

Trabajo Fin de Grado

**Clonaje, expresión recombinante, purificación y
evaluación de la actividad biológica del regulador de
respuesta esencial
CprR de *Campylobacter jejuni***

**Cloning, recombinant expression, purification and
evaluation of the biological activity of the essential
regulator CprR of *Campylobacter jejuni***

Autor:

Jesús Gascón Murugarren

Directores:

Andrés González Rodríguez

Javier Casado Apastegui

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

Universidad de Zaragoza

2023/2024

PRESENTACIÓN

Título del proyecto: Clonaje, expresión recombinante, purificación y evaluación de la actividad biológica del regulador de respuesta esencial CprR de *Campylobacter jejuni*.

Title of the project: Cloning, recombinant expression, purification and evaluation of the biological activity of the essential regulator CprR of *Campylobacter jejuni*

Autor: Jesús Gascón Murugarren

Directores: Andrés González Rodríguez y Javier Casado Apastegui

Lugar de elaboración del TFG: Universidad de Zaragoza / Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS-Aragón), Grupo de Investigación Traslacional en Patología Digestiva.

Departamento que gestiona el TFG: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza.

ABREVIATURAS

aa:	Aminoácidos
ATP:	Adenosín trifosfato
C-terminal:	Extremo carboxilo terminal
Da:	Dalton
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs:	Mezcla de desoxirribonucleótidos
DO:	Densidad óptica
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA:	Ensayo de retardo en gel (<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>)
His-tag:	Cola de histidinas
IMAC:	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
Kb:	Kilobases
kDa:	Kilodalton
Km:	Kanamicina
KO:	<i>Knock-out</i>
LB:	Medio Luria-Bertani
LBK:	Medio Luria-Bertani suplementado con kanamicina a concentración (50 μ g/mL)
mA:	Miliamperio
MCS:	<i>Multiple cloning site/ sitio de clonaje múltiple</i>
m/v:	Relación masa/volumen
N-terminal:	Extremo amino terminal
nm	Nanómetro
O/N:	<i>Overnight</i>
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pET28a-	Vector de expresión pET28a (+) con la secuencia del gen <i>cprR</i> clonada
CprR:	
PSA:	Persulfato de amonio
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE:	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TAE:	Tris Acetato EDTA
TBE:	Tris Borato EDTA
TEMED:	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Tm:	Temperatura de <i>melting</i> o fusión
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometano
U:	Unidad de actividad enzimática
UFC:	Unidades formadoras de colonias
v/v:	Porcentaje de volumen/volumen
ϵ :	Coeficiente de extinción molar

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1. Microbiología, patogenia y epidemiología de <i>Campylobacter jejuni</i>	2
1.2. Resistencia a antimicrobianos	3
1.3. El regulador transcripcional esencial CprR como nueva estrategia terapéutica.....	3
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1. Cepas y condiciones de cultivo	6
3.2. Producción de células quimiocompetentes por el método de CaCl₂	6
3.3. Clonaje del gen <i>cprR</i> en el vector pET-28a (+)	6
3.3.1. Amplificación del gen <i>cprR</i> mediante PCR de alta fidelidad	6
3.3.2. Transformación de <i>E. coli</i> DH5α quimiocompetente.....	7
3.3.3. Restricción enzimática del DNA y ligación	7
3.3.4. Transformación de <i>E. coli</i> DH5α quimiocompetente con el vector pET28a-CprR	8
3.3.5. Identificación de clones recombinantes.....	8
3.3.6. Secuenciación de vectores	9
3.4. Expresión de CprR recombinante en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	9
3.4.1. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	9
3.4.2. Ensayos de sobreexpresión de CprR recombinante.....	9
3.4.3. Producción de biomasa en <i>E. coli</i> BL21(DE3) sobreexpresando CprR	10
3.5. Purificación de CprR mediante cromatografía afinidad a metales iónicos inmovilizados (IMAC).....	10
3.5.1. Preparación de la columna de cromatografía.....	10
3.5.2. Preparación del extracto crudo.....	10
3.5.3. Purificación mediante IMAC (<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>)	10
3.5.4. Selección de las fracciones de eluido.....	11
3.5.5. Diálisis	11
3.5.6. Cuantificación de proteína mediante espectrofotometría	11
3.5.7. Cuantificación de proteína mediante método de Bradford	11
3.6. Evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> de CprR recombinante mediante EMSA.....	12
3.6.1. Producción de las secuencias diana P_{cprR} y P_{htrA}	12
3.6.2. Ensayo de retardo en gel (EMSA)	12

3.6.3. Ensayos de inhibición de CprR recombinante <i>in vitro</i>.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1. Clonaje del gen <i>cprR</i> de <i>C. jejuni</i> en el vector pET-28a (+).....	13
4.2. Expresión de CprR recombinante en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	15
4.3. Producción de biomasa en <i>E. coli</i> BL21(DE3) sobreexpresando CprR recombinante	16
4.4. Purificación de CprR recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales iónicos inmovilizados (IMAC).....	17
4.4.1 Purificación mediante IMAC	17
4.4.2. Cuantificación de proteína mediante espectrofotometría	19
4.4.3. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford	19
4.5. Evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> de CprR recombinante mediante EMSA.....	20
4.5.1. Ensayo de retardo en gel (EMSA)	20
4.5.2. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	21
5. CONCLUSIONES.....	22
6. BIBLIOGRAFÍA	23
7. ANEXOS	26

RESUMEN

Campylobacter jejuni es el agente etiológico del 80-90% de las infecciones por bacterias del género *Campylobacter* (campilobacteriosis) en el ser humano, siendo considerado el principal patógeno zoonótico causante de gastroenteritis en países desarrollados. El uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento de estas infecciones ha incrementado considerablemente los niveles de resistencia antimicrobiana en este patógeno y limitado la eficacia de las terapias antimicrobianas de primera línea empleadas en la actualidad. En consecuencia, la Organización Mundial de la Salud ha incluido a *C. jejuni* como patógeno bacteriano de prioridad alta en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. El regulador de respuesta CprR de *C. jejuni* constituye una potencial diana terapéutica para el desarrollo de nuevos antibióticos dado su carácter esencial para la viabilidad del microorganismo. Asimismo, se trata de una proteína poco conservada entre otros géneros bacterianos, lo que facilita el descubrimiento de antimicrobianos de acción específica o espectro reducido, limitando su efecto sobre la microbiota normal. En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha llevado a cabo el clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína CprR recombinante, con un alto grado de pureza y actividad biológica. El regulador de respuesta CprR fue capaz de unirse de forma específica a promotores diana conocidos. La actividad de unión al DNA de CprR fue inhibida *in vitro* por compuestos de bajo peso molecular que al parecer actúan como ligandos inhibidores de la actividad del regulador. Los resultados obtenidos constituyen un importante punto de partida para la caracterización y validación de este regulador de respuesta esencial como diana terapéutica frente a *C. jejuni*.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*, resistencia antimicrobiana, diana terapéutica, regulador transcripcional, regulador de respuesta, CprR.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the etiological agent of 80-90% of *Campylobacter* genus infections (campylobacteriosis) in humans and it is considered the main zoonotic pathogen causing gastroenteritis in developed countries. The inappropriate use of antibiotics for the treatment of these infections has considerably increased antimicrobial resistance levels in this pathogen and it has also limited the efficacy of the first-line antimicrobial therapies currently used. Consequently, the World Health Organization has included *C. jejuni* as a high priority bacterial pathogen for the search of new antimicrobial agents. The *C. jejuni* CprR response regulator constitutes a potential therapeutic target for the development of new antibiotics owing to its essentiality for the viability of the microorganism. In addition, CprR is a poorly conserved protein among other bacterial genus, facilitating the discovery of specific or narrow-spectrum antimicrobial compounds, limiting as well as their effect on normal microbiota. In this final degree project, the cloning, overexpression and purification of recombinant CprR protein with a high degree of purity and biological activity has been achieved. The CprR response regulator was able to bind specifically to known target promoters. The CprR DNA binding activity was inhibited *in vitro* by low molecular weight compounds that appear to act as inhibitory ligands for the activity of the regulator. The results obtained constitute an important starting point for the characterization and validation of this essential response regulator as a therapeutic target against *C. jejuni*.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, antimicrobial resistance, therapeutic target, transcriptional regulator, response regulator, CprR.

1. ANTECEDENTES

1.1. Microbiología, patogenia y epidemiología de *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni es un patógeno Gram negativo bacilo helicoidal (ver Figura 1) microaerófilo y de transmisión alimentaria, siendo la principal causa de gastroenteritis en los países desarrollados. Este microorganismo es el responsable del 80-90% de las infecciones ocasionadas por el género *Campylobacter* (1). En la mayoría de los animales colonizados por esta bacteria, *C. jejuni* actúa como un microorganismo comensal sin provocar ninguna sintomatología. En humanos, las infecciones y enfermedad causadas por este patógeno, denominadas campilobacteriosis, se caracterizan por: náuseas, dolor abdominal, fiebre, vómitos y diarrea intensa frecuentemente sanguinolenta (2, 3). *C. jejuni* presenta dosis infectivas bajas de 500-800 bacterias (4) y un periodo de incubación de 2 a 5 días, con una resolución de la enfermedad de una semana habitualmente; aunque los síntomas se pueden prolongar hasta 2 semanas (5). *C. jejuni* pertenece al phylum *Campylobacterota* (antes denominado ϵ -proteobacteria) (6) que incluye a los géneros *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* y *Arcobacter* (7). Estos géneros presentan genomas pequeños (1,6-2 megabases) y pueden establecer colonizaciones a largo plazo en el hospedador (8). Existen 31 especies y 10 subespecies dentro del género *Campylobacter*, incluyendo algunas especies de relevancia clínica como: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* (9). *C. jejuni* es el principal responsable de las gastroenteritis en humanos en la Unión Europea (UE) según la European Food Safety Administration (EFSA). En 2022, se confirmaron 137.309 casos de campilobacteriosis en la UE, aunque se considera una enfermedad infradiagnosticada. Se estima que el coste de la campilobacteriosis para el sistema sanitario y la pérdida de productividad asociada se sitúa en torno a los 2.400 millones de euros anuales (10).

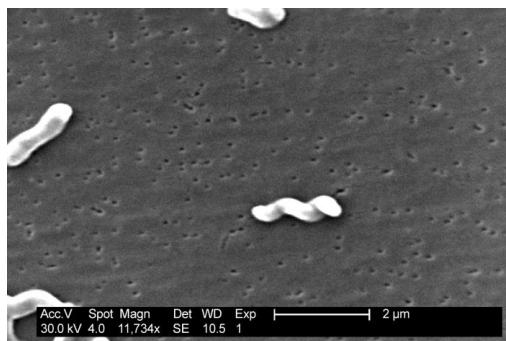


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la ultraestructura *C. jejuni*. Tomada de Public Health Image Library (PHIL): <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=5778>.

Se trata de una enfermedad autolimitada, pero en determinados pacientes susceptibles como ancianos o personas inmunocomprometidas, puede llevar a bacteriemia. Aproximadamente 1 de cada 1000 casos derivan en el síndrome neurológico de Guillain-Barré, con una posible parálisis ascendente bilateral por desmielinización, que suele requerir cuidados intensivos durante varias semanas hasta su recuperación. No obstante, en ocasiones se puede generar un daño permanente en los nervios e incluso resultar letal (2, 3, 11). Esta enfermedad se produce por una respuesta autoinmune debido a la similitud estructural de oligosacáridos de *C. jejuni* con los gangliósidos humanos GM1 y GQ1b (12). Otras secuelas asociadas a la infección por *C. jejuni* son artritis reactiva (13), enfermedades inflamatorias intestinales (14) o síndrome de intestino irritable post-infección (13). Aunque poco frecuente, la bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos puede derivar también en meningitis (15) o enfermedades cardiovasculares (16).

Uno de los principales reservorios para esta bacteria lo constituyen las aves de corral, aunque también se encuentra en ganado bovino, ovino y porcino, como parte de la microbiota intestinal de forma asintomática (17). Se estima que el tracto intestinal de los pollos se encuentra colonizado por *C. jejuni* de forma endémica a partir de las 2-4 primeras semanas de vida (8, 18). La transmisión del patógeno en humanos suele ocurrir por el consumo de carne de pollo con una cocción insuficiente (8) y por otros alimentos contaminados con materia fecal, leche sin pasteurizar o fuentes de agua no tratada (19, 20). Según un informe de la EFSA, un 31% de las carcasas de pollo analizadas se encontraban contaminadas con *C. jejuni* (10). En la actualidad, no existen vacunas comerciales y los tratamientos de las aves de corral con antibióticos no consiguen ni la eliminación efectiva del patógeno ni la prevención de la colonización (21).

