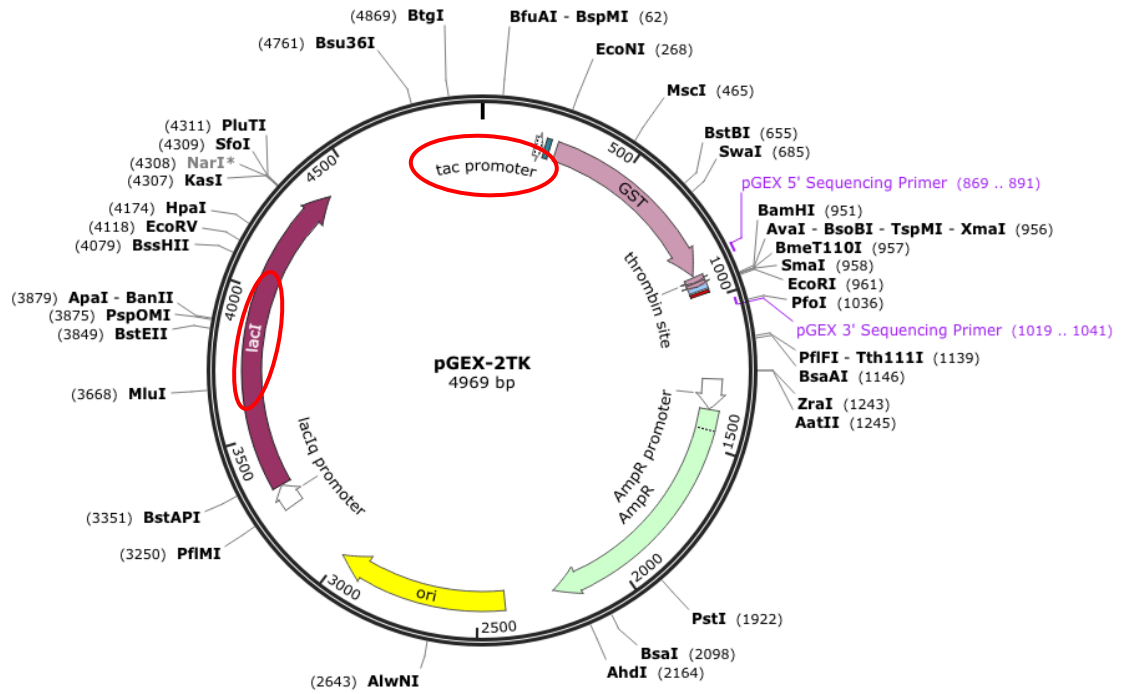


Figura 3. Esquema del vector pGEX-2TK.

b. ScSsu72-GST

Proteína de fusión que contiene el gen ScSsu72 de la levadura *S. cerevisiae* unido a GST en el vector pGEX-2TK.

3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados en cultivos celulares de bacterias se describen a continuación. En el caso de la preparación de placas de cultivo (medios sólidos) se adicionó Bacto-Agar al 1,5%. Además, las soluciones se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión.

a. LBA (Medio Luria-Bertani con Ampicilina)

El medio LBA (medio general de crecimiento de bacterias) es medio LB (Luria-Bertani) (Tabla 2) con Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL (a partir de una solución stock de 100 mg/mL en agua estéril).

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacto-Triptona (GibcoBRL)	1%
Bacto-Yeast Extrac (GibcoBRL)	0,5%
NaCl	0,5%
Dextrosa	0,1%

Tabla 2. Composición medio LB

4. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

a. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO A PARTIR DE BACTERIAS

Para la obtención de DNA plasmídico de alta calidad y sin RNA, se utilizó el Kit Gene JetTM Miniprep de Fermentas®, siguiendo las recomendaciones del fabricante, y el DNA purificado fue resuspendido en 50 μ L de agua destilada estéril.

b. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA

Para realizar la medida de la concentración de DNA se tomaron 3 μ L de la preparación de DNA. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV/Vis de cuantificación de DNA (Implen Nanophotometer®). Se midió la DO_{260} y se calculó la concentración real teniendo en cuenta que $DO_{260}=1$ equivale a una concentración de 50 μ g/mL de DNA.

5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

a. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

La transformación de bacterias se realizó a partir de 100 μ L de células competentes BL21(DE3) conservadas en medio SOC (2% Bactotriptona, 0,5% extracto de levadura, 0,0584% NaCl, 0,0186% KCl) a -80°C . Se descongelaron durante 20 minutos en hielo para después añadir 2 μ L del ADN de los plásmidos a estudio. Se incubaron 5 minutos en hielo, a continuación se les aplicó un choque térmico a 42°C durante 45 segundos, seguido de

MATERIAL Y MÉTODOS

5 minutos de reposo en hielo, tras lo cual se sembraron directamente en placas selectivas adecuadas, en este caso LB suplementadas con Ampicilina (LBA).

6. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN PROTEICA

a. EXTRACTOS CELULARES

Un precultivo en medio LBA de las células BL21(DE3) transformadas con cada uno de los plásmidos recombinantes, fue usado al día siguiente para inocular 350 mL del mismo medio. A una DO^{600} de aproximadamente 0,6 se le añadió IPTG (isopropyl-P-D-thiogalactopyranoside) a una concentración final de 1mM y se dejó crecer el cultivo 2 horas más. Posteriormente las células se recolectaron por centrifugación y resuspendieron en 10 mL de PBS 1X conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas. A continuación, fueron sometidas, en un Sonicador Ultrasónico, a varios ciclos de pulsos de 15 seg y reposo de 15 seg en hielo, durante un período total de 3 minutos. Finalmente las suspensiones se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C durante 10 min y el sobrenadante final (denominado EC: Extracto Celular) fue la muestra a cargar en la columna de afinidad.

b. COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE AFINIDAD: GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B

Se montaron dos columnas cromatográficas de afinidad (CA), para cada una de las proteínas recombinantes a purificar, de unos 2 mL de volumen total, con la resina Glutathione Sepharose 4B resuspendida en el Buffer de la Columna CB (Column Buffer, o también llamado Binding Buffer, que es el mismo buffer PBS 1X utilizado en la preparación del extracto celular). Los lavados se realizaron con el mismo Buffer CB. Y posteriormente, la elución de las proteínas recombinantes unidas a la resina de afinidad fue realizada con el Buffer de Elución EB (Elution Buffer).

Para esta CA específica se utilizaron los siguientes buffer que se detallan a continuación:

- Buffer CB (Column Buffer): PBS 1X (Phosphate Buffer Saline): 140 mM NaCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, y ajustado a pH 6.8.
- Buffer EB (Elution Buffer): 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM GSH (Glutathion reducido).

MATERIAL Y MÉTODOS

c. DIÁLISIS

Una vez comprobado, por electroforesis en gel de acrilamida, cuales de las alícuotas recogidas de la columna contenían las proteínas recombinantes, estas se sometieron a un proceso de Diálisis. Las alícuotas seleccionadas se introdujeron en la membrana de diálisis (Snakeskin Dialysis Tubing 3.5 K MNCO, 35 mm dry I.D. 35 Feet de Thermo Scientific) y posteriormente se sumergieron en 1 L de Buffer PBS 1X dejándose en agitación 24 h a 4°C. Posteriormente las muestras fueron recogidas, y se procedió a concentrarlas en tubos “Amicon Ultra Filter Units” a 5.000 rpm en una centrífuga refrigerada. En este punto se repartieron las muestras purificadas en pequeñas alícuotas de unos 30 µL que se guardaron a -80°C para ensayos posteriores.

d. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA: MÉTODO DE BRADFORD

Para realizar la medida de la concentración proteica se utilizó el Método de Bradford (Bradford, M.M., 1976). Para ello se midió la absorbancia a $\lambda = 595\text{nm}$ de distintas concentraciones de una solución patrón de BSA (Seroalbumina bovina), con cuyos datos se obtuvo una recta patrón a partir de la cual se determinaron las concentraciones proteicas de las proteínas recombinantes purificadas.

7. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN PROTEICA

a. ELECTROFORESIS EN GEL DESNATURALIZANTE DE ACRILAMIDA: SDS_PAGE

Para realizar una electroforesis en sistema discontinuo es necesario preparar soluciones de acrilamida a 2 porcentajes distintos, mezclando las siguientes soluciones stock (Tabla 3):

MATERIAL Y MÉTODOS

Gel separador (Gel acrilamida al 13%)	Gel espaciador (Gel acrilamida al 5%)
<ul style="list-style-type: none">• 2,9 mL de solución de acrilamida/bis-acrilamida (Stock al 45%)• 5,4 mL de agua bidestilada autoclavada• 1,7 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8• 50 µL de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Blyarrylamide) al 20%	<ul style="list-style-type: none">• 1,1 mL de solución de acrilamida/bis-acrilamida (Stock al 45%)• 6,4 mL de agua bidestilada autoclavada• 2,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 6,8• 50 µL de SDS al 20%

Tabla 3. Composición geles electroforesis

Inmediatamente antes de verter los geles, se añadieron 100 µL de Persulfato Amónico (AP) al 10% y 10 µL de TEMED, dejándose polimerizar durante unos 30 minutos. Se utilizó el sistema Miniprotean de BioRad aplicando una corriente eléctrica de 150 V durante aproximadamente unas 2 h.

b. TINCIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA

Una vez terminada la electroforesis, los geles se lavaron previamente 3 veces durante 5 minutos cada lavado con agua para eliminar restos de SDS. Posteriormente, se añadió la solución de tinción Ready To Use (EZBlue Gel Staining Reagent, Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Por último, se decoloró el gel con agua destilada hasta que se obtuvo la resolución deseada en la visualización de las bandas. Para su conservación, se plastificaron en papel “celofán” y se dejaron en una estufa a 30°C durante 12 h.

c. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FOSFATASA

El compuesto p-nitrofenil-fosfato (pNPP) es el sustrato cromogénico utilizado por la mayoría de Fosfatasa alcalinas, Fosfatasa ácidas, Protein-tirosin_fosfatasa (como la proteína Ssu72p a estudio) y Serin/threonin_fosfatasa. La reacción (Figura 4) produce p-nitrofenol

MATERIAL Y MÉTODOS

que tiene un intenso color amarillo bajo condiciones alcalinas y que se puede medir en el espectrofotómetro a $\lambda = 405 \text{ nm}$.

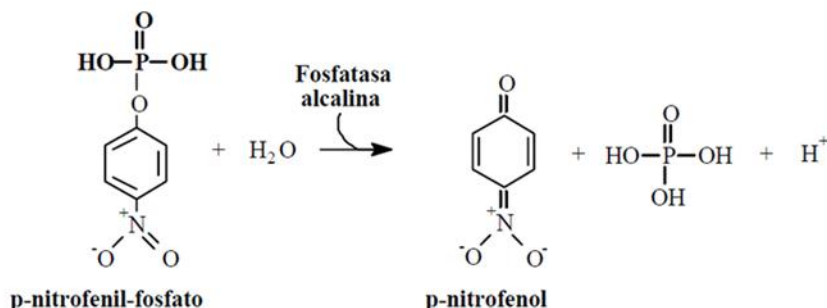


Figura 4. Reacción enzimática de una Fosfatasa usando el sustrato pNPP

El ensayo consiste simplemente en añadir el reactivo pNPP, a distintas concentraciones, a una mezcla que contiene la fosfatasa a estudio, en un Buffer TRIS-HCl 100 mM pH 6,5 + DTT 10 mM. Dicha mezcla de reacción se incuba a 28°C durante 30 minutos, tras lo cual se detiene la reacción añadiendo 500 μL de NaOH 2 M. Y posteriormente se mide la absorbancia a $\lambda = 405 \text{ nm}$.

El análisis de los datos se llevó a cabo realizando al menos 3 ensayos en cada una de las condiciones y, utilizando como Blanco la mezcla de reacción sin la enzima. La actividad enzimática se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer utilizando la ecuación que se indica a continuación, donde el coeficiente de extinción molar para el *p*-nitrofenol es $\epsilon = 1.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, V es el volumen final de la reacción de 1 mL, y la DO^{405} es la absorbancia medida de cada una de las muestras después de los 30 minutos de tiempo de incubación.

$$\text{Actividad Enzimática } (\mu\text{moles/min}) = \frac{V (\mu\text{L}) \times \text{OD}_{405\text{nm}} (\text{cm}^{-1})}{\epsilon \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

RESULTADOS

1. CONSTRUCCIÓN *in silico* DE UN PLÁSMIDO CONTENIENDO LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Ssu72-GST de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Este objetivo se planteó como la primera etapa del proyecto de investigación con el fin de obtener uno de los plásmidos necesarios para realizar el proceso de purificación y caracterización de la fosfatasa Ssu72 de *Saccharomyces cerevisiae*. Este planteamiento se realizó de esta manera con el fin de aprender las técnicas necesarias para desarrollar este objetivo como parte del trabajo de investigación y porque ya se contaba con dicho plásmido en el laboratorio.

Los pasos a seguir necesarios para llevar a cabo este objetivo son los siguientes:

a. Diseño de Cebadores para clonar el gen SSU72 en el vector de expresión pGEX-2TK.

Para diseñar los cebadores del gen SSU72/YNL222W que queremos amplificar, se accede a la página web Saccharomyces Genome Database <http://www.yeastgenome.org/>

Una vez en la página, entramos en el apartado de “gene/sequence resources” e indicamos el gen cuya secuencia deseamos obtener, Ssu72. Además, marcamos unos 500 pb upstream, de forma que se incluye su secuencia promotora para posteriores estudios de regulación de la expresión génica. Buscamos el apartado “Design Primers” y seleccionamos PCR obteniendo así los siguientes cebadores (Tabla 4):

Forward-Primer/FP	<u>GGATTCTGCCTAGTCATCGCAATTCA</u> <i>BamHI</i>
Reverse-Primer/RP	<u>GAATTCTGTGCTCTTTTGAGCAGTCTC</u> <i>EcoRI</i>

Tabla 4. Secuencias Cebadores para la PCR

RESULTADOS

De esta manera conseguimos el gen con su región promotora en el extremo 5' y sin el codón de terminación del extremo 3', y así fusionarlo, en pauta de lectura, con el gen GST del vector donde se va a clonar.

