

Clonación y expresión de una proteína de unión a quitina de *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T.

Clonación e expresión dunha proteína de unión a quitina de *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T

Cloning and expression of a chitin-binding protein of *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T

Paula Baltasar Moa

Trabajo Fin de Máster

Julio 2015



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña

Realizado en el Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud
de la Universidad de Vigo.

**Clonación y expresión de una proteína de unión a quitina de
Pseudoalteromonas tunicata CCUG 44952T.**

**Clonación e expresión dunha proteína de unión a quitina de
Pseudoalteromonas tunicata CCUG 44952T.**

**Cloning and expression of a chitin-binding protein of
Pseudoalteromonas tunicata CCUG 44952T.**

Trabajo Fin de Máster de Paula Baltasar Moa

La Dra. Carmen Sieiro Vázquez y Doña Belén García Fraga como tutoras de
este trabajo, autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador

Vigo, Julio de 2015

Carmen Sieiro Vázquez

Belén García Fraga

Agradecimientos

La verdad es que nunca me habría esperado que detrás de un TFM hubiera tanta gente a la que agradecerle tantas cosas, lo cierto es que se me hace un poco difícil empezar.

En primer lugar me gustaría agradecer a toda mi familia por su apoyo, su cariño y su paciencia, especialmente por las interminables charlas acerca de proteínas recombinantes que han tenido que soportar los últimos meses, a este paso van a saber aún más que yo misma del tema. En este apartado me gustaría dedicarle una mención especial a mi madre, la persona que me ha ayudado en todo momento de mi vida y sigue haciéndolo. Muchas gracias, eres la mejor.

A continuación, y como no podía ser de otra manera agradecer a esas personas que no son familia de sangre, pero como si lo fueran. Ellos ya saben quiénes son. Porque ellos me han ayudado en todo momento (especialmente con los innumerables problemas informáticos que me ha brindado mi gran suerte con la tecnología). Porque para nosotr@s estos meses van a ser inolvidables.

Ahora y refiriéndome a un ámbito más académico me gustaría dar las gracias a la Dra. Carmen Sieiro, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por su orientación, por sus consejos, su paciencia y por tener siempre una actitud optimista cuando las cosas no salían como se esperaban.

A mi otra tutora y gran apoyo en el laboratorio, Belén García, por todo lo que me ha ayudado a lo largo de estos meses. Por estar siempre dispuesta a echarme una mano pese a la gran cantidad de trabajo que tenía. Este trabajo no habría sido posible sin ella. Simplemente gracias y muchísima suerte con la tesis.

A Manuel Becerra, por su inestimable ayuda con todas las dudas que me fueron surgiendo, tanto del TFM como del resto del máster, no podía imaginar un coordinador más atento.

A todo ese pedazo de Portugal que llevo en mi corazón, por todas las técnicas de laboratorio que me han enseñado, por su afecto y por haberme adoptado durante los meses que viví allí.

A todos mis compañeros del laboratorio de Carmen Sieiro en la Universidad de Vigo, gracias por vuestra ayuda.

Y por último, pero en absoluto menos importante quiero darle las gracias a Rubén, esa persona que siempre ha estado a mi lado en los buenos y malos momentos. Esa persona que se ha pasado horas conmigo en el laboratorio y fuera de él y esa persona que hace que cualquier día se convierta en toda una aventura a su lado. Gracias por todo.

ABREVIATURAS

%	Tanto por ciento
°C	Grado centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro
Blast	Basic Local Alignment Tool
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etildiamino tetraacético
EMBL_EBI	European Bioinformatics Institute
g	Gramo
h	Hora
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
Kb	Kilobase
L	Litro
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino) propanosulfónico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Persulfato amónico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	Tetrametiletildiamina
Tris	Hidroximetil-aminometano
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen
xg	Unidades de gravedad

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La quitina.	1
1.2 Las quitinasas.	2
1.3 Proteínas de unión a quitina (CBP).....	3
1.4 <i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1 Microorganismos y plásmido empleados.	7
3.2 Cultivo y mantenimiento de cepas.	8
3.3 Obtención de ácidos nucleicos.....	8
3.3.1 Extracción y purificación de DNA cromosómico.	8
3.3.2 Extracción y purificación de DNA plasmídico a partir de <i>E. coli</i>	9
3.4 Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos.	10
3.5 Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción	11
3.6 Diseño de cebadores y amplificación de DNA por PCR.	11
3.7 Reacciones de clonación/transformación de <i>Escherichia coli</i>	12
3.8 Secuenciación y análisis de ácidos nucleicos y proteínas.....	14
3.9 Expresión del inserto clonado.	14
3.10 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE).	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1 Aislamiento y clonación de un gen que codifica una proteína de unión a quitina de <i>Pseudoalteromonas tunicata</i> CCUG 44952T.	16
4.2 Secuenciación del DNA clonado. Análisis de la secuencia.	21
4.3 Expresión del producto del gen <i>Ptcbm</i> de <i>P. tunicata</i> en <i>E. coli</i>	25
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA:	30

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas ha puesto de manifiesto la importancia de los océanos, estos son una inmensa e inexplorada fuente de muchas sustancias bioactivas. Estas sustancias son producidas por un amplio rango de microorganismos entre los que están las bacterias, hongos, fitoplancton... (León *et al.*, 2010).

La mayor parte de las bacterias marinas productoras de sustancias bioactivas son especies de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, (León *et al.*, 2010) y también *Pseudoalteromonas* (Holmström *et al.*, 2002).

1.1 La quitina.

La quitina es un polímero lineal y complejo con enlaces covalentes β -1,4 glucosídicos de N-acetilglucosamina (Figura 1) y es el más abundante en la Naturaleza por detrás de la celulosa y del almidón (Sastoque, 2005; Hamid *et al.*, 2013).

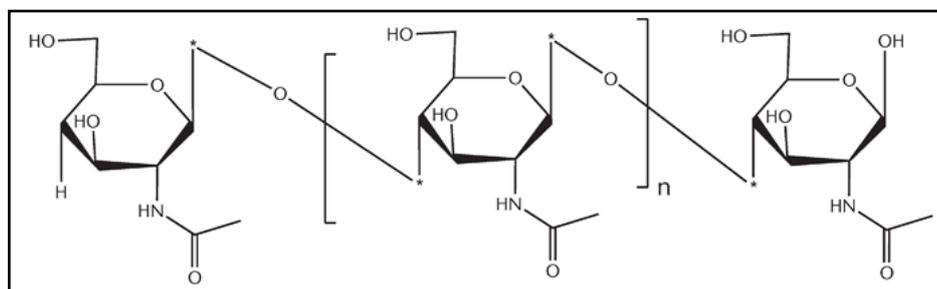


Figura 1: Estructura de la quitina (Martínez *et al.*, 2014).

Cada año se producen más de mil millones de toneladas de quitina en la biosfera, principalmente gracias a insectos, crustáceos, hongos y otros organismos marinos (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005).

Aunque se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza es más abundante en el medio marino, donde se encuentra de forma ubicua. No obstante, no se observa acumulación de quitina en los sedimentos marinos debido al eficiente proceso de bioconversión llevado a cabo por microorganismos quitinolíticos (Dahiya *et al.*, 2006).

La mayor parte de la quitina se encuentra con función estructural en conchas de crustáceos, exoesqueletos de insectos y nematodos y en las paredes celulares de muchos

Introducción

hongos, en los que aparece unida a glucanos (Adrangi y Faramarzi, 2013; Yang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015).

Estructuralmente podemos distinguir dos tipos de quitina, α y β . La α -quitina, formada por cadenas antiparalelas, es la forma más abundante de quitina (Manjeet *et al.*, 2013). Es la más rígida y tiene funciones esqueléticas. Por su parte, la β -quitina está formada por cadenas paralelas y desarrolla propiedades mecánicas similares a las del cartílago (Sastoque, 2005; Dahiya *et al.*, 2006).

1.2 Las quitinasas.

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas glicosil hidrolasas que son capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos β -1,4 del polisacárido quitina, dando lugar a oligómeros y/o monómeros estructurales, los cuales pueden tener aplicaciones para la industria, la agricultura, etc. (Hamid *et al.*, 2013). De acuerdo con la base de datos CAZy (Cantarel *et al.*, 2009), las quitinasas se incluyen en las familias 18 y 19 de las glicosil hidrolasas, dependiendo de la secuencia de aminoácidos de su módulo catalítico (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005; Ubhayasekera *et al.*, 2011). Estas enzimas se pueden clasificar en función del lugar en el que ejercen su actividad dentro de la quitina. De esta manera, se distinguen por un lado las endoquitinasas, que rompen la quitina al azar en sitios internos generando multímeros de GlcNAc solubles y de bajo peso molecular y por el otro las exoquitinasas, que pueden romper la quitina en el extremo reductor o en el no reductor (Dahiya *et al.*, 2006; Songsiriritthigul *et al.*, 2010).

El tamaño de las quitinasas puede oscilar dependiendo del organismo en el que se produzcan, pero están comprendidas entre 20-90 kDa (Bhattacharya *et al.*, 2007). Estas enzimas se producen en un amplio rango de organismos (Dahiya *et al.*, 2006). En general las quitinasas de la familia 18 se encuentran en bacterias, hongos, virus, animales y en plantas, mientras que las quitinasas de la familia 19 se encuentran mayoritariamente en plantas y nematodos y sólo raramente en bacterias (Watanabe *et al.*, 1999; García-Fraga *et al.*, 2015).

Las quitinasas microbianas son capaces de hidrolizar la quitina presente en la pared celular de hongos superiores, insectos, nematodos... (Naosekpam *et al.*, 2006). Además, pueden actuar sinérgicamente con proteínas de unión a quitina (CBP), moléculas que contienen un dominio de unión a carbohidrato (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

En los últimos años las quitinasas están adquiriendo un gran interés desde el punto de vista biotecnológico debido a sus múltiples aplicaciones potenciales. Particularmente en agricultura, las quitinasas juegan un papel importante en el control de plagas debido a su actividad de lisar las paredes celulares de los hongos, compuestos mayoritariamente por quitina (Bhattacharya *et al.*, 2007; Swiontek *et al.*, 2014).