C. jejuni supone un serio riesgo para la salud pública como patógeno zoonótico, superando las medidas de control establecidas. Sin embargo, se trata de un microorganismo fastidioso cuyo cultivo en laboratorio es complejo, precisando de un medio de cultivo enriquecido, temperaturas de entre 37°C y 42°C y una atmósfera microaeróbica rica en CO₂ (5, 22). Los mecanismos de patogenia no se conocen en detalle, sin embargo, se ha determinado que proteínas relacionadas con la motilidad, el transporte y la glicosilación de otras proteínas de superficie, así como una toxina citoletal distensora responsable de la detención del ciclo celular de las células infectadas, juegan un papel clave en la colonización (8). Además, *C. jejuni* puede sufrir cambios fisiológicos, adquiriendo a una forma viable pero no cultivable (VBNC, *viable but non-culturable*) en respuesta a condiciones de estrés, como la exposición a atmósfera aeróbica o el estrés ácido, manteniendo la infectividad y aumentando su resistencia (23, 24).

1.2. Resistencia a antimicrobianos

A pesar de que la campilobacteriosis se considera una infección autolimitada tratada con reposición de líquidos y electrolitos, el tratamiento con antibióticos está indicado en infecciones invasivas o en pacientes de riesgo, para prevenir la aparición de complicaciones graves (22). El uso inadecuado de antibióticos en humanos y animales ha favorecido el aumento de resistencias de *C. jejuni* frente a los antibióticos, principalmente a fluoroquinolonas (25, 26). Además, al tratarse de una bacteria naturalmente transformable, incluso en ausencia de presión selectiva, presenta una mayor susceptibilidad a incorporar genes de resistencia a antibióticos (26). Este microorganismo posee una resistencia intrínseca a novobiocina, vancomicina y polimixina/colistina, debida a la ausencia de dianas y/o a una baja afinidad de unión a las mismas (27, 28).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a *C. jejuni* resistente a fluoroquinolonas como de prioridad alta en su lista de patógenos prioritarios para la búsqueda de nuevos antimicrobianos (29). Como se observa en la Figura 2, los aislamientos clínicos resistentes a ciprofloxacino en la UE durante el año 2022 superaron el 27%, llegando a más del 75% de aislamientos resistentes a este antibiótico en varios países, incluyendo España con un 80,8 % (30, 31). La aparición de resistencias a estos antibióticos compromete seriamente la eficacia del tratamiento, poniendo en riesgo a los pacientes (32).

1.3. El regulador transcripcional esencial CprR como nueva estrategia terapéutica

Los sistemas de regulación de dos componentes (TCRS, *Two-Component Regulatory Systems*) constituyen el principal mecanismo de respuesta a los cambios del medio en procariotas (33, 34). Estos sistemas transmiten la señal que induce la respuesta mediante una proteína transmembrana sensor histidina quinasa (SK) que, activada por esta señal, se autofosforila y en la ruta clásica produce la fosforilación en un residuo de aspartato de un regulador de respuesta citosólico con capacidad de unión a DNA (RR). Este regulador de respuesta, que actúa como un regulador transcripcional, controla la respuesta de adaptación al entorno mediante la represión o activación de la transcripción de determinados genes (35-37).



Figura 2. Porcentaje de aislamientos clínicos de *C. jejuni* con resistencia a ciprofloxacino en la UE en el año 2022. Datos extraídos de *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* (ECDC) (30).

Los TCRS pueden ser buenas dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos debido a que son proteínas en muchos casos esenciales para la viabilidad celular y además porque su inhibición puede afectar, no solo a la expresión de los genes directamente regulados por ellos, sino a otros genes cuya expresión dependa de ellos indirectamente. Por consiguiente, los fármacos antimicrobianos dirigidos contra reguladores transcripcionales deberán inhibir su actividad biológica bloqueando su capacidad de unirse al DNA, imposibilitando de este modo que interaccionen con las regiones promotoras de los genes que regulan e impidiendo que modulen su expresión (38). El Grupo de Investigación Traslacional en Patología Digestiva del IIS Aragón ha sido el primer grupo de investigación en emplear con éxito los reguladores de respuesta HsrA y ArsR de *Helicobacter pylori*, otro patógeno de prioridad alta perteneciente al phylum *Campylobacterota*, como dianas terapéuticas para la búsqueda de nuevos antimicrobianos de precisión, validando el uso de este grupo de moléculas como dianas terapéuticas efectivas para tal fin (39-42).

En *C. jejuni* el sistema de regulación de dos componentes CprRS (*Campylobacter planktonic growth regulation*) presenta un regulador de respuesta esencial denominado CprR y el sensor quinasa CprS. Se ha demostrado que CprS no resulta imprescindible para la actividad del sistema de regulación, pues el mutante *knock out* (KO) para este gen mantenía la viabilidad (43). Sin embargo, otros estudios mostraron que CprR sí era esencial para la viabilidad, dado que resultaba imposible la generación de mutantes de delección para este regulador y sólo se podía inactivar CprR (*Cj1227c*) cuando existía una segunda copia del gen en una localización heteróloga (44). El sistema CprRS participa en la inducción de cambios fisiológicos y del metabolismo relacionados con la formación de *biofilm*, la tolerancia al estrés osmótico y la patogenia (43). En consecuencia, el mutante KO para CprS presenta deficiencias en el crecimiento y la osmotolerancia, un aumento de la dosis infectiva mínima, hiperproducción de *biofilm* y mayor dificultad para la colonización de aves de corral. Adicionalmente, el regulón de CprRS incluye genes implicados en la biogénesis de componentes de la envuelta (proteínas, peptidoglicanos, carbohidratos y lípidos) y parece estar relacionado con la producción de los factores de virulencia CiaB y FlpA (45). CiaB (*Campylobacter invasion antigen B*) es un factor de virulencia necesario para la colonización de pollos de corral (46) que junto con otras proteínas Cia induce la reorganización del citoesqueleto celular y la incorporación de las bacterias dentro de vesículas (47, 48). Por su parte, FlpA (*Fibronectin-like protein A*) es una adhesina que también juega un papel importante para la colonización en pollos (49). Finalmente, como ya se ha mencionado, CprRS controla la formación de *biofilms*, inhibiendo su generación y favoreciendo la adopción de formas más proliferativas durante la infección del hospedador (50).

CprRS es una proteína que se encuentra conservada únicamente en la familia *Campylobacteraceae*, lo cual indica que se trata de un sistema que regula aspectos específicos de *C. jejuni* posiblemente compartidos con otros patógenos como *C. coli*, *C. upsaliensis* y *C. fetus* (43, 45). En tal sentido, al tratarse de un sistema presente únicamente en la familia *Campylobacteraceae*, su uso como diana terapéutica limitaría el efecto perjudicial ejercido por los antimicrobianos dirigidos contra dicho sistema sobre el resto de la microbiota, a la vez que permitiría su uso para el tratamiento de infecciones provocadas por otros patógenos de la misma familia bacteriana (10).

La expresión de CprRS parece estar autorregulada y depende de la histidina quinasa CprS. Los genes codificantes para el sistema de regulación CprRS se encuentran próximos a los genes relacionados con la biogénesis de la envuelta celular *htrA* y *peb*, cuya expresión se encuentra regulada a su vez por el propio sistema CprRS (45). Todos estos genes regulados por CprR (*cprR*, *htrA* y *peb4*) contienen dos repeticiones invertidas de la secuencia diana en -10 *upstream* (45).

La proteína HtrA de *C. jejuni*, codificada por el gen *htrA*, es una serín proteasa periplásica que actúa también como una chaperona implicada en el mantenimiento y expresión de proteínas de la envoltura. Esta serín proteasa contribuye a la tolerancia al calor y al oxígeno, siendo además necesaria para la unión a proteínas celulares dada su implicación en la regulación de la expresión de proteínas de la envuelta (51). *C. jejuni* también secreta HtrA al medio extracelular (52) donde digiere proteínas de unión implicadas en la formación de uniones estrechas y adherentes, causando una distensión intercelular en la barrera epitelial intestinal y con ello permitiendo la transmigración de la bacteria por la vía paracelular. Todo ello favorece la migración a tejidos más profundos e incluso a los órganos, suponiendo un serio riesgo de bacteriemia y sepsis (23, 53).

La purificación de CprR recombinante permitiría su uso en el cribado de alto rendimiento de quimiotechas para la búsqueda de ligandos y posteriormente la evaluación de su potencial capacidad inhibitoria sobre la actividad biológica *in vitro* de CprR, identificando así compuestos con potencial actividad bactericida frente a *C. jejuni* siguiendo un enfoque similar al llevado a cabo por el Grupo de Investigación Traslacional en Patología Digestiva para los reguladores HrsA y ArsR de *H. pylori* (39).

2. OBJETIVOS

Objetivo General:

Producir por vía recombinante el regulador de respuesta esencial CprR de *Campylobacter jejuni* con un alto grado de pureza y en su conformación biológicamente activa.

Objetivos específicos:

- 1- Clonar y expresar por vía recombinante la proteína CprR de *C. jejuni* en *Escherichia coli*.
- 2- Purificar CprR recombinante mediante cromatografía de afinidad de unión a metales.
- 3- Estimar la actividad biológica de CprR mediante ensayos de retardo en gel.
- 4- Evaluar la capacidad inhibitoria de ligandos de bajo peso molecular sobre la actividad biológica *in vitro* de CprR.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas y condiciones de cultivo

En los experimentos descritos se emplearon dos cepas de *Escherichia coli*: *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21(DE3). La cepa *E. coli* DH5 α , permite la transformación con gran eficacia y se utilizó para el clonaje, amplificación y purificación de los vectores. La cepa *E. coli* BL21(DE3) permite la transformación con el vector y posterior sobreexpresión de la proteína de interés, con el sistema de inducción de la transcripción T7 RNA polimerasa-IPTG para el que fue diseñado el vector pET-28a empleado. Esta cepa contiene en su cromosoma la secuencia de la T7 RNA polimerasa regulada bajo el control del promotor *lacUV5* (reprimido por LacI e inducible por IPTG) y es deficiente en las proteasas OmpT y Lon, lo que contribuye a proteger a la proteína de interés de la degradación por proteasas (54). El medio de cultivo utilizado fue Luria Bertani (LB) constituido por 10 g/L NaCl, 10 g/L triptona y 5 g/L extracto de levadura. El medio LB sólido incluía además de lo anterior un 1,5 % de agar. Para los cultivos con bacterias transformadas con el plásmido con el gen de resistencia para kanamicina, el medio se suplementó con 50 μ g/mL de kanamicina (LBK). Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C y en el caso de los cultivos en medio líquido (caldo) se mantuvieron en agitación media (200-220 rpm).

Las características detalladas de cada cepa quedan recogidas en el Anexo Tabla 1. Las cepas utilizadas pertenecen al grupo de Investigación Traslacional en Patología Digestiva del IIS Aragón. Los reactivos utilizados en la preparación de los medios y disoluciones fueron adquiridos de PanReac AppliChem (España).

3.2. Producción de células quimiocompetentes por el método de CaCl₂

Se produjeron células *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes por el método de CaCl₂, con el objetivo de hacerlas susceptibles a incorporar DNA plasmídico mediante su transformación por el método de shock térmico. Para ello, se realizó una siembra por agotamiento de *E. coli* BL21(DE3) en una placa de LB sólido a partir de una alícuota conservada con un 10% (v/v) de glicerol y almacenada a -80°C. La placa se incubó *overnight* (O/N) a 37°C y pasado ese tiempo se tomaron colonias aisladas coincidentes en apariencia, inoculándolas en 10 mL de medio LB. El precultivo se incubó O/N a 37°C y 200 rpm. Posteriormente se inocularon con dicho cultivo 200 ml de LB caldo al 1% (v/v) y se incubaron en las mismas condiciones, hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0,35-0,45. Con el fin de detener el crecimiento bacteriano, el cultivo se mantuvo en hielo una vez alcanzada la DO deseada, con el objetivo de maximizar así la eficacia del proceso de transformación posterior.

Los cultivos se centrifugaron a 4.000 rpm, 15 min y 4°C, para separar las bacterias del medio de cultivo. Se retiró el sobrenadante y los *pellets* bacterianos fueron resuspendidos en 8 mL de *Buffer I* (14,2 g/L MgCl₂, 14,7 g/L CaCl₂ y 3,2 g/L acetato de sodio anhidro) cada uno. Tras ello, se recogió el volumen resultante en un único tubo que se sometió a otra centrifugación a 4.000 rpm, 15 min y 4°C para retirar el *Buffer I* y recolectar el *pellet*. Estas bacterias se resuspendieron en 3 mL de *Buffer II* (14,7 g/L CaCl₂ y 15% (v/v) glicerol) para su conservación. La suspensión celular se dividió en alícuotas de 150 μ L y estas se almacenaron a -80°C.