b. Técnica de PCR para la obtención del DNA del gen SSU72 a insertar en el vector

Esto se lleva a cabo en un termociclador donde se incuban: 20 ng de DNA molde (se utiliza DNA genómico de la cepa aGHI de *Saccharomyces cerevisiae*) con 20 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos (FP y RP), en presencia de 0,25 mM de dNTPs, 1 unidad de Taq DNA polimerasa y el tampón proporcionado con la enzima a una concentración 1X, todo ello en un volumen final de 50 µL. Se programan 25 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones (Tabla 5):

Activación inicial de la PCR	3 minutos	95°C
Desnaturalización	1 minuto	95°C
Anillamiento	1 minuto	50°C
25 CICLOS		
Extensión	1 minuto	72°C
Elongación final	5 minutos	72°C

Tabla 5. Desarrollo PCR

c. Obtención del plásmido SSU72-GST: clonación del gen SSU72 obtenido por PCR en el MCS (Sitio de múltiple clonaje, Figura 5) del vector pGEX-2TK

Una vez obtenidas y purificadas las 2 muestras de DNA (inserto y vector), se procede a su digestión con las mismas enzimas de restricción: BamHI y EcoRI.

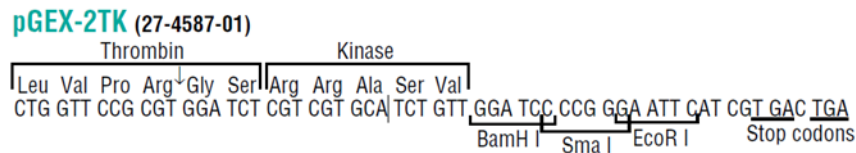


Figura 5. MCS del vector pGEX-2TK

Los fragmentos de DNA se purifican después de una electroforesis en un gel de Agarosa al 0,7%, y posteriormente se procede a la reacción de ligamiento donde ambos DNAs se unen en presencia de la enzima T4 DNA Ligasa. El último paso consiste en transformar las células competentes de bacterias y seleccionar los candidatos al sembrarlas en placas selectivas LBA.

2. PURIFICACIÓN DE DOS PROTEÍNAS DE FUSIÓN: ScSsu72-GSTp y GSTp

Para la expresión de proteínas para su posterior purificación y/o caracterización se utilizan bacterias de la línea celular BL21(DE3), que proporcionan un alto nivel de expresión y de fácil inducción. Por ello en primer lugar se procedió a la extracción, a partir de las placas de cultivo Stock, de los dos DNA plasmídicos: el que contiene el gen *ScSSU72* fusionado a *GST*, y el que contiene solo el gen *GST*. Posteriormente se determinaron sus concentraciones mediante la medida de la DO^{260} , para luego introducir estos DNA en la línea celular BL21(DE3) mediante el llamado proceso de transformación de bacterias, y seleccionando las colonias celulares en medio sólido LBA.

a. EXTRACTOS CELULARES

A partir de 1 colonia celular de cada una de las proteínas de fusión a purificar, se prepararon pre-cultivos celulares, en medio líquido LBA (20 mL), el día anterior para luego inocular unos 350 mL del mismo medio a una DO^{600nm} de 0,05 y se mantuvo en agitación a 37°C durante unas 2 horas hasta que la DO^{600nm} alcanzó un valor aproximado de 0,6, momento

RESULTADOS

en el cual se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se dejaron en agitación otras dos horas más. Posteriormente, los cultivos celulares se centrifugaron a 5.000 rpm a 4°C y durante 5 minutos, se recogieron las células, se lavaron con Buffer PBS 1X, y se guardaron a -20°C hasta la siguiente etapa de purificación. En algunos puntos del proceso se extrajeron alícuotas de 1 mL, que se guardaron también a -20°C.

Los extractos celulares se obtuvieron después de descongelar los cultivos obtenidos anteriormente, disueltos en 10mL de Buffer PBS 1X y se sometieron a una serie de pulsos de sonicación, ciclos de pulsos de 20 % unos 15 seg y reposo de otros 15 seg en hielo, durante un período total de 3 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se cargó directamente en la columna cromatográfica de afinidad.

b. COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE AFINIDAD: GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B

El método utilizado se denomina “Purificación en columna mediante flujo por gravedad” (*Gravity flow column purification*). La resina, Glutathione Sepharose™ 4B, está diseñada para la purificación, en una única etapa, de proteínas recombinantes derivadas de la Glutathione-S-transferase, incluyendo las proteínas de fusión a GST obtenidas usando los plásmidos de expresión de la serie pGEX. Las proteínas se eluyen bajo condiciones suaves y no desnaturizantes que mantienen su funcionalidad.