Otras utilidades de las quitinasas son como nematocidas. En los últimos años los tratamientos anti-nematodos se han basado en compuestos químicos que han ocasionado contaminaciones ambientales, además de generar resistencia entre los nematodos a estos agentes químicos (Larsen, 2000). Por lo tanto, se han propuesto agentes biológicos para atajar este problema, tales como los hongos nematófagos y bacterias (Yang *et al.*, 2013). Las quitinasas aisladas de estos hongos juegan un papel muy importante en la infección de los nematodos, con lo que, bien aisladas de estos hongos o de otros microorganismos, podrían tener un gran potencial como agentes de control (Yang *et al.*, 2013).

1.3 Proteínas de unión a quitina (CBP).

Son un grupo de moléculas que presentan afinidad por la quitina y fueron aisladas de diferentes fuentes, entre ellas bacterias, aunque también se han encontrado en plantas, donde se especula que tengan funciones de defensa, tanto contra hongos como contra insectos (Raikhel *et al.*, 1993; Selitrennikoff, 2001).

Los dominios de proteínas responsables de la unión a carbohidratos son clasificados en dominios de unión a carbohidrato o chitin binding modules (CBMs) diferentes según la similitud de su secuencia. Los CBMs, además de poder encontrarse formando parte de la estructura de las quitinasas, sirviendo de ayuda en la unión a la quitina insoluble y aumentando el acceso al sustrato, pueden tener autonomía propia formando por sí mismos proteínas de unión a quitina individuales (Manjeet *et al.*, 2013). Estas CBPs se encuentran en las familias 14, 18 y AA10 (antiguamente CBM33) (Cantarel *et al.*, 2009). Mientras que las CBPs de las familias 14 y 18 se han encontrado principalmente en insectos, hongos y levaduras, las de la familia AA10 se han encontrado mayoritariamente en bacterias y virus (Manjeet *et al.*, 2013).

Las CBPs bacterianas contienen CBMs de la familia AA10 y de la familia 5/12. Se cree que los cambios estructurales que producen los CBMs, especialmente los de la familia

Introducción

AA10, facilitan el acceso a las matrices de quitina cristalina gracias a la introducción de mellas en las cadenas de quitina (Frederiksen *et al.*, 2013).

Las CBPs aisladas de diversas fuentes (bacterias, plantas, hongos, crustáceos, etc.) han demostrado, además, tener efectos antifúngicos frente a hongos patógenos (Mehmood *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2014). Los hongos son organismos eucariotas, la mayoría de los cuales presenta quitina en su pared celular. Las paredes celulares de los hongos contienen entre un 80-90% de polisacáridos, el resto de componentes consisten mayoritariamente en proteínas y lípidos. El mecanismo de esta actividad antifúngica no se conoce aunque se cree que las CBPs se unen a la β -quitina presente en la pared celular de los hongos y puede dificultar la biosíntesis de quitina durante la división celular (Mehmood *et al.*, 2011). Por lo tanto, entre las funciones de las CBPs destaca también su efecto fungicida.

Aunque inicialmente se creía que las CBPs no tenían actividad catalítica, estudios recientes han mostrado que las CBPs de *Serratia marcescens* (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010) y de *Enterococcus faecalis* (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012), que presentan dominios AA10, pueden actuar como enzimas mediante la rotura oxidativa de la quitina (Frederiksen *et al.*, 2013).

Por otro lado, los dominios de unión a quitina de las familias CBM5/12 y CBM2 se consideran módulos accesorios no catalíticos que pueden acompañar al dominio catalítico de las quitinasas o también al módulo AA10 de las CBPs. Ambos dominios resultaron aumentar la afinidad por el sustrato y la eficiencia catalítica de las quitinasas (Frederiksen *et al.*, 2013).

Aunque su nomenclatura denota que tengan uno o varios dominios de unión a quitina es destacable que la afinidad de estas proteínas no se limita únicamente a la quitina, ya que puede presentar afinidad por estructuras que contengan N-acetilglucosamina o ácido N-acetil-D-neuramínico (Raikhel *et al.*, 1993). Estudios recientes sugieren que algunas quitinasas y CBPs sirven adicionalmente como factores de virulencia de patógenos bacterianos durante la infección, como en el caso de la CBP de *Vibrio cholerae*. En estos casos la principal diana de las quitinasas y las CBPs son glicoproteínas y glicolípidos que contienen N-acetilglucosamina (Kirn *et al.*, 2005; Frederiksen *et al.*, 2013).

Si bien dentro del mundo microbiano se han estudiado CBPs de las familias CBM14, CBM18 y AA10, las cuales pueden ir acompañadas de módulos CBM5/12 o

CBM2, hasta ahora no conocemos ningún estudio de CBPs que contengan únicamente dominios CBM5/12. En este trabajo se presenta el estudio preliminar de una CBP con módulos CBM5/12 producida por la bacteria marina *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T.

1.4 *Pseudoalteromonas tunicata*.

Las bacterias marinas del género *Pseudoalteromonas* forman biofilms, ya que producen una gran cantidad de compuestos que les ayudan en la colonización de superficies, además de producir sustancias inhibitoras para otros microorganismos, con lo que se ha convertido en la especie modelo para el estudio de los procesos de colonización (Holmström y Kjelleberg, 1999; Torsten *et al.*, 2008). En la Figura 2 se muestran bacterias del género *Pseudoalteromonas*.

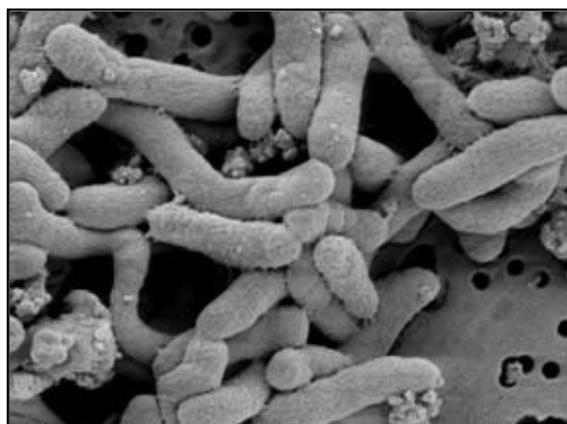


Figura 2: Bacterias del género *Pseudoalteromonas* vistas con microscopía electrónica de barrido (Carpenter, 2002).

El genoma de distintas cepas de *Pseudoalteromonas* ya ha sido total o parcialmente secuenciado (Holmström y Kjelleberg, 1999). Concretamente, la cepa D2 de *P. tunicata* está secuenciada y, debido a las razones expuestas, su exploración puede ser de gran interés para identificar nuevos compuestos bioactivos, entre ellos nuevas quitinasas o CBPs.

Pseudoalteromonas tunicata debe su nombre a que se aisló del tunicado marino *Ciona intestinalis*. Es un microorganismo gram negativo, móvil, que crece a 30 °C y aerobio. Puede crecer sobre agar marino o agar sangre (Holmström *et al.*, 1998).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Tal como se ha expuesto en la introducción, las CBPs son proteínas de interés ya que se ha demostrado que pueden favorecer la actividad y eficiencia de las enzimas quitinolíticas y, además, funcionar como antifúngicos. A pesar de ello, son proteínas todavía, relativamente poco estudiadas. El trabajo que se presenta en esta memoria se encuadra en un estudio más amplio encaminado a buscar nuevas CBPs cuyo estudio pueda tener interés desde el punto de vista de la acumulación de conocimiento básico y, si es posible, aplicado. De acuerdo con ello, el objetivo general de este trabajo, que se presenta para la obtención del Título de Máster en Biotecnología Avanzada, es la caracterización de una CBP de la bacteria quitinolítica *Pseudoalteromonas tunicata*. De forma particular, los objetivos concretos que se proponen para el presente estudio son:

1. La identificación, clonación, secuenciación y estudio de un gen de la bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas tunicata*, cepa CCUG 44952T, que codifique una nueva proteína de unión a quitina (CBP).
2. La expresión heteróloga del nuevo gen en *Escherichia coli*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos y plásmido empleados.

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron:

- *Pseudoalteromonas tunicata* 44952T perteneciente a la Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg (CCUG).
- *Escherichia coli* HI-Control™ 10G Chemically Competent Cells de Lucigen® Corporation. Genotipo: *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *endA1 recA1* φ80*dlacZ*ΔM15 Δ*lacX74 araD139* Δ(*ara,leu*)7697 *galU galK rpsL nupG λ tonA* /Mini-F *lacI^{q1}* (Gent^R).
- *E.coli* HI-Control™ BL21 (DE3) de Lucigen® Corporation. Genotipo: F⁻ *omp T hsdSB (rB- mB-)* *gal dcm* (DE3)/Mini-F *lacI^{q1}* (Gent^R).

El plásmido utilizado para la clonación y expresión de los genes aislados fue:

- pETite C-His, de Lucigen® Corporation (ver Figura 3).

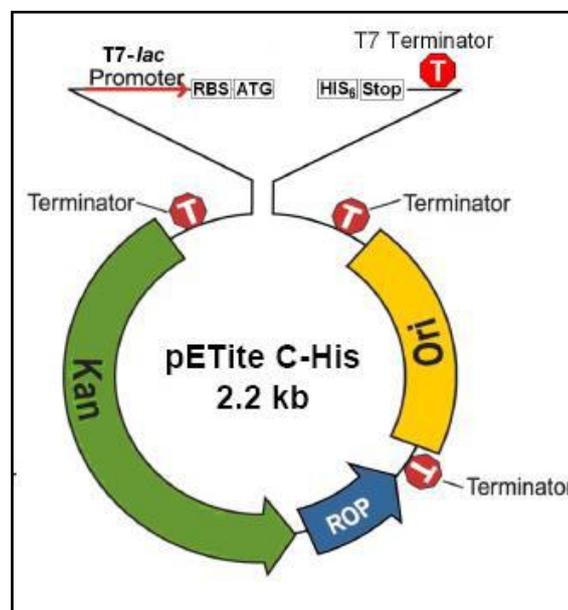


Figura 3: Plásmido pETite C-His, donde se muestra, en verde, el gen de resistencia a kanamicina.