3.3. Clonaje del gen *cprR* en el vector pET-28a (+)

3.3.1. Amplificación del gen *cprR* mediante PCR de alta fidelidad

Para clonar el gen *cprR* (secuencia recogida en el Anexo Figura 1) es preciso realizar una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir del genoma de *C. jejuni* NCTC 11351. Se utilizó la *Pfu* DNA polimerasa (Biotools, EE. UU.), una polimerasa termoresistente y de alta fidelidad, debido a su actividad correctora de errores. La amplificación se llevó a cabo con *primers* específicos que incorporaban los sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI*, con el fin de poder llevar a cabo un clonaje direccional en el vector. La representación de los cortes cohesivos de ambas enzimas se

recoge en el Anexo Figura 2. La secuencia de los *primers*, junto con la temperatura de *melting* (T_m) y otros parámetros, vienen recogidos en el Anexo Tabla 2. La mezcla de reacción de la PCR aparece descrita en el Anexo Tabla 3. La amplificación se llevó a cabo usando el termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler*. El programa establecido para ello consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificación de 30 s a 95°C, 45 s de *annealing* a 50°C y 2 min de elongación a 72°C. Finalmente, se programó una última extensión de 5 min a 72°C. Para comprobar la correcta amplificación del gen *cprR* (a partir de ahora referido como *cprR-NdeI-SacI*, por incorporar los sitios de restricción para dichas enzimas en sus extremos) se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) con bromuro de etidio 1% (v/v), incluyendo como referencia para determinar el tamaño de la banda el patrón de peso Lambda DNA/*HindIII* Marker (Thermo Scientific, EE. UU.). El gel se sometió a una corriente de 90V durante 40 minutos, sumergido en *Buffer TBE* 1X. El resultado se analizó mediante el dispositivo *GelDoc 2000 Image Analyzer*. Se aisló *cprR-NdeI-SacI* con ayuda del kit comercial *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Cytiva, EE. UU.) siguiendo el protocolo para el aislamiento a partir de PCR, con la modificación de eluir la columna con agua miliQ estéril en lugar del *buffer* proporcionado. Tras la purificación, se determinó la concentración de DNA en el dispositivo de espectrofotometría micro-volumen *NanoVue PlusTM* (GE Healthcare, España), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

3.3.2. Transformación de *E. coli* DH5 α quimiocompetente

Para llevar a cabo el clonaje del gen en el vector, se precisa de cantidades suficientes del vector de expresión pET-28a (+). Para ello, se realizó una transformación de *E. coli* DH5 α con el vector pET-28a (+) (Novagen, Alemania). La secuencia y descripción del vector se puede encontrar en el Anexo Figura 3. Para el proceso de transformación con el plásmido, se tomó una alícuota de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes almacenada a -80°C a la que, tras descongelarse, se añadieron 200 ng del vector. Tras una incubación de 10 min en hielo, se sometieron las bacterias a un shock térmico a 42°C durante 90 s y se introdujeron 2 minutos en hielo. Posteriormente se adicionaron 800 μ L de medio LB a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C con agitación suave durante 1 hora. Esto permitió que las células se recuperasen del daño provocado y comenzasen a crecer y expresar el gen del plásmido que codifica para la enzima de resistencia a kanamicina (aminoglicósido fosfotransferasa). Tras la incubación se realizó una siembra con 150 μ L, en medio LBK (LB + 50 μ g/mL de kanamicina) sólido y se incubó a 37°C O/N. Pasado el tiempo de incubación, las colonias que crecieron fueron aquellas que habían adquirido el plásmido y la resistencia al antibiótico codificada en el mismo. Se inocularon 2-3 colonias en 10 mL de caldo LBK y fueron incubadas a 37°C y 200 rpm O/N. A partir del cultivo se realizó una purificación del vector mediante *Miniprep*, haciendo uso del kit comercial *Gen EluteTM Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, EE. UU.) con la modificación de llevar a cabo la elución del vector con agua miliQ en vez de la solución de elución, para evitar posibles interferencias de sus componentes en ensayos posteriores. La determinación de la concentración del vector pET-28a (+) se realizó por espectrofotometría con el dispositivo *NanoVue PlusTM* (GE Healthcare), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

3.3.3. Restricción enzimática del DNA y ligación

Con el vector pET-28a (+) y el producto de PCR *cprR-NdeI-SacI* purificados, se procedió a la digestión enzimática doble simultánea para un posterior clonaje direccional del amplicón en el vector. Para evitar la actividad inespecífica *star*, se hizo uso de las enzimas FastDigest *NdeI* y FastDigest *SacI* (ThermoFisher). El uso de dos sitios de restricción diferentes permite un clonaje direccional, evitando que en algunos clones la secuencia se insertase en sentido invertido. Una vez clonado el gen en el vector, el producto de transcripción dará lugar a una proteína que incorpora una cola de histidinas en N-terminal, permitiendo su purificación mediante cromatografía de afinidad de unión a metales. La digestión

preparativa se produjo con 4,45 µg de *cprR-NdeI-SacI*, 14 µL de agua miliQ estéril, 8 µL del *buffer FastDigest*, 4 µL de la enzima *FastDigest NdeI* y 4 µL de la enzima *FastDigest SacI* a 37°C durante 2 horas y después se introdujo en hielo para detener la restricción. La digestión del vector pET-28a (+) se produjo siguiendo el mismo procedimiento, empleando en este caso 5,45 µg del vector vacío purificado para la reacción.

Para comprobar la correcta digestión de *cprR-NdeI-SacI* y del vector pET-28a (+) se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) y del 0,8% (m/v) respectivamente, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.1 pero haciendo uso en este caso de tampón TAE 1X. El marcador Lambda DNA/*HindIII* Marker fue incluido como referencia. La banda correspondiente al vector pET-28a (+) linealizado con cortes en los sitios de restricción *NdeI* y *SacI* fue recortada y tanto esta como el amplicón *cprR-NdeI-SacI* fueron purificados mediante el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Cytiva), siguiendo el protocolo indicado por la empresa, pero eluyendo en el paso final con agua miliQ. La ligación de los productos de la digestión purificados se realizó empleando 4,45 µL *cprR-NdeI-SacI* digerido, 4 µL de pET-28a digerido, 2,5 U de T4 DNA ligasa (ThermoFisher) y 1 µL de *Buffer* de T4 DNA ligasa 10X (400mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100mM DTT y 5 mM ATP), incubándose 1 hora a 22°C y después manteniéndose O/N a 4°C para favorecer la ligación. En el Anexo Figuras 4 y 5 queda recogida una representación del proceso de ligación, así como del producto de ligación pET28a-CprR, respectivamente.

3.3.4. Transformación de *E. coli* DH5α quimiocompetente con el vector pET28a-CprR

A partir de una de las alícuotas de *E. coli* DH5α quimiocompetente conservada a -80°C se realizó una transformación por choque térmico con 5 µL del producto de ligación pET28a-CprR siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.2, pero centrifugando 2 min a 14.000 rpm tras la incubación de 1 hora, resuspendiendo el *pellet* en 100 µL de LB para concentrar las células y sembrando finalmente en medio sólido LBK, el cual se incubó O/N a 37°C.

3.3.5. Identificación de clones recombinantes

Se seleccionaron aleatoriamente 12 colonias de *E. coli* DH5α transformadas con el producto de ligación, y se sembraron de nuevo en placas de LBK sólido. Se realizó una PCR en colonia de 10 de ellas, tomando una pequeña cantidad, resuspendiendo cada una en 50 µL de agua miliQ estéril y sometiéndolas a una incubación a 95°C durante 10 min para lisar las células, liberar su contenido y desnaturalizarlas. Posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 14.000 rpm para retirar el *pellet* con los detritus celulares. El sobrenadante de cada una de las muestras se utilizó para amplificar por PCR el gen *cprR* con la *Taq* polimerasa a partir del vector. Se incluyó un control positivo con 1 µL de DNA cromosómico de *C. jejuni* NCTC 11351 como molde y un control negativo sustituyendo el DNA por agua miliQ estéril. La amplificación por PCR y la comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.1. La composición de las mezclas de PCR aparece indicada en el Anexo Tabla 4.

Se seleccionaron 4 clones que habían dado positivo para la presencia del gen *cprR* con el fin de obtener cantidades suficientes para los ensayos posteriores. Para ello se inocularon colonias de cada clon en 10 mL de medio LBK caldo y se incubaron O/N a 37°C y 200 rpm. A partir de los cultivos se purificaron los vectores por *Miniprep* haciendo uso del kit *Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit* con la modificación del protocolo indicada en el apartado 3.3.2. y se cuantificaron por espectrofotometría. Se llevó a cabo una nueva comprobación del clonaje mediante una PCR en las mismas condiciones que las descritas para la identificación de los clones recombinantes, incluyendo los marcadores de peso Lambda DNA/*HindIII* Marker y 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher).

3.3.6. Secuenciación de vectores

Los 4 vectores fueron enviados a secuenciar con el objetivo de comprobar la ausencia de mutaciones en la secuencia, así como el clonaje del gen en la dirección adecuada. Los vectores se enviaron con la concentración requerida a la empresa Secugen S.L. (España), realizándose la secuenciación por el método de Sanger y un análisis por electroforesis capilar. Para la secuenciación se hizo empleando *primers* específicos suministrados por la empresa, dirigidos a las secuencias T7 promotor y T7 terminador del vector pET-28a (+) que flanquean la secuencia codificante del gen de interés.

3.4. Expresión de CprR recombinante en *E. coli* BL21(DE3)

3.4.1. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Para analizar el contenido proteico bacteriano se realizó una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Para ello se polimerizó un gel separador al 15% de poliacrilamida (v/v) y sobre el mismo, un gel concentrador al 5% de poliacrilamida (v/v). Las composiciones aparecen indicadas en el Anexo Tabla 5. Las muestras se prepararon añadiendo la cantidad correspondiente de *Laemmli SDS Reducing Sample buffer 6X* (375 mM Tris-HCl/Tris Base, 9% (m/v) SDS, 50% (v/v) glicerol, 9% (v/v) 2-mercptoetanol y 0.075% (m/v) azul de bromofenol) para quedar a 1X. Despues las muestras se introdujeron en un termobloque a 95°C durante 10 minutos para su desnaturización térmica y se centrifugaron 3 min a 14.000 rpm para retirar los detritos celulares, quedando la proteína en la fracción soluble. Como patrón de peso molecular se incluyó *peqGOLD Protein Marker I* (VWR Chemicals, EE. UU.). El gel se sumergió en *Running buffer 1X* (5 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,7 mM SDS y 40 mM glicina) y se sometió a un amperaje constante de 35 mA. Una vez producida la migración de proteínas a través del gel, se retiró el gel concentrador y el gel separador se sumergió en la solución de tinción (0,05% (m/v) Coomassie Blue R-250, 45% (v/v) metanol y 6% (v/v) ácido acético glacial) con agitación suave durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se retiró la solución de tinción y se mantuvo en agitación 30 minutos sumergido en solución de destinción (10% (v/v) ácido acético glacial, 25% (v/v) metanol). Finalmente se renovó la solución de destinción y se mantuvo en agitación O/N.

3.4.2. Ensayos de sobreexpresión de CprR recombinante

Antes del cultivo en grandes volúmenes, se llevaron a cabo ensayos de sobreexpresión a una escala inferior, con el fin de determinar las condiciones más adecuadas de cultivo e inducción. Se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* BL21(DE3) con 2 µL del vector pET28a-CprR secuenciado siguiendo el protocolo de transformación descrito en el apartado 3.3.2. Tras el cultivo O/N se sembró un precultivo de 10 mL de medio LBK y se incubó a 37°C, 200 rpm O/N. Se inocularon cuatro precultivos de 10 mL con 300 µL del cultivo O/N y se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0,6-0,8$, que se corresponde con la fase exponencial tardía. Llegados a ese punto, se indujo la expresión de la proteína con 0,25 mM, 0,5 mM y 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido) dejando un control sin inducir y se mantuvieron a 37°C y 200 rpm durante 6 horas. Se extrajeron alícuotas de 1 ml de todos los cultivos previo a la inducción (t=0h) y tras las 6 horas de incubación (t=6h). Las alícuotas se centrifugaron 2 minutos a 14.000 rpm, se retiró el sobrenadante y los *pellets* se conservaron a -20°C. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4.1.