Se prepararon dos columnas cromatográficas con la resina Glutathione Sepharose 4B de 2,5 mL de volumen total (Figura 6) para cada una de las proteínas de fusión: Ssu72-GST y GST-Vector. En primer lugar fueron regeneradas mediante 2-3 lavados alternando dos buffers: uno de alto y otro de bajo pH. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS 1X, de forma que las columnas quedaron listas para ser utilizadas.

En este momento se cargaron directamente los extractos celulares, anteriormente obtenidos, en las columnas cromatográficas. A partir de este punto fue necesario realizar esta técnica a 4°C, en una nevera, para evitar la desnaturización de las muestras proteicas.

RESULTADOS



Figura 6. Fotografía de las columnas cromatográficas de afinidad

Una vez que los extractos celulares ya han entrado totalmente en la resina, las columnas se lavan, cada una, con unos 15 mL de buffer PBS 1X. El volumen de elución que se obtiene en este paso, denominado “Flow Through”, se recoge en unos tubos que son guardados a -20°C , y que serán utilizados posteriormente para ser cargados en el gel de electroforesis.

La resina consiste en un ligando de glutatión, acoplado a través de un enlazador de diez carbonos a un reticulado de agarosa al 4%, al cual se unen las proteínas de fusión a GST. Por ello, para eluir las proteínas a purificar que han quedado unidas a este ligando de la resina, es necesario añadir unos 3 mL del Buffer de elución o “Elution Buffer” conteniendo 10 mM de GSH. A partir de este momento, se recogieron 5 alícuotas de 0,5 mL de volumen y las 2 últimas alícuotas de 1 mL. Todas las alícuotas recogidas de cada una de las columnas se guardaron de nuevo a -20°C , para ensayos posteriores.

c. DIÁLISIS

Siguiendo con el proceso de purificación, y previamente a la Diálisis, se realizó una electroforesis en SDS_PAGE para confirmar cuales eran las alícuotas recogidas de la cromatografía donde habían eluido las proteínas a estudio y, posteriormente someterlas a la Diálisis.

RESULTADOS

Estas alícuotas se juntaron dentro de una membrana de diálisis (una membrana para cada proteína), que a su vez, fue sumergida en 1 L de Buffer PBS 1X, dejándolo en agitación 12h a 4°C. Dichas membranas sólo permiten el paso a partículas menores de 20.000 Da, por lo que nuestras proteínas van a quedar retenidas en ellas, mientras que las moléculas de GSH utilizadas en el proceso de elución cromatográfico serán eliminadas. El resultado final es una muestra más purificada y regenerada en relación a la estructura y funcionalidad de las proteínas a estudio.

Para concentrar dicha muestra proteica, se realizó una centrifugación, en tubos “Amicon Ultra Filter Units” a 5.000 rpm en una centrífuga refrigerada. Con el fin de evitar una congelación y descongelación de la muestra cada vez que se realiza un ensayo, esta se distribuyó en pequeñas alícuotas de unos 30 µL y se guardaron a -80°C.

d. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA: MÉTODO DE BRADFORD

Necesitamos conocer la concentración proteica de las muestras, y para ello se realizó la determinación mediante el Método de Bradford, siguiendo las instrucciones del KIT utilizado (Sigma, A0281). En primer lugar, se realiza una recta patrón representando distintas concentraciones de BSA (Seroalbumina bovina) frente a las Absorbancias medidas a una $\lambda=595\text{nm}$. A partir de esta recta, extrapolamos los resultados obtenidos de las absorbancias con nuestras muestras proteicas y los valores de concentración obtenidos fueron de: 1,2 µg/µL para Ssu72-GSTp y de 9,8 µg/µL para GSTp.

e. ELECTROFORESIS EN GEL DESNATURALIZANTE DE ACRILAMIDA: SDS_PAGE

Una vez preparados los geles de acrilamida, tal y como se describe en Materiales y Métodos, se procedió al montaje de los sistemas electroforéticos MiniProtean y se cargaron las muestras proteicas (alícuotas recogidas en distintas etapas del proceso de purificación) de Ssu72-GST y GST, tal y como se indica en la siguiente figura (Figura 7). La electroforesis se desarrolló durante unas 2 h y a un voltaje de 150 V.

Una vez ha concluido la electroforesis, se realiza la tinción de los geles, utilizando la solución de tinción “EZBlue Gel Staining Reagent” (Coomassie Brilliant Blue G-250) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave, y posterior lavado en agua destilada hasta

RESULTADOS

conseguir la resolución adecuada de las bandas. Finalmente, para su conservación, se plastificaron los geles con papel “celofán” y se depositaron durante 12 h en una estufa a 30°C.