Material y métodos

3.2 Cultivo y mantenimiento de cepas.

Para el cultivo de la cepa de *P. tunicata* se han empleado los medios Caldo Marino y Agar Marino, de Panreac. Su incubación se realizó a 30 °C y agitación a 180 rpm cuando fue preciso.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio LB (Luria-Bertani) (triptona al 1%; extracto de levadura al 0,5%; NaCl al 1%). Para preparar el medio sólido se añadió, además, agar bacteriológico de Panreac al 1,5%. Cuando fue necesario, el medio LB se suplementó con kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL. La kanamicina se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,22 µm previamente a su adición al medio LB ya esterilizado, cuando no estuviera demasiado caliente para evitar la inactivación por calor del antibiótico. Su temperatura de incubación fue de 37 °C y, cuando fue necesario, con agitación elevada, situándose entre 160 y 300 rpm.

En las transformaciones se usó Medio de Recuperación (Lucigen), suministrado por la casa comercial sin detallar la composición, pero asegurando que posee una eficiencia 10 veces superior a la del SOC (20 g/L triptona; 5 g/L extracto de levadura; 4,8 g/L MgSO₄; 3,603 g/L dextrosa; 0,5g/L NaCl; 0,186 g/L KCl).

Todos los medios excepto el Medio de Recuperación, porque ya venía preparado para su uso, se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1,1 atm de presión durante 15 min.

Para la conservación de las cepas microbiológicas se mezclaron 500 µL del cultivo celular de interés con 500 µL de glicerol previamente esterilizado en autoclave en las mismas condiciones que el resto de los medios. La muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

3.3 Obtención de ácidos nucleicos.

3.3.1 Extracción y purificación de DNA cromosómico.

La extracción del DNA cromosómico de *P. tunicata* CCUG 44952T, se realizó siguiendo el protocolo para bacterias gram negativas del kit DNA Purification Wizard[®] Genomic de Promega. Para ello se dejó crecer toda la noche un cultivo de *P. tunicata* en medio Caldo Marino, se centrifugó 1 mL de dicho cultivo a 18000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. A continuación, se adicionaron 600 µL de Solución de Lisis, se pipeteó para una óptima mezcla de las células con la solución y se incubaron a 80 °C

durante 5 min para la lisis celular. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 3 μL de Solución de RNasa (4 mg/mL) y se agitó con el vórtex. Se incubó a 37 °C durante 30 min y, al igual que en la incubación anterior, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Para el paso siguiente, se añadieron 200 μL de Solución de Precipitación de Proteínas, se agitó vigorosamente con la ayuda de un vórtex durante 20 s y se incubó en hielo durante 5 min. La mezcla se centrifugó a 18000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 mL con 600 μL de isopropanol, para precipitar el DNA, y se agitó con el vórtex. Se centrifugó de nuevo a 18000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se descartó, se añadieron 600 μL de etanol al 70% para lavar el sedimento donde se encontraba el precipitado DNA y se agitó en el vórtex. Se centrifugó a 18000 rpm durante 5 min, se descartó todo el sobrenadante y el precipitado se dejó secar con el vial abierto a temperatura ambiente. Por último se añadieron 50 μL de agua milliQ estéril para resuspender el DNA y se guardó a -20 °C.

3.3.2 Extracción y purificación de DNA plasmídico a partir de *E. coli*.

La extracción del DNA plasmídico a partir de células de *E. coli* HI-Control™ 10G se realizó mediante el kit comercial de extracción Hispeed Plasmid Midi Kit de Qiagen en columnas Qiagen-tip100 y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este protocolo está diseñado para purificar más de 100 μg de DNA plasmídico multicopia a partir de cultivos de 25 mL de *E. coli* en LB suplementado con el antibiótico adecuado. Para recuperar las células se centrifugaron 25 mL de cultivo a 6000 xg durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 4 mL de Buffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) con RNasaA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se resuspendieron las células por agitación y pipeteo. A continuación, se añadieron 4 mL de Buffer P2 (200 mM NaOH; 1% SDS), se invirtió el tubo 5 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente, se añadieron 4 mL de Buffer P3 (3 M acetato potásico, pH 5,5), se agitó invirtiendo el tubo 5 veces y se incubó 15 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 20000 xg durante 15 min a 4 °C y se separó el sobrenadante del precipitado. La columna Qiagen-tip 100 se equilibró con 4 mL del Buffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol; 0,15% Triton® X-100) y se esperó a que pasase a través de la columna por gravedad. El sobrenadante obtenido previamente se pasó por la columna Qiagen-tip 100 y se esperó a que pasase a través de la columna por gravedad. A continuación, se hicieron 2 lavados con 10 mL de Buffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol) y

Material y métodos

nuevamente se esperó a que pasase a través de la columna por gravedad. El DNA plasmídico se eluyó con 5 mL del Buffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15% isopropanol). Posteriormente, se precipitó el DNA con 3,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente, tras ello las muestras se centrifugaron a 15000 xg durante 30 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 2 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 15000 xg durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Finalmente el precipitado se dejó secar al aire hasta la evaporación total del etanol y se redisolvió en 100 µL de agua milliQ. El DNA se guardó a -20 °C.

3.4 Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos.

En todos los casos los ácidos nucleicos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa según el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989). La calidad y la especificidad de los productos de PCR se verificó en geles de agarosa al 1% preparados usando el tampón TAE (0,04 M Tris-acetato y 0,002 M EDTA) y teñidos con Simply Safe™ de EUR_x.

Las muestras se prepararon mezclando en una proporción 1:5 (v/v) el tampón de carga (10 mM Tris; 0,03% azul de bromofenol; 60% glicerol; 60 mM EDTA, pH 7,6) con la muestra de DNA. Dependiendo del tamaño de los ácidos nucleicos a visualizar se emplearon dos marcadores de peso molecular, que son patrones comerciales de tamaño conocido: 1 kb DNA Ladder ready-to-use y 100 bp plus DNA Ladder ready-to-use, ambos de Bioron.

Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta horizontal Bio-Rad durante 60 min a 90 V. El DNA se visualizó utilizando el transiluminador Gel Doc™ EZ Imager y el software ImageLab, ambos de Bio-Rad, con la opción de geles de agarosa para la observación y obtención de la imagen.

La cuantificación de la concentración de DNA se realizó en geles de agarosa al 1% comparando la intensidad del DNA de las muestras objeto de estudio con un patrón de DNA de concentración conocida. Se utilizaron los marcadores 1 kb DNA Ladder ready-to-use y 100 bp plus DNA Ladder ready-to-use, ambos de Bio-Rad con este propósito, sabiendo que su concentración es de 0,1 mg/mL. La cantidad de DNA presente en la muestra se estimó utilizando el programa informático ImageLab™ Software de Bio-Rad.

Material y métodos

Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua milliQ estéril a una concentración final de 0,1 µg/µL.

La mezcla de reacción (50 µL) contenía: 3 µL de DNA molde (25 ng/µL), 5 µL de cada cebador (0,1 µg/µL), 4 µL de cada dNTP (2,5 mM), 10 µL de tampón iProof™ HF 5X de Bio-Rad, 1 µL de DNA polimerasa iProof™ High fidelity DNA polimerase (2 U/µL) de Bio-Rad. La PCR se llevó a cabo en un termociclador My Cyclor™ Thermal Cyclor de Bio-Rad.

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 98 °C durante 1 min; 25 ciclos de 98 °C durante 10 s, 55 °C durante 15 s, y 72 °C durante 30 s; 1 ciclo de 72 °C durante 10 min.

También se realizaron PCR para comprobar el éxito de la clonación, donde la principal diferencia fue que no se usó una polimerasa de alta fidelidad. La mezcla de reacción (50 µL) contenía: 5 µL de DNA plasmídico (3,5 ng/ µL para el gen completo y 4,4 ng/µL para la muestra sin péptido señal), 1 µL de cada cebador (0,1 µg/µL), 2 µL de cada dNTP (2,5 mM), 5 µL de KAPA Taq Buffer A 10X, (conteniendo 1,5 mM de MgCl₂ a 1X), 0,5 µL de Kapa Taq de Kapa Biosystems (5 U/µL).

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94 °C durante 2 min; 25 ciclos de 94 °C durante 15 s, 55 °C durante 15 s, y 72 °C durante 1 min; 1 ciclo de 72 °C durante 10 min.

3.7 Reacciones de clonación/transformación de *Escherichia coli*.

El sistema Expresso™ T7 presenta una estrategia de clonación sin tratamiento enzimático y sin necesidad de ligación que le permite llevar a cabo una recombinación eficiente. Por esta razón, los fragmentos de DNA de *P. tunicata* se mezclaron con el plásmido pETite C-His de Lucigen, diseñado para la clonación direccional de fragmentos de DNA, y, al mismo tiempo, con las células competentes *E. coli* HI-Control™ 10G de Lucigen.

La mezcla de reacción consistió en un vial de células competentes *E. coli* HI-Control™ 10G, tal y como indica el fabricante, 2 µL del vector pETite C-His de Lucigen

(12,5 ng/ μ L) y 3 μ L del DNA (12,58 ng/ μ L) para la muestra del gen completo y (17,32 ng/ μ L) para la muestra sin péptido señal.

Para maximizar la eficiencia de la transformación se usaron tubos de 10 mL preenfriados en hielo, y además las células competentes y el vector fueron descongelados en hielo. Tras la mezcla, el tubo se agitó suavemente con el fin de no introducir burbujas ni calentar las células. La mezcla se incubó 30 min en hielo y fue sometida a un shock térmico a 42 °C durante 45 s. Inmediatamente después, el tubo se enfrió de nuevo en hielo y, a continuación, se añadieron 960 μ L de Medio de Recuperación para las células y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 1 h.

Para la selección de las células que incorporaron el plásmido, o lo que es lo mismo, de células transformadas de *E. coli* se utilizó el medio LB suplementado con el antibiótico kanamicina en las condiciones descritas en el apartado 3.2 de material y métodos.