En segundo lugar, se llevó a cabo otro ensayo de sobreexpresión en el que se estudió la producción de proteína recombinante a diferentes tiempos tras la inducción con una concentración determinada de IPTG. Nuevamente, se siguió el protocolo anterior, pero con dos cultivos de 50 mL, hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0,6-0,8$. Uno de los cultivos se mantuvo como control sin inducir y el otro se indujo con IPTG a una concentración final de 1 mM. Se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 6 horas y después se mantuvieron O/N a 25°C y 200 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada uno antes de inducir, cada 2

horas hasta las 6 horas tras la inducción y al finalizar la incubación O/N. Las muestras se recolectaron y analizaron por SDS-PAGE según se ha descrito anteriormente en este apartado.

3.4.3. Producción de biomasa en *E. coli* BL21(DE3) sobreexpresando CprR

Para la producción de biomasa se llevó a cabo una transformación de *E. coli* BL21(DE3) con el vector pET28a-CprR de acuerdo con el protocolo del apartado 3.3.2. Se inocularon 5 precultivos de 10 mL de medio LBK y se incubaron a 37°C y 200 rpm O/N. Cada cultivo se utilizó para inocular sendos Erlenmeyer de 1L de LBK al 1% (v/v). Los cultivos se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar $DO_{600nm}=0,6-0,8$, momento en el que se indujo con 1 mM de IPTG, manteniéndose a 37°C y 200 rpm durante 6 horas. Se tomaron muestras por duplicado previo a la inducción y tras 6 horas, analizándolas posteriormente según se describe en el apartado 3.4.2.

Tras la incubación, el cultivo se centrifugó durante 15 min a 4°C y 14.000 rpm, se retiraron los sobrenadantes, se juntaron los *pellets* de todos los tubos de centrífuga y se lavaron con solución salina (0,85% NaCl). Tras el lavado, la biomasa se sometió a una centrifugación en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. La biomasa obtenida tras el procedimiento se pesó y se conservó a -20°C hasta la purificación.

3.5. Purificación de CprR mediante cromatografía afinidad a metales iónicos inmovilizados (IMAC)

3.5.1. Preparación de la columna de cromatografía

La columna la matriz *Chelating Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) se preparó inicialmente mediante un lavado con 10 V (volumen de matriz) de agua destilada a un flujo de 3 mL/min para retirar la solución de etanol en la que se conserva la matriz cromatográfica. Posteriormente se pasaron 5V de *Strip buffer* (0,5 M NaCl, 0,2 M EDTA pH 7) para retirar los restos de Ni^{2+} y proteínas que pudieran quedar en ella, seguidos de 3V de 0,5 M NaCl y 5V de agua destilada. Se desempaquetó la matriz y se lavaron con agua destilada la matriz y la columna de vidrio. Tras ello, se reempaquetaron 10 mL de matriz (1V) en la columna y se dejaron sedimentar. Con el fin de asociar la matriz a Ni^{2+} , se hicieron pasar 5V de una solución de $NiCl_2 \times 6H_2O$ 300 mM y se lavó con 10V de agua destilada para retirar el excedente de metal no unido a la matriz. Por último, se equilibró la columna exponiéndola a 10V de *Binding buffer* (50 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8).

3.5.2. Preparación del extracto crudo

Se descongeló en hielo la biomasa de *E. coli* BL21 (DE3) sobreexpresando CprR recombinante conservada a -20°C, y se le adicionaron 50 mL de *buffer* de lisis (*Binding buffer*, 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)). La adición de PMSF tiene el propósito de inhibir serín proteasas de la muestra, evitando la degradación de CprR. El dispositivo homogeneizador ultrasónico UP200s (Dr. Hielescher) se usó para lisar las células por sonicación en frío, con una amplitud del 90% y un valor de 0,5 de ciclo, realizando 12 ciclos de 30 segundos con pausas de 30 segundos entre ciclos. El lisado resultante se sometió a una centrifugación a 15.000 rpm durante 20 min y a 4°C para evitar la degradación. Se recuperó el sobrenadante del extracto crudo en el que se encontraba la proteína de interés y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones para eliminar posibles restos. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m con el fin de retirar otros componentes celulares de menor tamaño que puedan obstruir la columna.

3.5.3. Purificación mediante IMAC (*Immobilized metal ion affinity chromatography*)

El filtrado se cargó en la columna con un flujo de 2 mL/min para favorecer el contacto con la matriz. Se recogió el volumen muerto (*Flow-Through*), que contiene las proteínas que no han quedado unidas a la matriz. Con el objetivo de retirar proteínas de unión inespecífica, se realizó un primer lavado (lavado 1) con 10V de *Binding buffer*, un segundo lavado con 5V de *buffer* de lavado 2 (*Binding buffer*, 0,5 M

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) seguido de un tercer lavado (lavado 3) con 10V de *buffer* de lavado 3 (*Binding buffer*, 35 mM glicina), midiendo la absorbancia del excluido a 280 nm hasta alcanzar un valor inferior a 0,1. Los volúmenes de todos los lavados fueron también recolectados en frío y conservados a 4°C.

Para eluir la columna y así obtener la proteína CprR (retenida por la interacción específica con la matriz) se hizo uso de un gradiente de imidazol entre 10 y 1000 mM, que se consiguió gracias a un sistema de vasos comunicantes con agitación que contenía 30 mL de *Binding buffer* y 30 mL de (*Binding buffer*, 1M Imidazol, pH 8). El eluido fue recogido en 35 alícuotas de 1,5 mL y conservadas a 4°C. La matriz se regeneró mediante la introducción de 5V de *Strip buffer* y después 5 V de 0,5 M de NaCl y 5V de agua destilada. Se aplicaron 5V de etanol al 20% y se conservó a 4°C.

3.5.4. Selección de las fracciones de eluido

Con el fin de determinar qué fracciones tienen una mayor concentración y pureza de CprR, se realizó una SDS-PAGE de las alícuotas 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4.1 con la particularidad de que las muestras sólo se calentaron durante 3 min a 95°C y sin centrifugación posterior. Tras observar los resultados de la electroforesis, se llevó a cabo una nueva SDS-PAGE con las alícuotas 7-15 para estudiar el contenido de estas, y posteriormente juntar las fracciones con mayor concentración y pureza de CprR. Adicionalmente, con el fin de comprobar que el proceso de purificación se había producido de acuerdo con lo esperado, se realizó otra SDS-PAGE incluyendo: extracto crudo, *Flow-Through*, Lavado 1, Lavado 2, Lavado 3 y dilución 1:10 y 1:20 del *pool* de proteína purificada.

3.5.5. Diálisis

Con el fin de alterar la composición de la solución en la que se encuentra la proteína recombinante CprR eluida, la proteína se introdujo en una tripa de diálisis y se sometió a tres diálisis sucesivas en 3L de *buffer* de diálisis (50 mM Tris-Cl pH 8, 10% (v/v) glicerol, 300 mM NaCl, 1 mM DTT) a 4°C O/N y con agitación. La solución de proteína obtenida tras el procedimiento fue alicuotada y conservada a -20°C.

3.5.6. Cuantificación de proteína mediante espectrofotometría

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de espectrofotometría midiendo la absorbancia de la solución de proteína ya dializada a 280nm. Haciendo uso de la ley de Beer-Lambert y del coeficiente de extinción molar teórico para CprR recombinante con cola de histidinas ($\epsilon_{280\text{nm}}=17880 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), se pudo realizar una determinación aproximada de la concentración proteica. Los parámetros teóricos de la proteína recombinante y su secuencia se pueden encontrar en el Anexo Tabla 6 y en el Anexo Figura 6 respectivamente. Como blanco se utilizó el *buffer* de diálisis. Adicionalmente, se estudió el espectro UV-visible entre 250 y 700 nm para descartar la presencia de contaminantes.

3.5.7. Cuantificación de proteína mediante método de Bradford

El método de cuantificación de Bradford permite determinar la concentración de proteína con gran sensibilidad. Cuando el colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* se asocia a residuos de arginina y lisina del interior de una proteína, cambia su máximo de absorción de 465 nm a 595 nm, por lo que midiendo la absorbancia a 595 nm se puede determinar la concentración. Para poder cuantificar se establece una recta patrón con diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (55). Se utilizó el reactivo de Bradford comercial (PanReac AppliChem) y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Las muestras de proteína purificada se diluyeron y analizaron según el mismo protocolo. Como patrón, se utilizaron muestras de 0-10 µg de BSA con 1 ml de reactivo. Todas las muestras se prepararon por duplicado y se midieron a los 10 minutos.

3.6. Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de CprR recombinante mediante EMSA

3.6.1. Producción de las secuencias diana *PcprR* y *PhtrA*

Una vez purificada la proteína, es necesario determinar si conserva la actividad biológica. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de retardo en gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA), estudiando la capacidad de unión del regulador de respuesta a las secuencias de DNA del promotor del gen *cprR* (*PcprR*) y del promotor del gen *htrA* (*PhtrA*), ambos regulados por CprR (45). Los promotores diana se obtuvieron mediante PCR a partir del DNA genómico de *C. jejuni*. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento de 150 kb de la secuencia del gen *pKn22* de *Anabaena* sp. PCC1720 que se amplificó a partir del genoma de este. Las secuencias y parámetros de los oligonucleótidos aparecen indicados en el Anexo Tabla 7. Las mezclas de reacción para la amplificación por PCR aparecen en el Anexo Tabla 8. La amplificación por PCR, el análisis del resultado mediante electroforesis en gel de agarosa y la purificación de los productos obtenidos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.1. Las temperaturas de hibridación para estas PCR fueron: 43°C para *PcprR*, 45°C para *PhtrA* y 53°C para *pKn22*.

3.6.2. Ensayo de retardo en gel (EMSA)

El ensayo de retardo en gel (EMSA) permite observar la unión específica del regulador transcripcional *in vitro* a una determinada secuencia. Dicho fenómeno se detecta al producirse un retraso en el avance de la banda en el gel, actuando como indicador de la actividad biológica de la proteína recombinante purificada. El ensayo se realizó en un gel de poliacrilamida al 8% (v/v) cuya composición está recogida en el Anexo Tabla 9. Antes de cargar las muestras, los geles se precorren a 60V durante 30 min con *Running buffer* (25 mM Tris, 190 mM glicina, pH 8) a 4°C, lo que permite equilibrar el gel en el tampón de electroforesis y orientar las cargas de este. En este caso, no se trata de un gel desnaturalizante dado que resulta esencial que la proteína mantenga su conformación nativa y biológicamente activa.

Cada muestra está formada por 120 ng del promotor diana (*PcprR* o *PhtrA* en cada caso), 120 ng del DNA inespecífico que actúa como competidor, *buffer* de unión 1X (10 mM bis-Tris pH 7,5, 40 mM KCl, 5% (v/v) glicerol, 50 mg/L BSA, 1 mM DTT) y diferentes concentraciones de CprR recombinante, para un volumen final de 20 µL. Adicionalmente, se incluye una muestra control a la que no se adiciona proteína, para poder determinar la migración del DNA libre y compararla con el complejo DNA-proteína. Las muestras para cada una de las condiciones a estudiar se prepararon siguiendo la composición descrita en el Anexo Tabla 10 y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la interacción entre la proteína y el DNA diana. Tras la incubación y adición de *Loading Buffer* 1X, se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó sumergiendo en *Running buffer* 1X (1 mM bis-Tris pH 7,5, 4 mM KCl, 0,5% (v/v) glicerol) y aplicando una corriente de 90 V durante 155 min a 4°C. Los resultados del EMSA se visualizaron en el dispositivo *GelDoc 2000 Image Analyzer* tras incubar el gel durante 30 min en *Running Buffer* 1X con un 0,1% (v/v) de SYBRSafe 10.000X con agitación lenta en oscuridad.