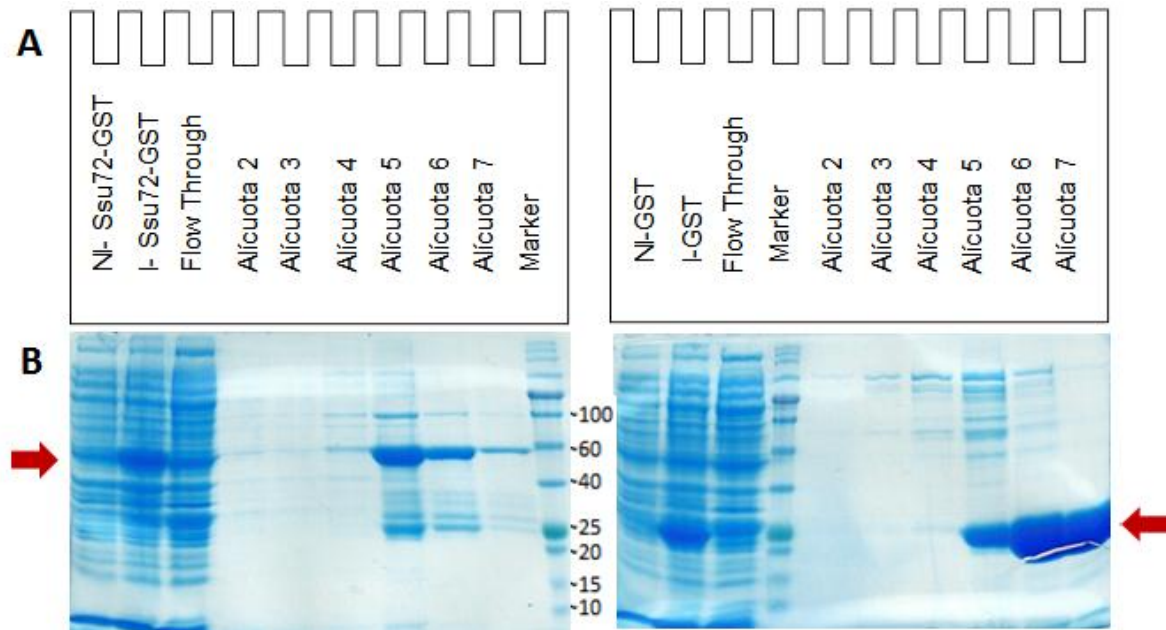


Figura 7: A) Orden de las muestras cargadas en los geles de electroforesis. B) Geles de Acrilamida teñidos con EZBlue Gel Staining Reagent. Muestras: NI: Cultivo celular No inducido; I: Cultivo celular Inducido con IPTG; Flow Through: recogido durante el primer lavado de la columna; Alícuotas: recogidas después de aplicar el buffer de elución; Marker (KDa).

En la Figura (Figura 7) se puede comprobar en ambos geles, como al comparar los 2 primeros carriles correspondientes a la muestra “NI” (cultivo celular antes de la adición de IPTG) con respecto a la muestra “I” (cultivo celular después de la adición de IPTG), que el proceso de inducción ha tenido lugar con éxito, ya que se observa una banda más intensa en el segundo carril a la altura del tamaño correspondiente a la proteína de fusión en cada caso.

Por otro lado, y en relación con las alícuotas recogidas, después de añadir el Buffer de Elución, se puede observar como aparece en cada carril una única banda intensa correspondiente a cada una de las proteínas de fusión purificadas. También se pueden observar otras bandas más tenues, que en principio no deberían de interferir en la purificación proteica, y que podría ser debido a que se ha cargado un volumen y/o

RESULTADOS

concentración de muestra muy grande para el tamaño de columna utilizado. El proceso de purificación podría continuar con otros tipos de cromatografías hasta conseguir una única banda proteica, pero no estaba dentro de los objetivos de este trabajo.

Con esto podemos comprobar que realmente este sistema de cromatografía, con la resina Glutathione Sepharose™ 4B, está diseñada para la purificación en una única etapa de proteínas recombinantes derivadas de la Glutathione-S-transferase, incluyendo las proteínas de fusión a GST.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ScSsu72-GSTp

a. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

A partir de los geles de Acrilamida obtenidos se realizó una recta patrón representando los Log de PM (Pesos Moleculares) de las proteínas del Marcador utilizado frente a las movilidades relativas de cada una de las bandas proteicas. Así, una vez determinadas las movilidades correspondientes a las bandas de las proteínas a estudio y extrapolando dichos valores en la recta patrón se obtuvieron los siguientes valores de PM: 51.770 Da para Ssu72-GST y 26.000 Da para GST. Estos valores obtenidos se corresponden con los ya determinados previamente para dichas proteínas (Meinhart, A., *et al*, 2003).