De las colonias crecidas en medio LB con kanamicina se seleccionaron cinco de cada transformación (con el gen completo y con el gen sin péptido señal), las cuales se cultivaron también en medio LB pero, en este caso, líquido y manteniendo la presión selectiva. A partir de estos cultivos se realizó la extracción de DNA plasmídico como se indica en el apartado 3.3.2.

La transformación de la cepa de expresión HI-ControlTMBL21 (DE3) de *E. coli* (Lucigen) se realizó mezclando un vial de células competentes, tal y como indica el fabricante, con 1 μ L de los DNA plasmídicos (10 ng/ μ L) obtenidos. A continuación, se agitó suavemente con el fin de no introducir burbujas ni calentar las células. Para maximizar la eficiencia de la transformación se usaron tubos de 10 mL preenfriados en hielo y, además, las células competentes y el vector fueron descongelados en el hielo. La mezcla se incubó 30 min en hielo y fue sometida a un shock térmico a 42 °C durante 45 s. Inmediatamente, el tubo se enfrió de nuevo en hielo. A continuación, se añadieron 960 μ L de medio de recuperación para las células y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 1 h.

El vector pETite C-His ha sido diseñado para facilitar la clonación de los genes de interés sin necesidad de tratamiento enzimático y para permitir la expresión inducible bajo el control del promotor del bacteriófago T7. La expresión de los genes de interés de esta manera requiere de niveles adecuados de RNA polimerasa T7, que serán proporcionados por la cepa hospedadora.

Material y métodos

Las células transformadas se sembraron en medio LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL), del cual se seleccionó una colonia resistente de cada transformación (a las que se les denominó BL21-Pt-CBM, a la que contenía el gen completo, y BL21-Pt-CBM-ps, a la que tenía el gen sin el péptido señal) para los ensayos de expresión de la proteína.

3.8 Secuenciación y análisis de ácidos nucleicos y proteínas.

Se extrajo y cuantificó el DNA de los plásmidos recombinantes seleccionados, tal como se indica en los apartados 3.3.2 y 3.4 de material y métodos y se secuenció el DNA de los insertos clonados. El DNA se secuenció con el método de Sanger *et al.* (1977), utilizando el servicio de secuenciación de Secugen S.L.

Las secuencias se analizaron con el programa Chromas Lite (Technelysium) y los alineamientos entre la secuencia obtenida y la secuencia teórica se hicieron con el programa informático ClustalW2.0.12 a través del EMBL_EBI. La comparación de secuencias se realizó con la aplicación Blast a través de la página web del NCBI.

Con ayuda del conversor de Expasy se obtuvo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos y se hizo una estimación aproximada del peso molecular esperado para la proteína. Para el alineamiento de proteínas se utilizó el programa ClustalW2.0.12 a través del EMBL_EBI.

3.9 Expresión del inserto clonado.

Los ensayos para la expresión a nivel intracelular de la proteína de unión a quitina codificada por el gen clonado se realizaron utilizando como hospedador la cepa *E. coli* HI-Control™ BL21 (DE3) de Lucigen® Corporation previamente transformada.

Se seleccionaron colonias aisladas de la cepa de expresión de *E. coli* recombinante y se cultivaron en 10 mL de medio LB con kanamicina a 37 °C y con una agitación de 250 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,663. A continuación, se adicionó el inductor IPTG a una concentración final de 1 mM y se prosiguió con la incubación en las condiciones anteriormente descritas. Una muestra de 250 µL de cada cultivo se recogió cada hora, durante 4 horas, se centrifugó a 10000 rpm durante 2 min y se guardó el sedimento a -20 °C.

3.10 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE).

Todas las electroforesis de proteínas en geles de acrilamida se realizaron con la técnica descrita por Laemmli (1970). Se empleó una cubeta de electroforesis Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell de Bio-Rad. Los geles se prepararon con un 10 % de acrilamida (Bio-Rad) y también se añadió 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; SDS al 10%; H₂O_d; TEMED (Amersham Biosciences) y PSA al 10%.

A las muestras obtenidas en el ensayo de expresión se le añadieron 5 µL de tampón Laemmli Sample Buffer de Bio-Rad (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2,1% SDS; 26,3% glicerol; 0,01% azul de bromofenol). Se prepararon en condiciones desnaturalizantes hirviéndolas previamente. En el gel, además de estas muestras, se cargó el marcador de peso molecular Broad Range de Bio-Rad.

Para la electroforesis se usó el tampón Tris-glicina (3 g/L Tris-base, 14,4 g/L Glicina, 1 g/L SDS) y el gel se sometió a una electroforesis durante 1 h a 200 V.

Pasado ese tiempo el gel se colocó en solución de tinción preparada comercialmente de BioSafe[™] Coomassie (Bio-Rad). Se dejaron teñir durante 1 h y se destiñeron con solución decolorante y fijadora compuesta por metanol al 40%, ácido acético al 10% y H₂O_d durante 90 min en agitación. Finalmente, se hicieron lavados con H₂O_d durante 1 h.

Los resultados se visualizaron con el mismo software que los geles de agarosa pero seleccionando la opción para geles de acrilamida (ver apartado 3.4 de material y métodos).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y clonación de un gen que codifica una proteína de unión a quitina de *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T.

La cepa de *P. tunicata* CCUG 44952T presenta la capacidad de degradar quitina. En estudios previos, se ha expresado, caracterizado y determinado la actividad antifúngica de una quitinasa, de la familia 19 de las glicosil hidrolasas, de este microorganismo marino (García-Fraga *et al.*, 2015).

Debido al papel que se le ha atribuido a algunas proteínas de unión a quitina y que ha sido expuesto en la introducción, se analizó el genoma secuenciado de otra cepa de *P. tunicata*, la cepa D2, en el cual se habían identificado varias posibles quitinasas tanto de la familia 18 como de la 19, con objeto de buscar secuencias que puedan codificar nuevas proteínas de unión a quitina. Dicho análisis puso de manifiesto dos posibles proteínas de unión a quitina. Se decidió estudiar una pauta abierta de lectura que posiblemente codificaba para una proteína de unión a quitina no caracterizada (referencia de acceso NCBI: EAR27334.1) en *P. tunicata*.

El primer paso de este estudio consistió en tratar de aislar esa secuencia en la cepa de *P. tunicata* CCUG 44952T y clonarla. El análisis de la secuencia de la proteína, mediante el uso del programa Signal P 4.0 (Bendtsen *et al.*, 2004), puso de manifiesto que, probablemente, los primeros 22 aminoácidos de la misma forman el péptido señal de la proteína. En base a esto, se diseñó una pareja de oligonucleótidos que flanquean la secuencia de nucleótidos completa y otra que excluye la secuencia que correspondería al péptido señal. De esta manera debería ser posible amplificar tanto el gen completo como el gen sin la secuencia correspondiente al péptido señal.

Se aisló el DNA cromosómico de la cepa CCUG 44952T de *P. tunicata* y se comprobó, mediante una electroforesis en gel de agarosa, que el DNA se había extraído de manera óptima al estar representado como una única banda de elevado peso molecular (Figura 4).

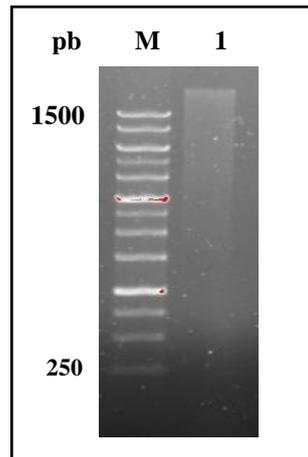


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa donde se aprecia el DNA cromosómico de la cepa CCUG 44952T de *Pseudoalteromonas tunicata*. M: marcador de peso molecular (1 Kb ladder) en pares de bases. Carril 1: DNA cromosómico de *P. tunicata* CCUG 44952T.

Este DNA se empleó como molde para tratar de amplificar el gen con y sin la secuencia del péptido señal (fragmentos de 870 y 801 pb). Los cebadores utilizados para ello fueron los oligonucleótidos descritos en el apartado 3.6 de material y métodos. Tras la PCR se observaron los productos amplificados en un gel de agarosa y se detectó, en ambos casos, una banda con tamaño aproximado a 850 pb, siendo este valor algo mayor para el gen completo y algo menor para el gen sin el péptido señal (Figura 5), lo que encaja con lo esperado.

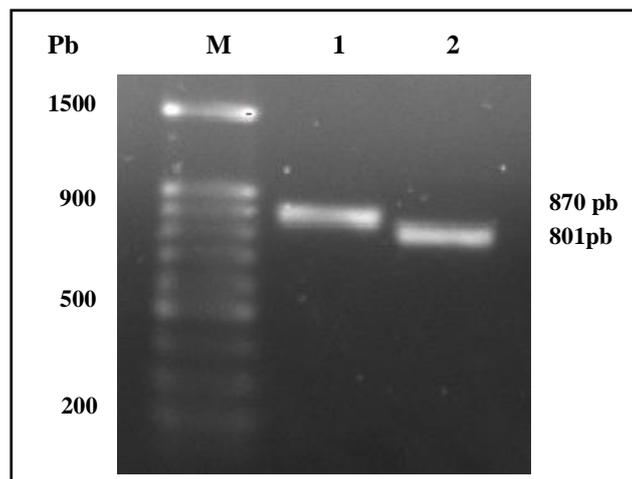


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa donde se aprecian los productos de amplificación por PCR. M: marcador de peso molecular (100 pb ladder) en pares de bases. Carriles 1 y 2: productos de PCR obtenidos al utilizar como molde el DNA cromosómico de *P. tunicata* y los oligonucleótidos descritos previamente para el gen entero (870 pb) y para el gen sin el péptido señal (801 pb), respectivamente.