3.6.3. Ensayos de inhibición de CprR recombinante *in vitro*

Tras comprobar que la proteína purificada mantiene su actividad biológica *in vitro*, se decidió estudiar la capacidad inhibitoria de algunos compuestos de bajo peso molecular que habían resultado efectivos inhibiendo la unión al DNA de otros reguladores transcripcionales empleados como dianas terapéuticas por el grupo de investigación. Estos compuestos fueron flavonoides naturales (crisina y apigenina), antihipertensivos de tipo dihidropiridinas (nimodipino, nisoldipino) y dos compuestos de naturaleza química diversa sin uso farmacológico aprobado por la FDA (compuesto V y XII). Para este ensayo, se siguió el procedimiento del EMSA descrito en el apartado 3.6.2, utilizando el promotor *PhtrA* y una concentración fija de CprR 3 µM, establecida como la concentración óptima según el ensayo anterior. Se adicionó cada compuesto a sendas muestras para una concentración final de 2 mM, 1 mM y 0,5 mM

y se incluyeron dos controles sin compuesto, uno con el DNA diana y la proteína y otro con el DNA diana, pero sin proteína. La composición de las muestras aparece detallada en el Anexo Tablas 11 y 12.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Clonaje del gen *cprR* de *C. jejuni* en el vector pET-28a (+)

Para la amplificación del gen *cprR* de *C. jejuni* se llevó a cabo una PCR de alta fidelidad con la *Pfu* DNA polimerasa. Se hizo uso de *primers* específicos que incluían sitios de restricción para poder llevar a cabo posteriormente el clonaje direccional y así se obtuvo el producto de amplificación (*cprR-NdeI-SacI*, 692 pb) con los sitios de corte incorporados flanqueando la secuencia codificante. En el gel de agarosa se identificó la banda correspondiente a *cprR-NdeI-SacI* observando la migración con respecto al marcador de peso molecular y siendo esta la única banda tras la amplificación, lo que descarta la presencia de productos inespecíficos de amplificación. Tras la purificación de *cprR-NdeI-SacI* siguiendo el protocolo del apartado 3.3.1, la cuantificación estimó que la muestra se encontraba a una concentración de 178 ng/μL, una concentración adecuada para los ensayos a realizar.

El vector pET-28a (+) y el producto de la amplificación *cprR-NdeI-SacI* se sometieron a una digestión simultánea doble con las enzimas FastDigest *NdeI* y FastDigest *SacI*. Tras la digestión, se realizaron dos electroforesis en gel de agarosa para comprobar que no se había producido una digestión inespecífica, a pesar de que en teoría las enzimas de restricción comerciales del tipo FastDigest carecen de actividad *star* en las condiciones en las que se utilizaron.

En el Anexo Figura 7 A) se aprecia la banda propia de *cprR-NdeI-SacI* digerido en los sitios de cortes específicos que flanquean la secuencia y que este mantiene la integridad por completo, sin que existan fragmentos correspondientes a cortes inespecíficos por parte de las enzimas de restricción. No obstante, esta técnica no permite discernir entre un fragmento sin digerir, con solo un corte o un fragmento doblemente digerido, siendo este último el de interés.

En el Anexo Figura 7 B) se puede observar que para el vector pET-28a (+) también existe una única banda bien definida, lo cual indica la ausencia de cortes inespecíficos asociados con la aparición de más bandas. Cabe destacar que, al utilizarse un marcador de peso molecular constituido por fragmentos lineales, el avance en el gel no se correspondería con el peso molecular si el vector estuviera circularizado. En tal sentido, el vector en su forma superenrollada migraría más rápido y no se podría asociar su avance al peso molecular con el del patrón de peso molecular referido. Por lo tanto, se puede interpretar que el vector ha sido linealizado correctamente, dado que el avance en el gel sí se corresponde con el número de bases que lo constituyen y no aparecen otras bandas. Además, tampoco se puede apreciar la presencia del vector sin digerir, de lo que se infiere que la digestión de este ha sido completa. Sin embargo, no es posible diferenciar entre los vectores que presentan uno o ambos cortes. Por otra parte, cabe mencionar que, a pesar de no apreciarse ninguna banda correspondiente al vector no linealizado, no conviene utilizar el producto de la reacción de digestión para la ligación directamente. Esto se debe a que incluso cantidades inapreciables de vector que hayan quedado sin digerir mostrarán una eficacia de transformación tan alta comparada con el vector digerido que comprometerían la eficiencia de esta ligación. Como consecuencia, resultó necesario aislar la banda correspondiente al vector digerido recortándolo en el gel de agarosa y purificándolo como se describe en el apartado 3.3.3. Tras la digestión se produjo la ligación del vector y el gen con la enzima T4 DNA ligasa. Los fragmentos de *cprR-NdeI-SacI* y el vector pET-28a (+) doblemente digeridos se aparean gracias a los extremos cohesivos dejados por las enzimas. De este modo, la DNA ligasa une los extremos y da lugar al vector pET28a-CprR con el gen incorporado. En las bacterias transformadas con el vector clonado, la expresión de CprR recombinante está regulada por un sistema de represión-inducción doble mediado por el inductor IPTG, evitando un goteo de la expresión.

La mezcla de ligación se usó para la transformación de *E. coli* DH5 α quimiocompetente siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.4 para obtener colonias con el vector pET28a-CprR incorporado. Al sembrar en un medio selectivo con kanamicina (LBK) se produce el crecimiento de las colonias que hayan incorporado el vector que les otorga resistencia frente a este antibiótico, no obstante, no se puede diferenciar *a priori* si contienen el gen de interés o solo el vector recircularizado. Por ello, se llevó a cabo una siembra de 12 colonias en una nueva placa, con el fin de obtener clones adicionales de cada una de las colonias seleccionadas. Posteriormente se realizó una PCR en colonia de 10 de los clones para comprobar la presencia del gen.

Se seleccionaron aleatoriamente 4 de los clones positivos para sembrar precultivos y realizar una *Miniprep* de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.3.2, con el fin de amplificar y aislar los vectores de cada uno de los 4 clones mediante una PCR previa a la secuenciación. Como se puede apreciar en el Anexo Figura 8, se produjo la amplificación de los 4 clones cuyo vector había sido aislado por *Miniprep*. Además, como se puede observar en dicha figura, la ausencia de una amplificación en el control negativo demuestra que la amplificación en los carriles 3-6 se debe efectivamente a la incorporación del gen *cprR* en los vectores recombinantes pET28a-CprR (procedentes de los clones 1-4). El marcador 100 pb DNA Ladder permite identificar que la banda gruesa e intensa se corresponde con el gen de interés. En el gel se aprecian también otras bandas de baja intensidad con un avance inferior al correspondiente a la banda más intensa que resulta de la amplificación. Esto se debe posiblemente a la presencia del molde pET28a-CprR, el cual toma diferentes conformaciones al presentar diversos grados de superenrollamiento y en consecuencia diferentes avances. La intensidad de estas bandas indica una concentración baja de dichas formas. Sin embargo, no se puede descartar el hecho de que pudieran ser el resultado de una amplificación inespecífica, si bien de ser así carecerían de relevancia dada la presencia y mayor intensidad de la banda que confirma el clonaje del vector.

Los 4 vectores recombinantes: pET28a-CprR clon1, pET28a-CprR clon2, pET28a-CprR clon 3 y pET28a-CprR clon 4, se enviaron a secuenciar a un servicio externo. La secuenciación con frecuencia no puede resolver correctamente algunos nucleótidos, por lo que es preferible secuenciar las hebras del gen en sentido directo y reverso. De esta forma, si algún nucleótido no queda bien resuelto se puede estudiar la secuencia de la hebra complementaria para comprobar si existe una mutación. El clon 2 presentaba una identidad de secuencia total con el gen *cprR* original, tanto en la hebra directa como en la reversa, por lo que no se había producido ninguna mutación durante el proceso de clonaje. El alineamiento de secuencias obtenido para el clon 2 mediante ClustalW se muestra en el Anexo Figura 9. Para el clon 4, en la hebra directa no había ninguna mutación por lo que se podría asumir que la secuencia se encontraba conservada íntegramente. Sin embargo, estos datos no se pueden confirmar dado que en la secuenciación de la hebra reversa no se obtuvieron resultados, quizás por una degradación de la muestra durante el envío. En los clones 1 y 3 se detectó una mutación silente (*silent mutation*) que no implicaba cambio de sentido, es decir, el codón seguiría codificando para el mismo aminoácido, pero no se considera adecuado para continuar con el clonaje. Las mutaciones se deben posiblemente a defectos en la polimerización y actividad correctora de errores de la *Pfu* DNA polimerasa utilizada para amplificar el gen. Teniendo en cuenta los resultados de la secuenciación de los 4 clones, se optó por proceder con el clon 2, al carecer de mutaciones en la secuencia codificante de la proteína recombinante. Como se ha comprobado en la secuenciación, el clonaje direccional permite que el gen se incorpore en la dirección adecuada y el uso de extremos cohesivos para el fragmento amplificado y el vector facilitan la adecuada incorporación del inserto, al producirse un apareamiento por complementariedad entre los extremos. Además, esto evita que el vector se recircularice sin incorporar el inserto, al presentar cortes de dos enzimas incompatibles, y aumenta considerablemente la eficiencia de ligación, garantizando la correcta incorporación del gen en la orientación deseada, lo cual no resulta cierto si se utilizan enzimas que generen extremos romos.

4.2. Expresión de CprR recombinante en *E. coli* BL21(DE3)

Uno de los ensayos de expresión realizados consistió en evaluar la concentración de IPTG óptima para la inducción de la expresión de la proteína recombinante. Se tomaron alícuotas tanto del control como de los cultivos inducidos y se realizó una SDS-PAGE para poder inferir la concentración más adecuada. Como se puede observar en la Figura 3, en el control a las 6 horas con respecto al tiempo 0, se aprecia un incremento general en la intensidad de las bandas, lo cual se asocia a una mayor cantidad de proteínas totales en la muestra, ocasionada a su vez por el crecimiento bacteriano. En las muestras inducidas, se aprecia como el crecimiento bacteriano es ligeramente inferior, debido a que los recursos de las células se encuentran dirigidos a la producción de la proteína recombinante. Con respecto a las condiciones a estudiar, la expresión de CprR parece mantenerse de forma similar en todas concentraciones de IPTG evaluadas.

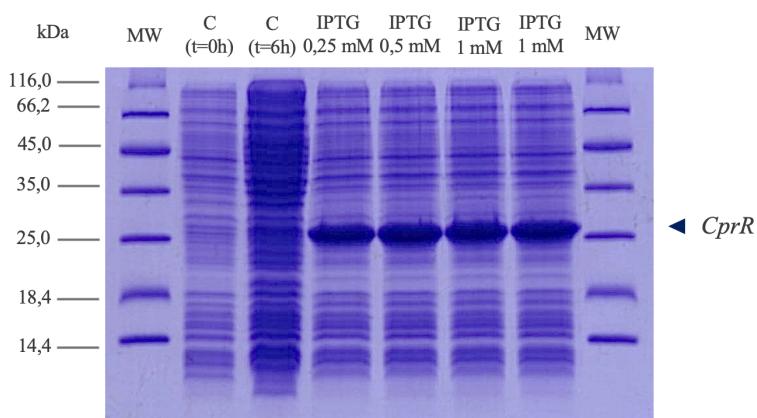


Figura 3. SDS-PAGE del ensayo de sobreexpresión induciendo la expresión de proteína con diferentes concentraciones de IPTG. Gel de poliacrilamida al 15% (v/v) teñido con Azul de Coomassie. MW: Patrón de pesos *peqGOLD Protein Marker I*. Las muestras corresponden a los controles sin inducir a tiempo 0, tras 6 horas y a las muestras inducidas con 0,25-1 mM de IPTG a las 6 horas de la inducción. La flecha señala el peso correspondiente a CprR.

Teniendo en cuenta la variabilidad asociada al ensayo, se optó por la inducción a 1mM para continuar con los ensayos, al ser la concentración estándar empleada habitualmente en este tipo de ensayos de expresión por el grupo de investigación. La banda de CprR recombinante se identifica por su masa molecular teórica de 27,65 kDa, mostrando un avance semejante pero ligeramente inferior a la banda del patrón de pesos correspondiente a 25 kDa.

Otro de los ensayos que se llevó a cabo para optimizar las condiciones de la sobreexpresión para la producción de la proteína recombinante consistió en determinar el tiempo de inducción con el que se obtenía una mayor cantidad de proteína, induciendo a una concentración de 1mM de IPTG. En la Figura 4 se aprecia como la expresión de la proteína se va incrementando con el tiempo de cultivo, al observarse un aumento en el grosor e intensidad de la banda correspondiente a CprR recombinante. Para la incubación O/N resultó necesario realizar una dilución 1/3 para poder observar el resultado adecuadamente, por lo que la expresión de la proteína es en realidad 3 veces superior a lo mostrado en el gel. Esto parece indicar que el cultivo durante tiempos prolongados produce grandes cantidades de proteína. Sin embargo, la sobreexpresión a las 6 horas de inducción resultaba suficiente para la obtención de altas concentraciones de la proteína, por lo que no resultaba necesario realizar la sobreexpresión O/N.