De esta forma, con la electroforesis se ha podido comprobar que la purificación se ha realizado de manera adecuada, y además nos ha permitido determinar el valor de su PM como primera etapa en el proceso de la caracterización proteica.

b. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FOSFATASA

La proteína Ssu72 juega un papel importante en el inicio de la transcripción, y también está implicada en la terminación de la transcripción por la RNA Polimerasa II, entre otras funciones. Esta proteína tiene la habilidad de actuar como una tirosin-fosfatasa in vitro (Meinhart, A., *et al*, 2003), pero sin embargo tiene la habilidad de defosforilar la Ser-5P del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II.

RESULTADOS

La medida de la Actividad Fosfatasa se basa en medir la absorbancia a 405 nm del producto de la reacción p-nitrofenol de color amarillo producido por la acción de la fosfatasa sobre el sustrato pNPP (p-nitrofenilfosfato).

El primer paso fue la puesta a punto del ensayo variando los elementos de la mezcla de reacción standard que contenía: Buffer TRIS-HCl 100mM pH 6,5 + DTT 10mM, y en la que se usaron distintas concentraciones de la enzima purificada, y una concentración constante de 40 mM del sustrato pNPP, en un volumen final de 500 μ L. La mezcla de reacción se incubaba a 28°C durante 30 minutos, tras lo cual se detiene la reacción añadiendo 500 μ l de NaOH 2M. Y posteriormente se mide la absorbancia a 405nm. Así se decidió que la concentración optima de la enzima fosfatasa Ssu72 purificada en este trabajo era de 6 μ g.

Este mismo ensayo y en las mismas condiciones se realizó con la otra proteína GST también purificada en este trabajo, manteniendo la misma concentración 40 mM del sustrato pNPP y utilizando distintas concentraciones de la proteína. El objetivo era comprobar si la proteína GST fusionada a la fosfatasa Ssu72 tenía alguna influencia en la medida de la actividad fosfatasa. Los resultados obtenidos nos demostraron que dicha proteína GST no tenía ninguna actividad fosfatasa en todas las condiciones ensayadas.

El siguiente paso fue realizar el mismo ensayo manteniendo constante la concentración de la enzima y variando las concentraciones del sustrato pNPP ([S] = 20-300 mM, ver Tabla 6). Los valores de absorbancia obtenidos de 5 ensayos para cada una de las concentraciones de sustrato permitió calcular la media, y aplicando la ecuación de Lambert-Beer se pudo determinar los valores iniciales de la velocidad de la reacción (V_0) para cada valor, tal y como se muestra en la Tabla 6.

TUBO	[S] mM	Vol (mL)	OD ^{405nm}	Vol x OD	$\epsilon \times \text{Time}$ (mL/nmolxcmXmin)	V_0 nmol/min	$1/V_0$ (min/nmol)	$1/[S]$ (mM ⁻¹)
1	20	1	1,00275	1,00275	$5,4 \times 10^{-1}$	1,8569	0,5385	0,05
2	40	1	1,62675	1,62675	$5,4 \times 10^{-1}$	3,0125	0,3319	0,025
3	60	1	2,39525	2,39525	$5,4 \times 10^{-1}$	4,4356	0,2254	0,016666667
4	100	1	3,45	3,45	$5,4 \times 10^{-1}$	6,3889	0,1565	0,01
5	150	1	4	4	$5,4 \times 10^{-1}$	7,4074	0,135	0,006666667
6	200	1	4,57	4,57	$5,4 \times 10^{-1}$	8,4629	0,1182	0,005
7	300	1	5,69	5,69	$5,4 \times 10^{-1}$	10,537	0,0949	0,003333333

Tabla 6. Cálculos de la medida de la actividad enzimática

RESULTADOS

En bioquímica, el diagrama de Lineweaver-Burk se emplea como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima. La representación gráfica de Lineweaver-Burk permite identificar: el punto de corte con el eje de ordenadas, que es el equivalente a la inversa de V_{max} , y, el de abscisas es el valor de $-1/K_m$.

Con los datos de los inversos de las V_0 y los inversos de las $[S]$ se obtiene la recta de regresión que se observa en la Gráfico 1, a partir de la cual se determinaron los valores cinéticos de la enzima purificada.