Resultados y discusión

El sistema Expresso™ T7 está diseñado para llevar a cabo una estrategia de clonación sin tratamiento enzimático y sin necesidad de ligación mediante recombinación eficiente entre el vector y el inserto. Por esta razón, los productos de PCR se clonaron en el vector pETite C-His, prelinearizado y diseñado para la clonación direccional de fragmentos de DNA. Los cebadores utilizados para la amplificación del inserto de interés presentan 18 nucleótidos que se solapan con los extremos del vector. De esta manera se consigue que los productos de PCR obtenidos se clonen en la orientación deseada. La recombinación del vector y el inserto tuvo lugar en el interior de células competentes *E. coli* HI-Control™ 10G de Lucigen.

Las células transformadas se seleccionaron en medio LB suplementado con kanamicina (Figura 6). Debido a que esta cepa de *E. coli* es sensible a kanamicina, solamente podrán crecer en el citado medio aquellas células que hayan incorporado el plásmido, que posee un gen de resistencia a este antibiótico.

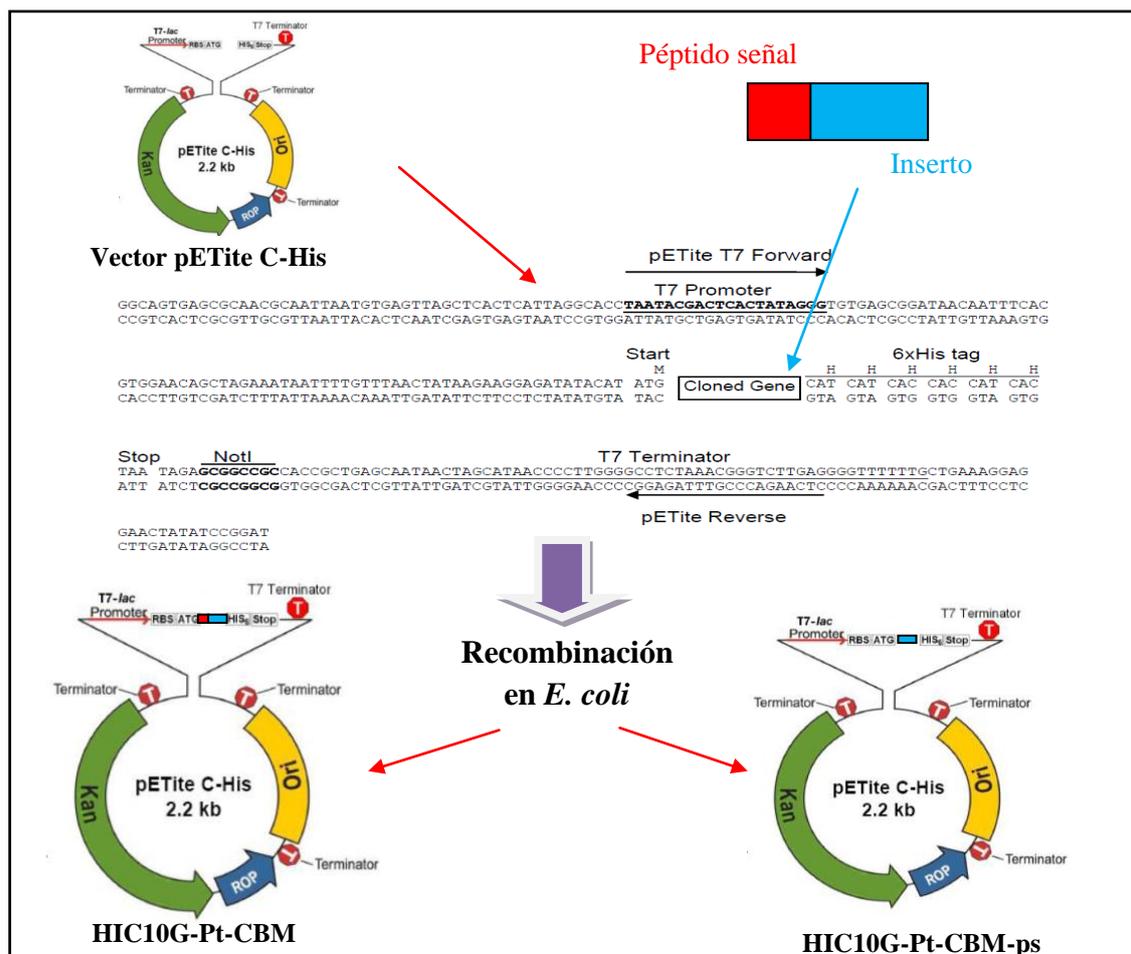


Figura 6: Esquema de la clonación de los insertos utilizando el vector pETite C-His en *E. coli* HI-Control™ 10G.

Se seleccionaron, concretamente, 5 colonias en el medio selectivo descrito en el apartado 3.2 de material y métodos y, a partir de cultivos líquidos de dichas colonias en las mismas condiciones, se extrajo el DNA plasmídico.

El éxito de la clonación se comprobó de dos formas distintas.

Con el programa informático "**Nebcutter**" (New English Biolabs) se buscaron las dianas de corte para enzimas de restricción en el vector, en el gen entero y en la secuencia del gen sin el péptido señal. En base a los resultados observados se eligió la enzima *EcoRI*, tanto por su bajo número de cortes en el vector (2) como por no cortar el inserto.

Por lo tanto, la primera comprobación se realizó mediante la digestión de dicho DNA con la enzima de restricción *EcoRI*. Los productos de las digestiones de los plásmidos extraídos de diferentes colonias recombinantes se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Se observó, en el experimento diseñado para clonar el gen completo, que en cuatro de los cinco clones analizados aparecían dos bandas con tamaños de 1956 y 1143 pb, respectivamente (Figura 7A), lo que se corresponde con lo esperado ya que la enzima tiene dos dianas de corte en el vector y ninguna en el inserto. Igualmente, en el experimento diseñado para clonar el gen sin el fragmento correspondiente al péptido señal, cuatro de los cinco clones analizados muestran dos bandas con tamaños de 1956 y 1080 pb (Figura 7B). Por otro lado, la muestra 3 podría también haber incorporado el gen de interés, aunque uno de los sitios de corte no es accesible a la enzima, ya que la enzima digiere dicha muestra en un único punto, en lugar de en los dos esperados, pero el tamaño de la banda que se observa coincide con la suma del tamaño del vector (2235 pb) más el del inserto (801 pb).

Resultados y discusión

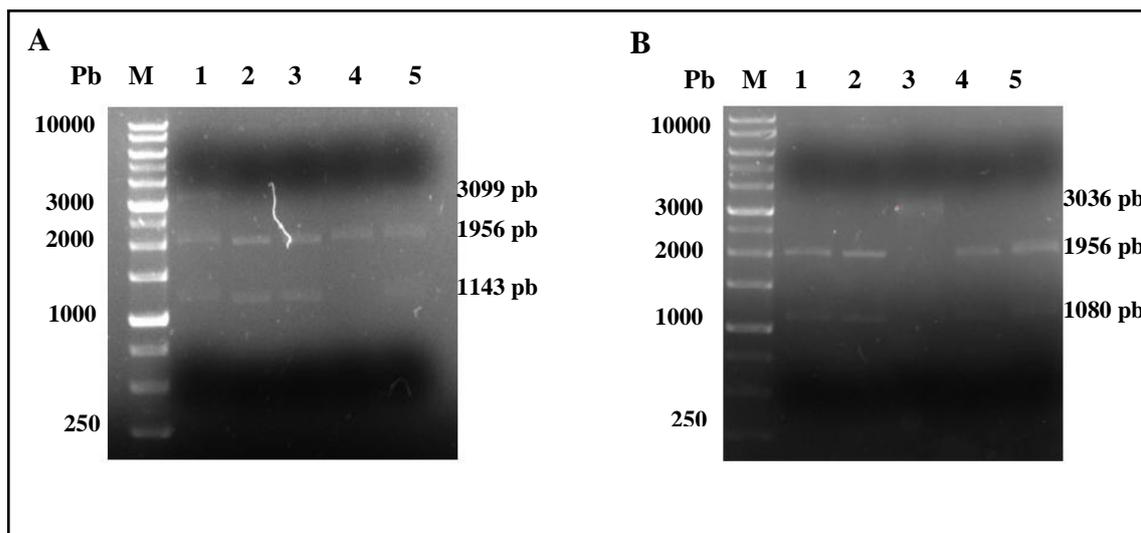


Figura 7 A-B: Electroforesis en gel de agarosa mostrando los productos de digestión de los plásmidos pETite C-His recombinantes. M: marcador de peso molecular (1 Kb ladder) en pares de bases. A) Carriles 1-5: El plásmido aislado y digerido con *EcoRI* de 5 colonias diferentes que deberían contener el gen completo. Se puede observar que las muestras 2, 3, y 5 han incorporado el gen de interés al observarse dos bandas de tamaños 1956 y 1143 pb, cuya suma coincide con el tamaño esperado para el plásmido recombinante (3099 pb). B) Carriles 1-5: El plásmido aislado y digerido con *EcoRI* de 5 colonias diferentes que deberían contener el gen sin la secuencia del péptido señal. Se puede observar que las muestras 1, 2, 4 y 5 han incorporado el gen de interés al observarse dos bandas de tamaños 1956 y 1080 pb, cuya suma coincide con el tamaño esperado para el plásmido recombinante (3036 pb).

Además, para reconfirmar el resultado anterior, se realizó una PCR utilizando como molde el DNA de los plásmidos recombinantes y como cebadores los oligonucleótidos previamente diseñados para este estudio. Se comprobó que en cuatro de los cinco clones que supuestamente contenían el gen completo, se amplificaba un fragmento del tamaño esperado, 870 pb (Figura 8A), y que en los cinco clones que debían contener el gen sin el péptido señal, se amplificaba un fragmento de 801 pb (Figura 8B), que coincidía también con el teórico.