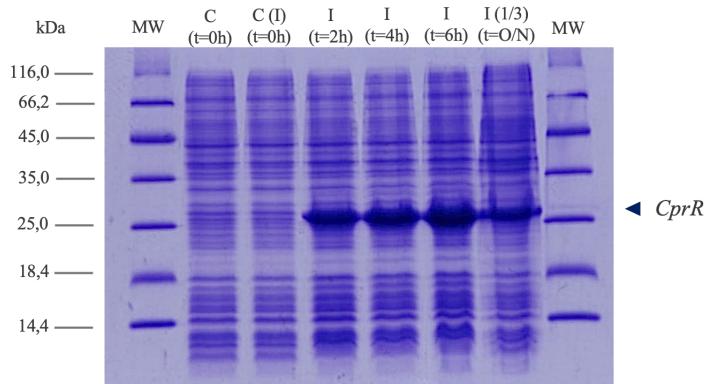


Figura 4. SDS-PAGE del ensayo de sobreexpresión a distintos tiempos tras la inducción con IPTG a 1 mM. Gel de poliacrilamida al 15% (v/v) teñido con Azul de Coomassie. MW: Patrón de peso *peqGOLD Protein Marker I*. Las muestras corresponden al control sin inducir y al cultivo pasadas 0, 2, 4, 6 horas y O/N tras la inducción. La flecha señala el peso correspondiente a CprR.

4.3. Producción de biomasa en *E. coli* BL21(DE3) sobreexpresando CprR recombinante

Con el fin de comprobar que se produjo la sobreexpresión de la proteína durante la producción tras la inducción con 1 mM IPTG, se tomaron alícuotas de los Erlenmeyer de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.4.3, al alcanzar la $DO_{600\text{ nm}}$ apropiada para la inducción y tras 6 horas de incubación a 200 rpm y 37°C. Como se puede apreciar en la Figura 5, tras las 6 horas de inducción (t=6 h), se observa una banda de gran intensidad a la altura aproximada de 27 kDa que se corresponde con la sobreexpresión de CprR recombinante, la cual no está presente antes de la inducción (t=0 h). Se puede inferir, por tanto, que el sistema que regula la expresión funciona correctamente dado que no ha habido una producción apreciable de la proteína previa a la inducción. Los resultados prueban a su vez la eficacia del sistema de expresión tanto en la represión como en la inducción, tal y como se había visto en los ensayos a menor escala. Esto resulta beneficioso para la sobreexpresión de la proteína de interés porque una expresión de la proteína desde el inicio podría afectar negativamente al crecimiento de la bacteria y por consiguiente al diseño del experimento.

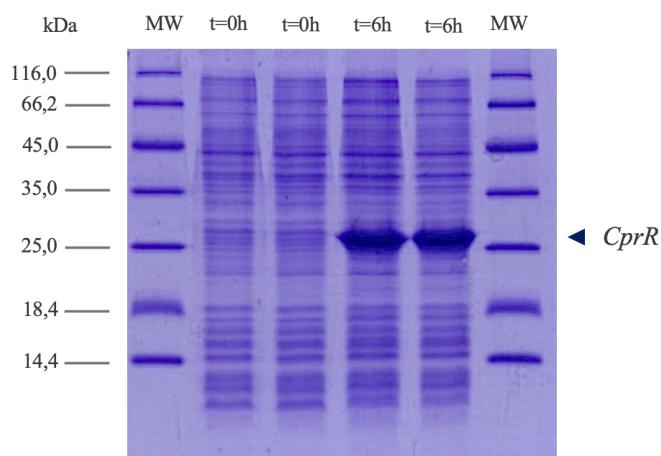


Figura 5. SDS-PAGE del ensayo de producción de biomasa para comprobar la sobreexpresión de CprR antes de la inducción con 1 mM de IPTG y tras 6 horas. Gel de poliacrilamida al 15% (v/v) teñido con Azul de Coomassie. MW: Patrón de peso *peqGOLD Protein Marker I*. La flecha señala el peso correspondiente a CprR.

4.4. Purificación de CprR recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales iónicos inmovilizados (IMAC)

4.4.1 Purificación mediante IMAC

Para poder aislar la proteína CprR recombinante de la biomasa de *E. coli* BL21(DE3) producida en la sobreexpresión, se hizo uso de una cromatografía de afinidad a metales iónicos inmovilizados (IMAC). Esto es posible gracias al His-tag (cola de histidinas) que contiene la proteína en la región N-terminal y que ha sido incorporada por el vector pET-28a (+). El metal utilizado para inmovilizar en la columna fue Ni^{2+} dado que entre los diferentes metales que se pueden utilizar para esta técnica, este muestra una gran afinidad y un alto rendimiento en la purificación. El Zn^{2+} constituiría otra opción viable siendo además más selectivo, lo que permite eliminar más contaminantes, pero también implica que el rendimiento de obtención de la proteína de interés sería menor. La elección de uno sobre el otro viene determinada principalmente por el uso que le vayamos a dar a la proteína purificada (56).

Para la purificación por IMAC se preparó y cargó el lisado bacteriano filtrado en la matriz cromatográfica ya acondicionada. Tras su introducción se recogió el volumen de *Flow-Through* para su posterior análisis. Se sometió la columna a 3 lavados, un lavado inicial con *Binding buffer*, un segundo lavado con *buffer* de lavado 2 (*Binding buffer*, 0,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y un tercer lavado con *buffer* de lavado 3 (*Binding buffer*, 35mM glicina). El propósito de estos es retirar de la columna proteínas del extracto que se mantienen unidas de forma inespecífica a la matriz con una baja afinidad. Finalmente, la elución se realizó con un gradiente de imidazol de 10 a 1000 mM, por el cual el imidazol compite con la proteína y desplaza la interacción con la matriz, provocando su separación y elución. El volumen eluido se recogió en 35 fracciones y con el objetivo de estudiar el proceso de elución, la pureza y concentración de proteína, se llevó a cabo una SDS-PAGE cargando las fracciones eluidas 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35. El resultado obtenido se muestra en la Figura 6 A). Como se puede observar en esta figura, se ve como la elución de la proteína sobreexpresada ocurre de forma más significativa en torno a las fracciones 10-15, apreciándose en ellas una banda muy intensa correspondiente a CprR recombinante y terminando en torno a la fracción 25. Las fracciones posteriores presentan concentraciones considerablemente inferiores y por ello se descartaron, evitando así una dilución de la proteína que habría resultado contraproducente en comparación con la cantidad de CprR obtenida de estas fracciones.

Con el fin de recabar más información con respecto a la elución para la selección de las alícuotas que se iban a incluir, se llevó a cabo otra SDS-PAGE en la que se analizaron las alícuotas 7 a la 15 (Figura 6 B) donde aprecia como la elución comienza a ser notable a partir de la alícuota 9. Teniendo en cuenta los resultados de ambos geles, se realizó un *pool* de las alícuotas 5-25 para recuperar la mayor cantidad de la proteína posible y con una elevada concentración.

El *pool* de alícuotas seleccionadas se introdujo en una tripa de diálsis y se sometió a una diálsis en 3L de *buffer* de diálsis a 4°C. Se realizaron dos cambios de *buffer* para disminuir la concentración de imidazol y NaCl, incluyendo DTT como un agente reductor para mantener reducidas las cisteínas de la proteína; y glicerol, que aporta estabilidad y evita la agregación y precipitación de la proteína provocadas por una concentración elevada de la misma. La concentración de NaCl se redujo a 300 mM para mantener una fuerza iónica lo suficientemente alta. Durante todo el proceso no se observó precipitación de la proteína, ni en el *pool* de eluido ni tras la diálsis, lo que contribuyó al mantenimiento de un rendimiento de purificación elevado.

En la Figura 6 se pueden observar, además de la banda correspondiente a la proteína sobreexpresada, otras bandas de intensidad reducida. Se ha comprobado en otros trabajos por secuenciación que estas bandas se corresponden con proteínas de *E. coli* que contienen regiones ricas en histidinas, lo que provoca un comportamiento semejante al de la proteína de interés durante la purificación por IMAC (57, 58). Las proteínas que se han aislado de forma inespecífica en este caso son despreciables dado que el propósito de la CprR purificada es utilizarse en EMSA y en el cribado de alto rendimiento

principalmente, para lo cual se necesitan concentraciones de proteína en el orden de μM o nM . Esto supone emplear diluciones de la proteína purificada a las que las proteínas inespecíficas aisladas quedan reducidas hasta concentraciones despreciables que no afectan a la consecución de los ensayos. De ser necesario para técnicas que precisen de grados de pureza superiores, como la cristalografía de rayos X, se podrían añadir técnicas adicionales al protocolo como por ejemplo una cromatografía de exclusión molecular basada en los diferentes tiempos de retención de las proteínas presentes en función del tamaño molecular.

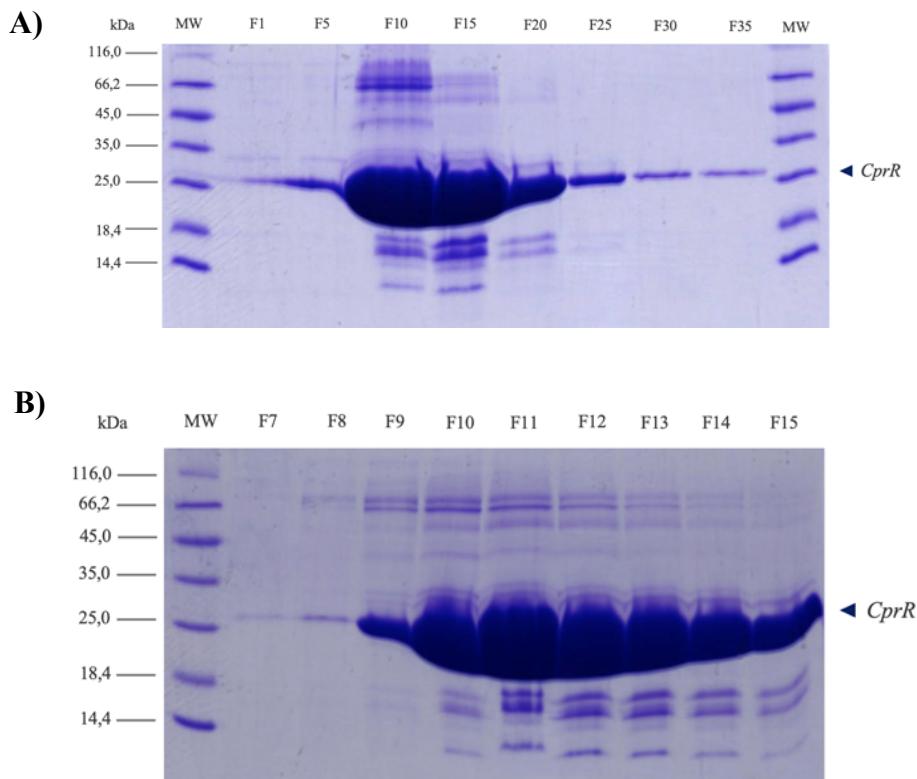


Figura 6. SDS-PAGE de las fracciones eluidas en el proceso de purificación de CprR para identificar las fracciones que contienen la proteína CprR recombinante. Gel de poliacrilamida al 15% (v/v) teñido con Azul de Coomassie. MW: Patrón de pesos *peqGOLD Protein Marker I*. **A)** Fracciones eluidas 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35. **B)** Fracciones eluidas 7-15. La flecha señala el peso correspondiente a CprR.

Para comprobar el correcto desarrollo del proceso de purificación, se realizó una SDS-PAGE cargando muestras representativas de los volúmenes almacenados previamente a 4°C. Como se puede observar en la Figura 7, el extracto crudo que se cargó inicialmente en la columna muestra una gran cantidad de la proteína CprR, así como del resto de proteínas solubles propias de *E. coli* BL21(DE3). En el *Flow-Through* o volumen muerto, se comprueba que la proteína, gracias a su His-tag, queda retenida específicamente en la matriz cromatográfica. Es posible que parte de la proteína CprR producida no haya quedado retenida en la matriz, pero igualmente no se aprecia una banda significativa correspondiente a CprR. Aunque parece despreciable, se ha de considerar también que existe la posibilidad de que haya otras proteínas solubles bacterianas de un peso molecular semejante que contribuyan a intensificar el grosor de la banda. En el primer lavado (L1) se produjo la eliminación hasta cierto punto de las proteínas unidas con una baja afinidad, gracias al imidazol en bajas concentraciones que compite con ellas. El lavado 2 no produjo una eliminación notable de contaminantes. Sin embargo, en el lavado 3, la glicina fue más efectiva para retirar proteínas retenidas de forma inespecífica. No se

produjeron en ningún caso pérdidas notables de la proteína recombinante con los lavados. Las muestras de proteína purificada diluida a 1:10 y 1:20, respaldan la observación de que la purificación se ha producido de forma óptima.