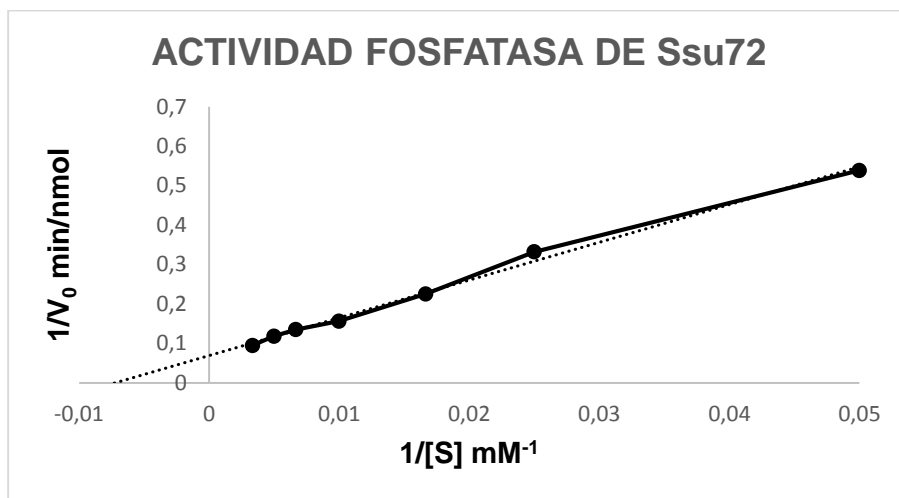


Gráfico 1. Actividad fosfatasa de Ssu72

A partir de la recta de regresión obtenida de los datos experimentales se han determinado los siguientes valores cinéticos de la enzima fosfatasa Ssu72 purificada en este trabajo que han sido los siguientes: $K_m = 138,24 \text{ mM}$ y $V_{max} = 14,45$.

CONCLUSIONES

El trabajo principal consistente en la purificación y caracterización de la proteína fusión ScSsu72 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* nos permite concluir:

1. El sistema de purificación de la proteína recombinante mediante el uso del sistema fusionado a GST, nos ha permitido comprobar que realmente se produce la inducción con IPTG y, también se obtiene una buena purificación mediante el sistema cromatográfico de afinidad Glutathione Sepharose utilizado, tal y como se observa en los geles de electroforesis.
2. La determinación de los Pesos Moleculares de las proteínas a partir del gel de electroforesis de acrilamida fue de 26.000 Da para GSTp y 51.770 Da para ScSsu72-GSTp, valores iguales a los ya publicados para ambas proteínas.
3. La medida de actividad enzimática nos permite comprobar que la proteína ScSsu72-GST mantiene su estructura y función como fosfatasa, al transformar el sustrato pNPP, y cuyas constantes cinéticas han sido de $K_m=138,24$ mM y una $V_{m\acute{a}x}=14,45$.

ABREVIATURAS

AP: Persulfato amónico

BSA: Seroalbumina bovina

CA: Columnas cromatográficas de afinidad

CB: Buffer de la columna/ Column Buffer/ Binding Buffer

CTD: Dominio carboxilo terminal

Da: Dalton

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidad óptica

DTT: Dithiothreitol

EB: Buffer de elución/ Elution Buffer

EC: Extracto celular

ϵ : Coeficiente de extinción molar

FP: Forward primer

GSH: Glutati3n reducido

GST: Glutati3n-S-transferasa

I: Cultivo celular inducido con IPTG

IPTG: Isopropyl β -D thiogalactosido

Km: Constante de Michaelis

LB: Medio Luria-Bertani

LBA: Medio Luria-Bertani con ampicilina

MBP: Proteína de uni3n a maltosa

MSC: Sitio de m3ltiple clonaje

NI: Cultivo celular no inducido con IPTG

PBS: Phosphate Buffer Saline

PCR: Reacci3n en cadena de la polimerasa

PM: Peso molecular

pNPP: p-nitrofenil-fosfato

ABREVIATURAS

RNA: Ácido ribonucleico

RP: Reverse primer

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate Blyarrylamide

V_{máx}: Velocidad máxima de la reacción

BIBLIOGRAFÍA

- Amersham Biosciences. (1994). Amersham Biosciences 18-1157-58. GST Gene Fusion System Handbook.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2000). Current protocols in molecular biology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Volumen 1-2-3.
- Bradford MM (1976). Anal Biochem. 72: 248-254. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
- GE Healthcare. (2008). General Electric Company 52-2330-00 AK 10. Glutathione Sepharose 4B.
- Meinhart, A., Silberzahn, T. and Cramer, P. (2003). Biochemical Journal Immediate Publication. 278: 15917–15921. The mRNA transcription/processing factor Ssu72 is a potential tyrosine phosphatase.
- Rodríguez-Torres, A.M., Lamas-Maceiras, M., García-Díaz, R. and Freire-Picos, M.A. (2013). FEBS Letters 587: 2617–2622. Structurally conserved and functionally divergent yeast Ssu72 Phosphatases.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988). *Gene* 67(1): 31-40. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.
- Stanford University. SGD Saccharomyces Genome Database. Fecha de revision: 2014. Fecha de consulta: 08/07/2014. Disponible en <http://www.yeastgenome.org/>
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Biochemical Journal Immediate Publication 189(1):113-30. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, Y., Zhang, M. and Zhang Y. (2011). Biochemical Journal Immediate Publication 434: 435-444. Crystal Structure of Ssu72, an essential eukaryotic phosphatase specific for the C-terminal domain of R_A polymerase II, in complex with a transition state analogue.