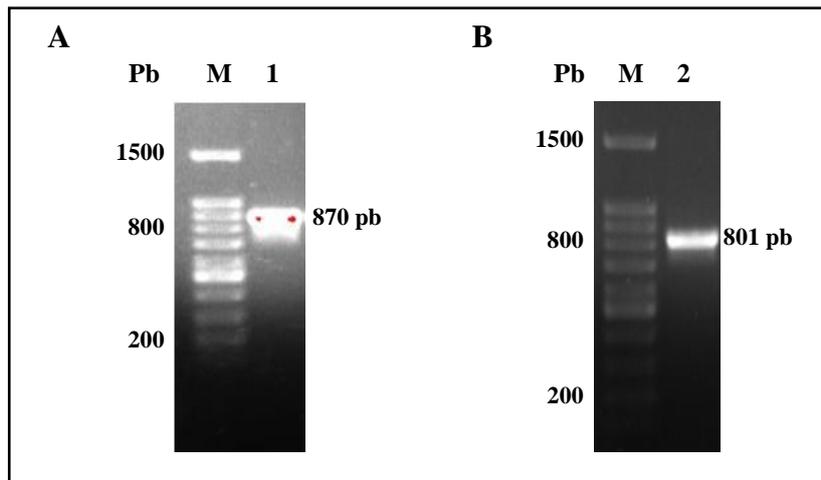


Figura 8 A-B: Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación de los genes clonados a partir de los plásmidos recombinantes. A) M: marcador de peso molecular (100 pb ladder) en pares de bases; carril 1: fragmento correspondiente al gen completo. B) M: marcador de peso molecular (100 pb ladder) en pares de bases; carril 2: fragmento correspondiente al gen sin péptido señal.

Por tanto, como resultado se obtuvo, por una parte, un plásmido recombinante que contiene el gen completo, al que se le dio el nombre de pETite-Pt-CBM y, por otra, un plásmido recombinante que contiene el gen sin la secuencia correspondiente al péptido señal de la proteína, al que se le dio el nombre de pETite-Pt-CBM-ps. El primero de ellos se utilizará para determinar la secuencia del gen completo y ambos plásmidos serán usados para la transformación de la cepa de expresión *E.coli* HI-Control™ BL21 (DE3) y para los ensayos de expresión de la proteína.

4.2 Secuenciación del DNA clonado. Análisis de la secuencia.

La secuencia del fragmento de DNA clonado en el plásmido pETite C-His correspondiente al gen completo tiene 870 pb y codificaría una proteína de 289 aminoácidos (Figura 9 A-B). Al gen se le ha denominado *Ptcbm* y a la proteína *PtCBMp*.

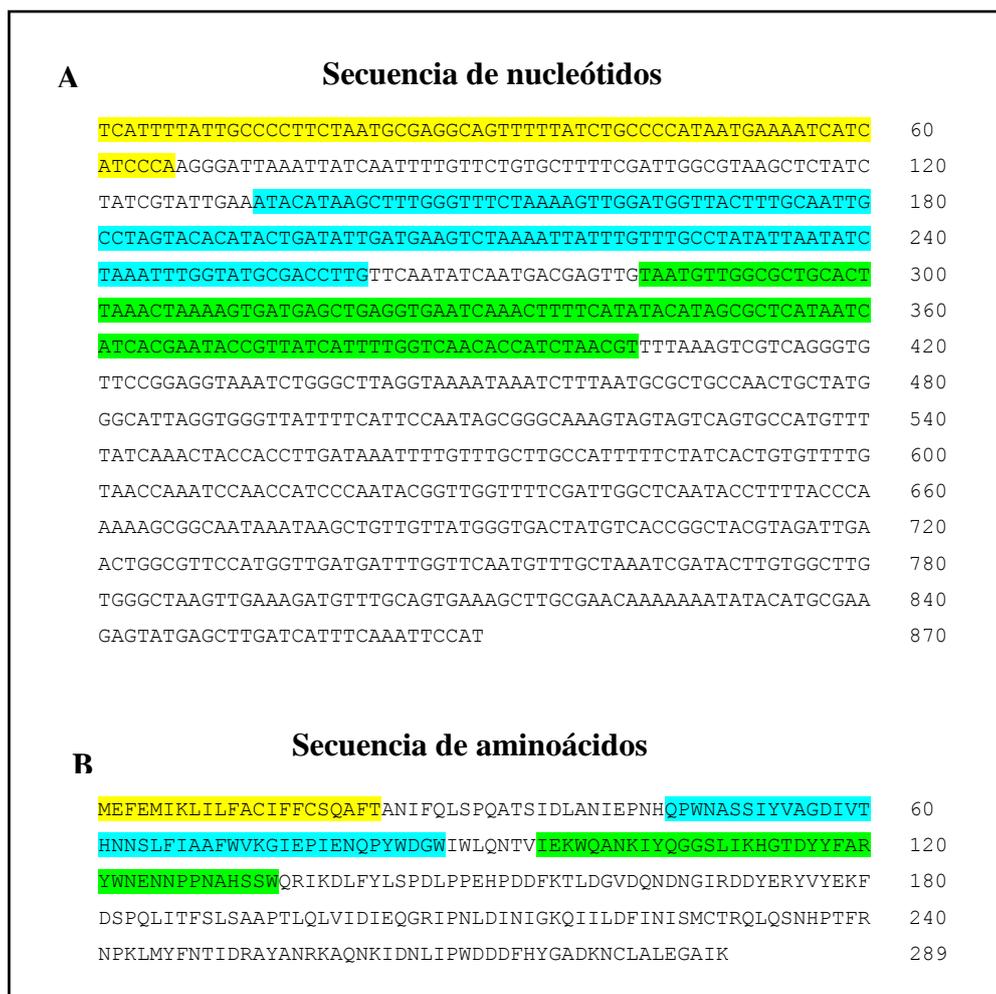


Figura 9 A-B: A) Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA clonado en el plásmido pETite C-His. B) secuencia de aminoácidos deducida de la misma. Se resalta en amarillo: posible péptido señal; azul: dominio de unión al carbohidrato entre los aminoácidos Q⁴⁵-W⁸⁷; verde: segundo dominio de unión a carbohidrato entre los aminoácidos I⁹⁵-W¹³⁴.

La comparación, mediante el programa informático Blast, de la secuencia proteica clonada con las que se encuentran en las bases de datos, se resume en la Tabla 1:

Tabla 1: Resumen de la comparación, mediante Blast, de la secuencia de la proteína clonada con otras de las bases de datos.

BACTERIAS	IDENTIDAD	VALOR E
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	82%	3e-174
<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	67%	1e-148
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. OCN003	66%	1e-145

Se observa la existencia de una alta identidad con proteínas de otras bacterias del mismo género como *P. haloplanktis*, *P. spongiae* o *Pseudoalteromonas* sp. OCN003.

El análisis de la secuencia proteica, codificada por el gen *Ptcbm* utilizando las herramientas del sistema de análisis ExPasy, mostró que está formada por una estructura multi-dominio (Figura 9B). El estudio de la proteína con el programa Signal P 4.0 puso de manifiesto que los primeros 22 aminoácidos (M¹-T²²) en la región N-terminal corresponden a un posible péptido señal, lo que sugiere que la proteína se secreta al medio. Además, y de acuerdo con el programa Pfam, las regiones situadas entre los aminoácidos Q⁴⁵-W⁸⁷ e I⁹⁵-W¹³⁴ corresponden a dominios de unión al sustrato, pertenecientes ambos a la familia CBM5/12. Este tipo de secuencias, cuando forman parte de la estructura de una enzima, facilitan su unión al sustrato a través de interacciones hidrofóbicas entre ciertos aminoácidos aromáticos y las moléculas de azúcar, permitiendo así una mayor degradación de dicho sustrato. Sin embargo, los dominios de unión a quitina también se han encontrado como proteínas independientes, no catalíticas, de unión a quitina. En la base de datos CAZy, estas proteínas CBP independientes caracterizadas hasta ahora están categorizadas en 3 familias: CBM14, CBM18 y AA10 (antiguamente CBM33) (Cantarel *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2011). Las CBPs de las familias 14 y 18 se han encontrado principalmente en insectos, hongos y levaduras, mientras que las de la familia AA10 se han encontrado mayoritariamente en bacterias y virus (Tran *et al.*, 2011). Por su lado, se ha visto que 2 CBPs, de las caracterizadas hasta ahora, que están incluidas en la familia AA10, presentan, además, un dominio CBM5/12. Éste es el caso de las CBPs de las bacterias patógenas de insectos *Paenibacillus larvae* y *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* (Mehmood *et al.*, 2011; García-González *et al.*, 2014). De esta manera y hasta lo que conocemos, *PtCBMp* es la primera CBP estudiada que presenta únicamente dominios CBM5/12. La secuencia consenso que está bien conservada en los módulos CBM5/12 de bacterias “AK[YW][YW]TK” (Brun *et al.*, 1997), también aparece parcialmente conservada en *PtCBMp* de *P. tunicata* CCUG 44952T. Generalmente, como aminoácidos aromáticos de esta secuencia consenso se encuentran el Trp y la Tyr, algo que también se observa en el CBM5/12 (I⁹⁵-W¹³⁴) de *PtCBMp*. Sin embargo, en ocasiones estos aminoácidos aparecen sustituidos por otro aminoácido aromático, como ocurre en el CBM5/12 (situado entre Q⁴⁵-W⁸⁷) de *PtCBMp* en donde se observa una Phe en lugar de un Trp o de una Tyr (A⁶⁸AFWVK⁷³). El alineamiento de los posibles CBM5/12 de la proteína clonada, utilizando el programa ClustalW2.0.12 (Larkin *et al.*, 2007), con los depositados en las

Resultados y discusión

bases de datos se muestra en la Figura 10. Ambos dominios CBM5/12 de *PtCBMp* presentaron valores de identidad altos y moderados con algunas secuencias teóricas de diferentes bacterias marinas depositadas en las bases de datos. En el caso del CBM más próximo al extremo N-terminal (localizado entre Q⁴⁵-W⁸⁷), los resultados observados fueron: 93% con *P. haloplanktis* (número de acceso WP_016708741); 67% con *P. spongiae* número de acceso WP_010558721); 64% con *Pseudoalteromonas* sp. OCN003 (número de acceso WP_040136465) y 49% *Vibrio navarrensis* (número de acceso WP_039432839) (Figura 10A). El otro CBM (situado entre I⁹⁵-W¹³⁴) (Figura 10 B) mostró valores de identidad: 80% con *P. haloplanktis* (número de acceso WP_016708741); 65% con *P. spongiae* (número de acceso WP_010558721); 63% con *Pseudoalteromonas* sp. OCN003 (número de acceso WP_040136465) y 45% *Aliivibrio fischeri* (número de acceso WP_005418687).