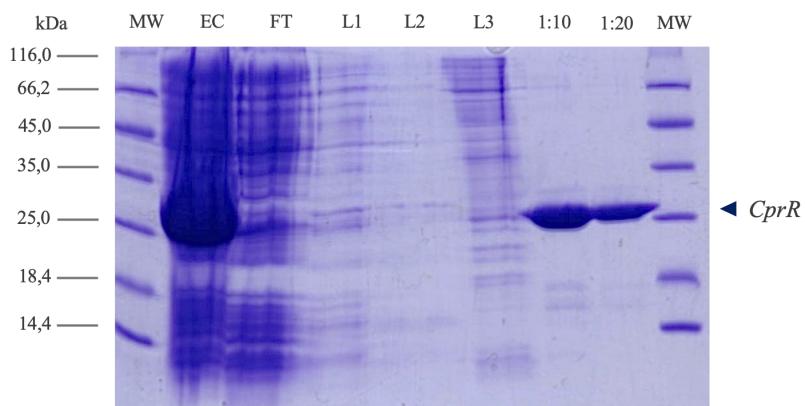


Figura 7. SDS-PAGE para el seguimiento del proceso de purificación de CprR. Gel de poliacrilamida al 15% (v/v) teñido con Azul de Coomassie. MW: Patrón de pesos *peqGOLD Protein Marker I*. EC: Extracto crudo. FT: *Flow-Through* (Volumen muerto). L1-L3: Lavados 1 a 3. 1:10 y 1:20: CprR obtenido tras la purificación diluido 1/10 y 1/20 respectivamente. La flecha señala el peso correspondiente a CprR.

4.4.2. Cuantificación de proteína mediante espectrofotometría

Haciendo uso de la ley de Beer-Lambert, el coeficiente de extinción molar teórico para CprR recombinante y el valor de la absorbancia a 280 nm (Abs = 0,702), se obtuvo un valor de concentración aproximada en la solución de proteína dializada de 392,62 μ M. Como se aprecia en el Anexo Figura 10, en el barrido entre 250 nm y 700 nm, se detecta un pico a 280 nm correspondiente a la absorbancia de la proteína. No se observa ningún otro pico a otra longitud de onda, descartando la presencia de grupos prostéticos que podrían deberse a una contaminación por otros tipos de proteínas. Teniendo en cuenta la concentración y la masa molecular teórica de 27654.71 Da para la proteína CprR recombinante, la concentración estimada de proteína es de 10,86 mg/mL en el volumen recuperado tras la diálsis.

4.4.3. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford

Al interpolar las diluciones en la recta patrón realizada con concentraciones conocidas de BSA, se obtuvo una concentración proteica de 13,85 mg/mL. Este valor difiere ligeramente con la medida obtenida por espectrofotometría midiendo a una longitud de onda de 280 nm. La espectrofotometría nos permite realizar una primera determinación para conocer el rango de concentración en el que nos encontramos; sin embargo, los valores de concentración de proteína obtenidos por el método de Bradford son mucho más precisos. Teniendo en cuenta la cuantificación de la proteína, se han obtenido 318,5 mg de proteína total con un rendimiento de purificación de 46,17 mg proteína/g biomasa, tal y como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de purificación de CprR recombinante mediante el protocolo empleado en este trabajo.

Biomasa (g)	Concentración de proteína (μ M)	Concentración de proteína (mg/mL)	Volumen tras diálsis (mL)	Cantidad de proteína (mg)	Rendimiento purificación (mg proteína /g de biomasa)
6,9	500,8	13,85	23	318,5	46,17

4.5. Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de CprR recombinante mediante EMSA

4.5.1. Ensayo de retardo en gel (EMSA)

La determinación de la actividad biológica del regulador transcripcional esencial CprR recombinante se llevó a cabo mediante un ensayo de retardo en gel (EMSA). Este ensayo permite comprobar *in vitro* que la proteína conserva su actividad biológica, siendo capaz de unirse a secuencias diana de promotores de genes cuya expresión regula *in vivo*, en este caso en *C. jejuni*. La unión de la proteína a la secuencia de DNA que reconoce de forma específica supone la formación de un complejo CprR-DNA estable, lo cual se puede observar en una electroforesis nativa como un retraso en la migración del fragmento de DNA acomplejado en comparación con ese mismo fragmento de DNA libre (no unido a proteína), debido a su mayor peso molecular. Para comprobar que la formación del complejo DNA-proteína se produce por el reconocimiento específico de una secuencia diana en un fragmento de DNA como es el promotor de un gen controlado por ese regulador transcripcional, se incorpora un fragmento de DNA competidor inespecífico al ensayo. Si el fragmento también experimenta un retraso en el avance, no se podría confirmar que la formación del complejo con el promotor se debe a un reconocimiento específico de la proteína, y por lo tanto el resultado carecería de validez.

En el ensayo se utilizaron como promotores para el reconocimiento específico los promotores de los genes *cprR* y *htrA* de *C. jejuni* (*PcprR* y *PhtrA*, respectivamente), cuya expresión se ha demostrado que está regulada *in vivo* por CprR (45). Como DNA competidor inespecífico se incluyó el fragmento *pKn22* de *Anabaena* sp. PCC1720. En la Figura 8 A) y B) se puede apreciar cuál es la migración experimentada por el DNA libre para cada uno de los promotores, al no añadirse el regulador transcripcional CprR (0 μ M).

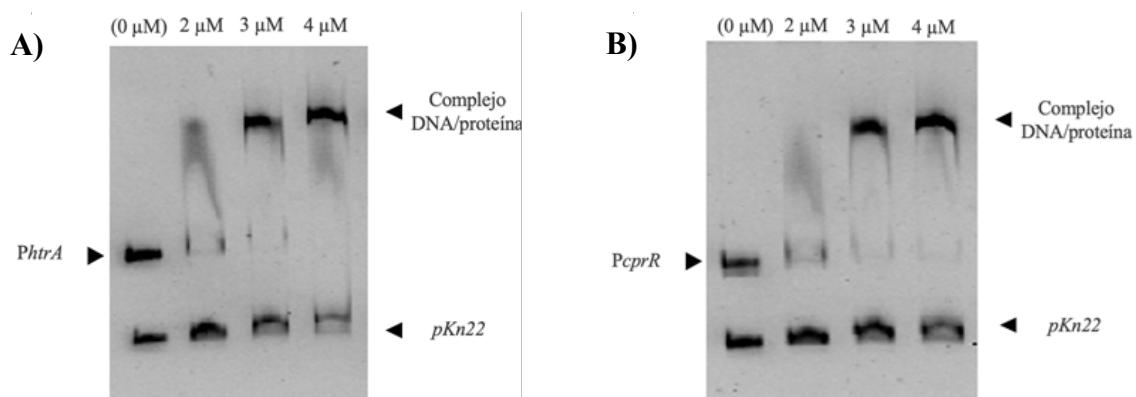


Figura 8. Ensayo de retardo en gel (EMSA) para la evaluación de la actividad biológica *in vitro* del regulador transcripcional CprR. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. En todos los casos se añadieron 120 ng de DNA específico (promotor diana) e inespecífico (*pKn22*) y una concentración de CprR creciente de 0 a 4 μ M **A)** Ensayo de retardo en gel con el promotor *PhtrA* **B)** Ensayo de retardo en gel con el promotor *Pcprr*.

A una concentración de 2 μ M de CprR, se forma un complejo prácticamente con la totalidad del promotor diana, tanto *Pcprr* como *PhtrA*, mostrando un retraso en la migración del DNA debido a la unión específica de CprR al promotor y al consecuente aumento del peso molecular del complejo. Por su parte, el DNA competidor no muestra interacción inespecífica a estas concentraciones de proteína. Por tanto, la formación del complejo DNA/proteína detectado por el retraso de la banda sirve como indicador de que la proteína conserva su actividad biológica. Al no afectar al DNA competidor, corrobora la unión específica a la secuencia diana en los promotores de los genes que regula. El DNA competidor tampoco se ve notablemente afectado a 3 μ M de CprR. No obstante, teniendo en cuenta la

disminución en intensidad de la banda correspondiente a *pKn22* con 4 μ M de CprR se deduce que, además del reconocimiento específico del DNA diana, a estas concentraciones se produce cierta unión inespecífica con *pKn22*. Esto se debe probablemente a la elevada concentración de la proteína empleada, por lo que concluimos que la concentración óptima de CprR recombinante a emplear para estos ensayos es de 3 μ M.

4.5.2. Ensayos de inhibición *in vitro*

En los ensayos de inhibición se evaluó la capacidad de los compuestos V, XII, crisina, apigenina, nimodipino y nisoldipino de inhibir la capacidad de unión al DNA *in vitro* del regulador transcripcional CprR recombinante. En las condiciones del ensayo, si el compuesto inhibe la actividad biológica del regulador, no se forma el complejo proteína/DNA y por lo tanto no se produce retraso en la migración electroforética. Si la inhibición no es completa debido a una concentración insuficiente del inhibidor, parte de la población de proteína CprR queda libre y será capaz de unirse y producir cierto retraso en la migración de la banda.

En la Figura 9 se puede apreciar la migración del DNA libre en el control negativo y el retraso de la banda por la formación del complejo en presencia de CprR en el control positivo. En la Figura 9 A) se observa como los compuestos V y XII producen una inhibición de la capacidad de unión al DNA de CprR a 2 mM, al no producirse un retraso de la movilidad. Sin embargo, concentraciones 1 mM y 0,5 mM resultan insuficientes para lograr una inhibición total de la actividad, resultando en cierto retraso de la banda en comparación con el control positivo. En el caso de los compuestos crisina y apigenina, en la Figura 9 B), se observa como la crisina, a las concentraciones evaluadas no actúa como inhibidor, mientras que la apigenina logra inhibir completamente la actividad del regulador transcripcional a las tres concentraciones ensayadas, impidiendo la formación del complejo CprR/*PhtrA*. Las dihidropiridinas nimodipino y nisoldipino no afectaron a la actividad biológica *in vitro* de CprR en ninguna de las concentraciones ensayadas (ver Anexo Figura 11).

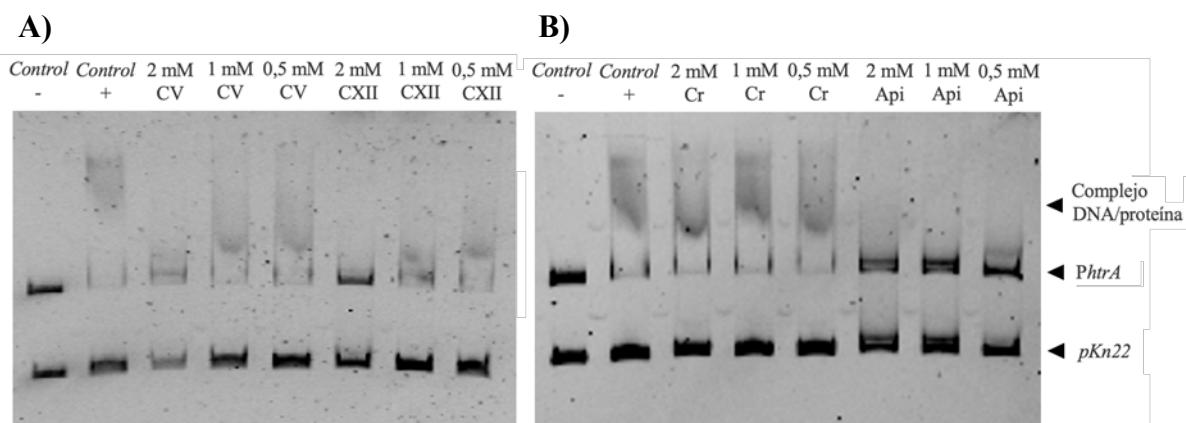


Figura 9. Ensayo de retardo en gel (EMSA) para la evaluación de la capacidad inhibitoria de algunos compuestos sobre la actividad biológica *in vitro* del regulador transcripcional CprR. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. En todos los casos se añadieron 120 ng de DNA específico (promotor diana) e inespecífico (*pKn22*), el Control – contiene DNA sin proteína y el resto de muestras incluyen el regulador CprR a una concentración de 3 μ M **A)** Ensayos de retardo en gel en presencia del compuesto V (CV) y compuesto XII (CXII) a concentraciones de 2 a 0,5 mM. **B)** Ensayos de retardo en gel en presencia del compuesto crisina (Cr) y apigenina (Api) a concentraciones de 2 a 0,5 mM.