A		Identidad (%)
PtunCCUG (a)	QPWNASSIYVAGDIVTHNNSLFIA AAFWVK GIEPIENQPYWDGW	
Phalo (a)	--WSASSIYVAGDVVTHNNSLFIA AFWVK GIEPIENQPHWDGW	93
Pspn (a)	-PWNASSVYIAGDVVSHNENLFFVAM HWVK GIEPVKNNINWDGW	67
PspOCN003 (a)	-PWSASSVYIAGDVVSHNENLFFVAM HWVK GIEPVKNNINWDGW	64
Vnava	ELWDESKVYNSGDIVRWNDKVFIS HWTK GTEPVDNQLSWDGW	49
	* . * . : * : * * : * * * : * . * * * * : * * * * *	
B		Identidad (%)
PtunCCUG (b)	IEKWQANKIYQGGSLIKHGTDYYF ARYWNE NNPPNAHSSW	
Phalo (b)	IEKWQANKVYQAGNLVKHGTDYYLARY YWN ENNEPKPHSSW	80
Pspn (b)	IEKWQPAKVYQGGDLVKSGTDYFLARY YWN ENHEPKTNSW	65
PspOCN003 (b)	IEKWLPTKVYKGGDLVKYGTGYFLARY YWN ENNEPKSHSW	63
Afish	LEAWDAGKVYNGGEEVKQGTNAYKAKY YWT QNNDPATAGEW	45
	: * * . * : * : * . : * * * : : * : * * : * : * . . *	

Figura 10 A-B: Comparación de los dominios de unión a carbohidrato comprendidos entre los aminoácidos Q⁴⁵ y W⁸⁷ (A) e I⁹⁵ y W¹³⁴ (B) de la proteína de estudio de *P. tunicata* CCUG 44952T con otros dominios CBM5/12. Los aminoácidos idénticos aparecen marcados con (*), los que representan reemplazamientos conservados se marcan con (:), y los que representan reemplazamientos menos conservados se marcan con (.). PtunCCUG(a) y PtunCCUG(b), *P. tunicata* CCUG 44952T; Phalo(a) y Phalo(b), *P. haloplanktis* (WP_016708741); Pspn(a) y Pspn(b), *P. spongiae* (WP_010558721); PspOCN003(a) y PspOCN003(b), *Pseudoalteromonas* sp. OCN003 (WP_040136465); Vnava, *Vibrio navarrensis* (WP_039432839); Afisch, *Aliivibrio fischeri* (WP_005418687). La secuencia consenso “AK[YW][YW]TK” está representada en ambos casos en negrita. Los residuos aromáticos conservados que estarían implicados en la interacción entre el dominio de unión y las moléculas de azúcar están representados en letras de color blanco.

4.3 Expresión del producto del gen *Ptcbm* de *P. tunicata* en *E. coli*.

La caracterización de una proteína requiere disponer de la misma en cantidad suficiente para su estudio. Además, si tiene interés aplicado, es necesario disponer de cepas que permitan producirla a costes competitivos. Cuando las cepas silvestres no producen estas proteínas en gran cantidad, se puede optar por la expresión heteróloga de las mismas mediante la construcción de cepas recombinantes utilizando distintos hospedadores de tal manera que, en muchos casos, la construcción de estas cepas recombinantes es un paso clave tanto en el estudio de la nueva proteína como en la optimización del proceso de producción de la misma (Sørensen y Mortensen, 2005; Ko y Wang, 2006; Rosano y Ceccarelli, 2014).

En este estudio, para obtener la proteína recombinante se ha empleado *Escherichia coli*, la cual se ha convertido en la plataforma de expresión más popular. Los motivos de su uso masivo incluyen el conocimiento de sus rápidos parámetros de crecimiento (alrededor de 20 min para su duplicación, Sezonov *et al.*, 2007) por lo que es fácil obtener cultivos de alta densidad celular en poco tiempo, los componentes para la obtención del medio de crecimiento son baratos y fáciles de encontrar y la transformación con DNA exógeno es rápida y sencilla (Rosano y Ceccarelli, 2014).

La expresión del gen *Ptcbm* se plantea a nivel intracelular. Para ello se utilizaron los plásmidos pETite-Pt-CBM y pETite-Pt-CBM-ps, consistentes en el vector pETite C-His con el gen *Ptcbm* completo y sin la secuencia correspondiente al péptido señal de la proteína, respectivamente, y fusionado a una cola de 6xHis en su extremo C-terminal, con el propósito de facilitar la posterior purificación de la misma. El vector pETite C-His ha sido diseñado para la expresión de genes heterólogos bajo el control del promotor T7-*lac*. La recombinación tuvo lugar en el interior de la cepa hospedadora de *E. coli* HI-Control™ BL21 (DE3) y se seleccionó, como se indicó con anterioridad, una colonia recombinante con cada construcción, a las que se denominaron BL21-Pt-CBM y BL21-Pt-CBM-ps. La cepa de expresión HI-Control™ BL21 (DE3) de *E. coli* lleva lisogenizado el bacteriófago lambda DE3, el cual alberga el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor inducible *lacUV5*, una variante del promotor *lac*. Las células de la cepa de expresión contienen el plásmido BAC, el cual contiene una versión modificada del alelo represor *lacI^{q1}* (más eficiente en la expresión de proteína represora Lac que su homónimo salvaje). De esta forma, se consigue mantener un control estricto sobre la expresión de la RNA polimerasa T7 a partir del promotor *lacUV5*. Además, esta

Resultados y discusión

abundancia de represor no interfiere con la inducción de la RNA polimerasa de T7 o con la expresión del gen de interés mediante IPTG, ya que, en ausencia de inductor, el represor *lac* modificado reprime la expresión de la RNA polimerasa T7 y es la adición de IPTG la que permitirá la expresión de la RNA polimerasa T7 desde el promotor *lacUV5*.

Las cepas recombinantes BL21-Pt-CBM y BL21-Pt-CBM-ps, construidas en este estudio, fueron utilizadas para los ensayos de expresión intracelular, tal como se indica en el apartado 3.9 de material y métodos. Dichas cepas se cultivaron en medio LB suplementado con kanamicina hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm próxima a 0,6. A partir de ese momento se procedió a la inducción con IPTG a una concentración final de 1 mM. La inducción se realizó durante 4 horas y se tomaron alícuotas a intervalos de una hora que se aplicaron en un gel de SDS-PAGE para visualización de las proteínas con Azul de Coomassie. Los resultados con la cepa BL21-Pt-CBM-ps se observan en la Figura 11, donde se aprecia que tras una hora de inducción de la cepa recombinante aparece una banda de aproximadamente 32 kDa (Figuras 11B y 11D), que se mantiene en todas las muestras tomadas tras la inducción, que no se detecta en la muestra tomada con anterioridad a la inducción y que, probablemente se corresponde con la proteína de fusión recombinante. Además, dicha banda tampoco se observa en ninguna de las muestras recogidas del ensayo realizado sin inductor (Figuras 11A, 11C). Dicho tamaño concuerda con el deducido teóricamente con el programa informático Prosite a partir de la secuencia de aminoácidos. Eliminando el peso molecular que corresponde al fragmento que incluye la cola 6xHis, obtenemos un peso molecular de 29,3 kDa que coincide con el deducido teóricamente en base a la secuencia de aminoácidos de la proteína sin péptido señal.

En cuanto a la cepa BL21-Pt-CBM, no se observa en ninguna de las muestras tomadas tras añadir IPTG, mediante SDS-PAGE, la presencia de una banda que pudiese indicar que la proteína de fusión recombinante se ha inducido (resultados no mostrados). En este caso, serán necesarios estudios posteriores para tratar de demostrar la posible expresión de la proteína.

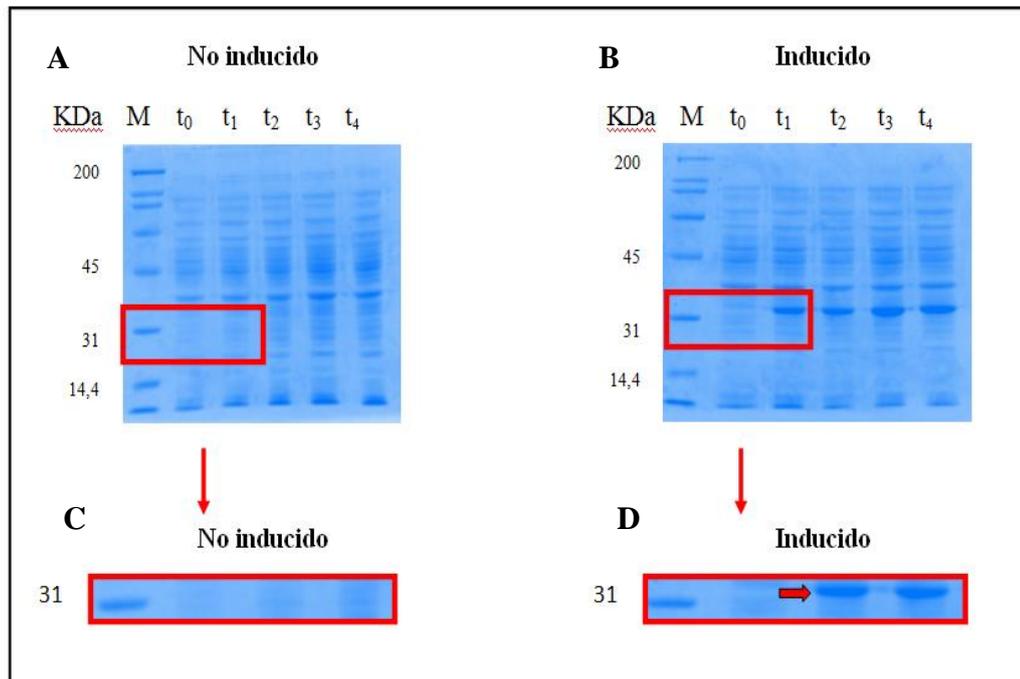


Figura 11 A-B-C-D: SDS-PAGE donde se muestran los resultados de la expresión del gen *Ptcbm* sin péptido señal de *P. tunicata*. A) Ensayo realizado sin el inductor. M: marcador de proteínas; t_0 : muestra cultivo a $DO_{600}=0,626$; t_1 - t_4 : muestras posteriores tomadas a intervalos de una hora. B) Ensayo realizado con IPTG como inductor. M: marcador de proteínas; t_0 : muestra cultivo a $DO_{600}=0,631$; t_1 - t_4 : muestras tomadas después de la adición del inductor, a intervalos de una hora. C) Detalle de la zona del gel correspondiente a las muestras del ensayo llevado a cabo sin inducción. D) Detalle de la zona del gel correspondiente a las muestras del ensayo inducido con IPTG donde a t_1 se aprecia una banda de inducción que no se observa a t_0 . Flecha roja: señala la banda que representa la proteína inducida.

En este estudio se ha identificado en *P. tunicata* un gen (*Ptcbm*) que codifica una proteína de unión a quitina, *PtCBMp* que contiene dos módulos de unión a carbohidratos de la familia CBM5/12. Dicho gen ha sido clonado y se ha construido una cepa recombinante de *E. coli* para su expresión. El sistema de expresión heteróloga intracelular basado en *E. coli* ha sido utilizado con éxito en diversas ocasiones para expresar quitinasas bacterianas y fúngicas (Felse y Panda, 1999) y, en este estudio, se ha mostrado adecuado también para la producción de la proteína de unión a quitina de *P. tunicata* *PtCBMp*. Ésta se expresa en *E. coli*, en condiciones de inducción, como proteína fusionada a una cola de 6 histidinas, lo que facilitará su posterior purificación.

La proteína expresada podrá ser purificada para tratar de averiguar su potencial interés aplicado y para qué aplicaciones podría resultar más interesante. Entre ellas, y en

Resultados y discusión

base a estudios previos relativos a su importancia (Manjeet *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2014) y ya comentados anteriormente, se podrá evaluar su posible capacidad para actuar de forma sinérgica con quitinasas incrementando su actividad hidrolítica y eficiencia en la degradación de quitina. Por otra parte, se podrá probar su posible acción antifúngica frente a distintos tipos de hongos, tanto en solitario como en combinación con quitinasas ya caracterizadas.

5. CONCLUSIONES

1. La pauta abierta de lectura del genoma secuenciado de *Pseudoalteromonas tunicata* (referencia de acceso EAR27334.1) ha sido amplificada a partir de la cepa CCUG 44952T, clonada en *Escherichia coli* y secuenciada. La secuencia que tiene 870 pb y la proteína deducida de la misma, con 289 aa, muestra alta identidad con otras proteínas de unión a quitina del género *Pseudoalteromonas*.
2. El análisis de la secuencia de dicha proteína, denominada *PtCBMp*, puso de manifiesto que presenta una estructura modular formada por un posible péptido señal (M¹-T²²), y dos módulos de unión a quitina de tipo CBM5/12 (Q⁴⁵-W⁸⁷ y I⁹⁵-W¹³⁴).
3. Se ha construido una cepa recombinante de *E. coli* que expresa la proteína *PtCBMp* de aproximadamente 30 kDa fusionada a una cola de 6 histidinas.

Bibliografia

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. **Adrangi, S.**, Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv.* 31: 1786–1795.
2. **Batista, A. B.**, Oliveira, J. T. A., Gifoni, J. M., Pereira, M. L., Almeida, M. G. G., Gomes, V. M., Cunha, M., Ribeiro, F., Dias, G. B., Beltramini, L. M., Lopes, J. S., Grangeiro, T. B., Vasconcelos, I. M. (2014). New insights into the structure and mode of action of *Mo*-CBP₃, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. *PLoS ONE* 9: e111427. doi:10.1371/journal.pone.0111427.
3. **Bendtsen, J. D.**, Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004). *J. Mol Biol.* 340: 783-795.
4. **Bhattacharya, D.**, Nagpure A., Gupta, R.K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential, *Crit Rev Biotechnol.* 27: 21–28.
5. **Brun, E.**, Moriaud, F., Gans, P., Blackledge, M. J., Barras, F., Marion, D. (1997). Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*. *Biochemistry- Us.* 36: 16074– 16078.
6. **Cantarel, B.L.**, Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics, *Nucleic Acids Res.* 37: 233–238.
7. **Carpenter, C.** (2002). A tale of two recombinases: characterization of Piv and Moov. Tesis doctoral. Universidad de Georgia, USA.
8. **Chen, L.**, Chen, J., Kumar, A., Liu, Z. (2015). Effects of domains modification on the catalytic potential of chitinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Biol Macromol.* 78: 266- 272.
9. **Dahiya, N.**, Tewari, R., Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71: 773–782.
10. **Felse, P.A.**, Panda, T. (1999). Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 141–151.
11. **Frederiksen, R. F.**, Paspaliari, D. K., Larsen, T., Storgaard, B. G., Larsen, M. H., Ingmer, H., Palcic, M. M., Leisne, J. J. (2013). Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology.* 159: 883–847.
12. **García-Fraga, B.**, da Silva, A. F., López-Seijas, J., Sieiro, C. (2015). A novel family 19 chitinase from the marine-derived *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T: heterologous expression, characterization and antifungal activity. *Biochem Eng J.* 93: 84–93.
13. **García-Gonzalez, E.**, Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., Genersch, E. (2014). *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein PICBP49 is a key–virulence factor in american foulbrood of honey bees. *PLoS Pathog* 10: e1004284.
14. **Hamid, R.**, Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., Javed, S. (2013). Chitinases: an update. *J Pharm Bioallied Sci.* 5:21–29.
15. **Holmström, C.**, James, S., Neilan, B. A., White, D., Kjelleberg, S. (1998). *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int J Syst Bacteriol.* 48: 1205–1212.

16. **Holmström** C, Kjelleberg S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *Microbiol Ecol.* 30: 285–293.
17. **Holmström**, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *Microbiol Ecol.* 41: 47–58.
18. **Kirn**, T. J., Jude, B. A., Taylor, R. K. (2005). A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 438: 863–866.
19. **Ko**, C. L., Wang, F. S. (2006). Run-to-run fed-batch optimization for protein production using recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J.* 30: 279–285.
20. **Laemmli**, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
21. **Larkin**, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 21: 2947–2848.
22. **Larsen**, M. (2000). Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. *Parasitology.* 120:121–131.
23. **León**, J., Liza, L., Soto, I., Torres, M., Orosco, A. (2010). Bacterias productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 27: 215–221.
24. **Manjeet**, K., Purushotham, P., Neeraja, C., Podile, R. A. (2013). Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases. *Microbiol Res.* 168: 461–468.
25. **Martínez**, J., Falomir, M. P., Gozalbo, D. (2014). Chitin: a structural biopolysaccharide with multiple applications. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
26. **Mehmood**, M. A., Xiao, X., Hafeez, F. Y., Gai, Y., Wang, F. (2011). Molecular characterization of the modular chitin binding protein Cbp50 from *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian*. *Anton Leeuw Int J G.* 100: 445–453.
27. **Naosekham**, S. A., Rajni, V., Shanmugam, V. (2006). Extracellular chitinase of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Curr Microbiol.* 52: 310–316.
28. **Raikhel**, N. V., Lee, H. I., Broekaert, W. F. (1993). Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu Rev Plant Physiol.* 44: 591–615.
29. **Rosano**, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 5: 1–17.
30. **Sambrook**, J., Fritsch, E.F. Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
31. **Sanger**, F., Niklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 5463–5467.
32. **Sastoque**, E.L. (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
33. **Selitrennikoff**, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2883–2894.

Bibliografia

34. **Sezonov, G.**, Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189: 8746–8749.
35. **Songsiriritthigul, C.**, Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., Yamabhai, M. (2010). Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresource Technol.* 101: 4096–4103.
36. **Sørensen, H. P.**, Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 115: 113–128.
37. **Swiontek, B. M.**, Jankiewicz, U., Burkowska, A., Walczak, M. (2014). Chitinolytic microorganisms and their possible applications in environmental protection. *Curr Microbiol.* 68:71–81.
38. **Torsten, T.**, Evans, F., Schleheck, D., Prochnow, A., Burke, C., Penesyan, A., Dalisay, D. S., Stelzer-Braid, S., Saunders, N., Johnson, J., Ferriera, S., Kjelleberg, S., Egan, S. (2008). Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicate* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment. *PLoS ONE.* 3: e3252.
39. **Tran, H. T.**, Barnich, N., Mizoguchi, E. (2011). Potential role of chitinases and chitin-binding proteins in host-microbial interactions during the development of intestinal inflammation. *Histol Histopathol.* 26: 1453–1464.
40. **Ubhayasekera, W.** (2011). Structure and function of chitinases from glycoside hydro-lase family 19. *Polym. Int.* 60: 890–896.
41. **Vaaje-Kolstad, G.**, Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B., Eijsink, V. G. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem.* 280: 28492–28497.
42. **Vaaje-Kolstad, G.**, Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z. L., Zhai, H., Sørli, M., Eijsink, V. G. H. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science.*330: 219–222.
43. **Vaaje-Kolstad, G.**, Bøhle, L. A., Gaseidnes, S., Dalhus, B., Bjørås, M., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. H. (2012). Characterization of the chitinolytic machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and high resolution structure of its oxidative CBM33 enzyme. *J Mol Biol.* 416: 239–254.
44. **Vaaje-Kolstad, G.**, Horn, S. J., Sørli, M., Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J.* 280: 3028–3049.
45. **Watanabe, T.**, Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology.*145: 3353–3363.
46. **Yang, J. L.**, Liang, J., Li, K., Zhang, Q. (2013). Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 7081–7095.