5. CONCLUSIONES

1. El clonaje del gen *cprR* de *C. jejuni* NCTC 11351 en el vector pET-28a (+) y su expresión en *E. coli* BL21(DE3) permitió altos niveles de sobreexpresión de CprR recombinante en estado soluble en el citoplasma, tras la inducción con IPTG.
2. La purificación mediante cromatografía de afinidad de unión a metales (IMAC) empleando Ni^{2+} como metal inmovilizado y dializando en presencia de 10% de glicerol permitió la obtención de la proteína CprR recombinante con un alto grado de pureza y alta solubilidad en el tampón empleado.
3. Los ensayos de retardo en gel (EMSA) de CprR recombinante frente a promotores diana demostraron que la proteína fue expresada, purificada y conservada en su conformación nativa, preservando su actividad de unión al DNA.
4. La unión de CprR recombinante a su promotor diana *PhtrA* resultó inhibida sensiblemente con la presencia de al menos 0,5 mM del flavonoide apigenina, y en menor medida en presencia de los compuestos de bajo peso molecular V y XII. Las dihidropiridinas nimodipino y nisoldipino y el flavonoide crisina no inhibieron la actividad biológica *in vitro* de CprR en el rango de 0,5 a 2 mM.

CONCLUSIONS

1. Cloning of the *C. jejuni* NCTC 11351 *cprR* gene into pET-28a (+) vector and its expression in *E. coli* BL21(DE3) yielded high overexpression levels of recombinant CprR in a soluble state in cytoplasm, after induction with IPTG.
2. Purification with Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) using Ni^{2+} as immobilized metal and dialyzing in the presence of 10% glycerol allowed the recombinant CprR protein to be obtained with a high degree of purity and high solubility in the buffer used.
3. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) of recombinant CprR against target promoters proved that the protein was expressed, purified and conserved in its native conformation, preserving its DNA binding activity.
4. Binding of recombinant CprR to its target promoter *PhtrA* was significantly inhibited in the presence of at least 0,5 mM of the flavonoid apigenin and, to a lesser extent, in the presence of low molecular weight compounds V and XII. The dihydropyridines nimodipine and nisoldipine and the flavonoid chrysin did not inhibit the *in vitro* biological activity of CprR in the range of 0,5 to 2 mM.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Facciola A, Riso R, Avventuroso E, et al. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. *J Prev Med Hyg.* 2017; 58(2): 79-92.
- 2- Young VB, Mansfield LS. *Campylobacter* infection – clinical context. En: Ketley, J.M., and Konkel, M.E. (eds). *Campylobacter, Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience; 2005: 1–12.
- 3- Helms M, Simonsen J, Re Mølbak K. Foodborne Bacterial Infection and Hospitalization: A Registry-Based Study. *Clin Infect Dis.* 2006. p. 498-506.
- 4- Black RE, Levine MM, Clements ML, et al. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis.* 1988; 157: 472–79.
- 5- CDC (US. Centers for Disease Control and Prevention). CDC. *Campylobacter* Infection (Campylobacteriosis). Disponible en: <https://www.cdc.gov/campylobacter/hcp/clinical-overview/index.html>
- 6- Oren A, Garrity GM. Valid publication of the names of forty-two *phyla* of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021; 71(10).
- 7- Waite DW, Vanwonterghem I, Rinke C, et al. Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to epsilonbacteraeota. *Front Microbiol.* 2017; 8.
- 8- Young KT, Davis LM, DiRita VJ. *Campylobacter jejuni*: Molecular biology and pathogenesis. Vol. 5, *Nat Rev Microbiol.* 2007. p. 665-79.
- 9- García-Sánchez L, Melero B, y Rovira J. *Campylobacter* in the Food Chain. *Adv Food Nutr Res.* 2018; 86: 215–252.
- 10- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal.* 2023; 21(12): 19-30.
- 11- Ziganshin RH, Ivanova OM, Lomakin YA, et al. The pathogenesis of the demyelinating form of Guillain-Barré syndrome (GBS): Proteopeptidomic and immunological profiling of physiological fluids. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(7):2366–78.
- 12- Schwerer B. Antibodies against gangliosides: a link between preceding infection and immunopathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Microbes Infect.* 2002; 4(3): 373–384.
- 13- Esan OB, Pearce M, van Hecke O, et al. Factors Associated with Sequelae of *Campylobacter* and Non-typoidal *Salmonella* Infections: A Systematic Review. *EBioMedicine.* 2017; 15: 100–11.
- 14- Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, et al. Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After *Salmonella* or *Campylobacter* Gastroenteritis. *Gastroenterology.* 2009; 137(2): 495–501.
- 15- Kusulja M, Santini M, Margetic K, et al. Meningitis caused by *Campylobacter jejuni*: A case presentation and literature review. *Acta Clin. Belg.* 2021; 76(4): 318–23.
- 16- Hessulf F, Ljungberg J, Johansson PA, et al. *Campylobacter jejuni*-associated perimyocarditis: Two case reports and review of the literature. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1).
- 17- Alemka A, Corcionivoschi N, Bourke B. Defense and adaptation: the complex inter-relationship between *Campylobacter jejuni* and mucus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 15.
- 18- Hermans D, Van Deun K, Martel A, et al. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet. Res.* 2011; 42(1): 82.
- 19- Bronowski C, James CE, Winstanley C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett.* 2014; 356(1): 8-19.
- 20- Artursson K, Schelin J, Thisted Lambertz S, et al. Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. *Int J Food Microbiol.* 2018; 284: 120-7.

- 21- Pumtang-on, Pongthorn, Timothy J. et al. A Systematic Review of *Campylobacter jejuni* Vaccine Candidates for Chickens. *Microorganisms*. 2021; 9(2): 397.
- 22- Murray PR, Rosenthal KS y Pfaller MA. *Microbiología médica*. 7^a ed. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 280-3.
- 23- Heimesaat MM, Backert S, Alter T, et al. Molecular Targets in *Campylobacter* Infections. *Biomolecules*. 2023; 13(3): 409.
- 24- Meunier M, Guyard-Nicodème M, Dory D, et al. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *J Appl Microbiol*. 2016; 120(5): 1139-73.
- 25- Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingerden B, et al. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother*. 1991; 27(2): 199-208.
- 26- Iovine NM. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*. Taylor and Francis Inc. 2013; 4(3): 230-40.
- 27- Velázquez JB, Jiménez A, Chomón B, et al. Incidence and transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother*. 1995; 35(1): 173-8.
- 28- Karmali MA, De Grandis S, Fleming PC. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* with special reference to resistance patterns of Canadian isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981; 19(4): 593-7.
- 29- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(3): 318-27.
- 30- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance Atlas of infectious Diseases. *Campylobacter jejuni*. Disponible en: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- 31- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). EUSR on AMR in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2020/2021. 2023. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-summary-report-antimicrobial-resistance-zoonotic-and-indicator-7>
- 32- Park M, Kim J, Feinstein J, et al. Development of Fluoroquinolone Resistance through Antibiotic Tolerance in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Spectr*. 2022; 10(5): 1667-22.
- 33- Eppinger M, Baar C, Raddatz G, et al. Comparative analysis of four Campylobacteriales. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(11): 872-85.
- 34- Hirakawa H, Kurushima J, Hashimoto Y, et al. Progress overview of bacterial two-component regulatory systems as potential targets for antimicrobial chemotherapy. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(10): 635.
- 35- Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J Mol Biol*. 2016; 428(19): 3752-75.
- 36- Huynh TN, Stewart V. Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol Microbiol*. 2011; 82(2): 275-86.
- 37- Gahamanyi N, Song DG, Mboera LEG, et al. Insights into the Virulence of *Campylobacter jejuni* Associated with Two-Component Signal Transduction Systems and Single Regulators. *Microbiol. Res*. 2022; 13(2): 188-200.
- 38- Tiwari S, Jamal SB, Hassan SS, et al. Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Front Microbiol*. 2017; 8: 1878.
- 39- González A, Casado J, Gündüz MG, et al. 1,4-Dihydropyridine as a Promising Scaffold for Novel Antimicrobials Against *Helicobacter pylori*. *Front Microbiol*. 2022; 13: 874709.

- 40- González A, Casado J, Lanas Á. Fighting the Antibiotic Crisis: Flavonoids as Promising Antibacterial Drugs Against *Helicobacter pylori* Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 709749.
- 41- González A, Casado J, Chueca E, et al. Small Molecule Inhibitors of the Response Regulator ArsR Exhibit Bactericidal Activity against *Helicobacter pylori*. *Microorganisms.* 2020; 8(4): 503.
- 42- González A, Casado J, Chueca E, et al. Repurposing Dihydropyridines for Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Pharmaceutics.* 2019; 11(12): 681.
- 43- Svensson SL, Davis LM, MacKichan JK, et al. The CprS sensor kinase of the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* influences biofilm formation and is required for optimal chick colonization. *Mol Microbiol.* 2009; 71(1): 253–72.
- 44- Raphael BH, Pereira S, Flom GA, et al. The *Campylobacter jejuni* response regulator, CbrR, modulates sodium deoxycholate resistance and chicken colonization. *J Bacteriol.* 2005; 187(11): 3662–70.
- 45- Svensson SL, Hyunh S, Parker CT, et al. The *Campylobacter jejuni* CprRS two-component regulatory system regulates aspects of the cell envelope. *Mol Microbiol.* 2015; 96(1): 189–209.
- 46- Ziprin RL, Young CR, Byrd JA, et al. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis.* 2001; 45(3): 549-57.
- 47- Eucker TP, Konkel ME. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell Microbiol.* 2012; 14(2): 226-38.
- 48- Tegtmeier N, Sharafutdinov I, Harrer A, et al. *Campylobacter* Virulence Factors and Molecular Host-Pathogen Interactions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2021; 431: 169-202.
- 49- Konkel ME, Talukdar PK, Negretti NM, et al. Taking Control: *Campylobacter jejuni* Binding to Fibronectin Sets the Stage for Cellular Adherence and Invasion. *Front Microbiol.* 2020; 9: 11: 564.
- 50- Tram G, Day CJ, Korolik V. Bridging the Gap: A Role for *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Microorganisms.* 2020; 8(3): 452.
- 51- Brøndsted L, Andersen MT, Parker M, et al. The HtrA protease of *Campylobacter jejuni* is required for heat and oxygen tolerance and for optimal interaction with human epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(6): 3205-12.
- 52- Sharafutdinov I, Tegtmeier N, Müsken M, et al. *Campylobacter jejuni* Serine Protease HtrA Induces Paracellular Transmigration of Microbiota across Polarized Intestinal Epithelial Cells. *Biomolecules.* 2022; 12(4): 521.
- 53- Backert S, Boehm M, Wessler S, et al. Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Commun Signal.* 2013; 11: 72.
- 54- Merck. Sigma-Aldrich. BL21(DE3) Competent Cells – Novagen. Disponible en: <https://www.sigmapellicular.com/ES/es/product/mm/69450m>
- 55- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- 56- Merck. Sigma-Aldrich. Optimizing Purification of Histidine-Tagged Proteins. Disponible en: <https://www.sigmapellicular.com/ES/es/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-purification/optimizing-purification-of-histidine-tagged-proteins>
- 57- Sanz Asensio L. Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología: Clonaje, expresión recombinante, purificación y evaluación de la actividad biológica del regulador de respuesta esencial CosR de *Campylobacter jejuni*. Universidad de Zaragoza; 2022.
- 58- Morán Martínez J. Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología: Expresión recombinante, purificación y evaluación de la actividad biológica de proteínas bacterianas de interés biotecnológico. Universidad de Zaragoza; 2018.

7. ANEXOS

Tabla 1. Características de las cepas comerciales *Escherichia coli* DH5α y *Escherichia coli* BL21(DE3)

Cepa	Genotipo	Casa comercial	Utilidad
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ φ80lacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, m^{k+}) phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen (EE.UU.)	Clonaje
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F, <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> , (rB-, mB+), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3)	Novagen (EE. UU.)	Sobreexpresión de la proteína recombinante

5' -
ATGACAAATATTCTTATGATAGAAGACGATTTAGAATTAGCAGAAATTACAGCTGAATATTGGAAAATTGATATGAAAGT
TGATATAGCTCATGAGCCTTATATAGGTCTTCTAAGCTTGCTTAAAGAATATCAGCTTATCATTAGCACCTTTCTTG
CAGGGCTTGTAGGGCTTGAAGTGTGAAGAGATTGTAAGGAGATTGATACACCTATTATTCAAGTGAAGACATGAT
ATTACAGATAAGGTTAATGCTTATGAGCTTGGAGCAGATGATTCTACCAAAACCTTATAATCAGACATTACAAGCAG
TATTAAAAGTCATTAGACGTATTCAAATACAAAAGGCCATAGCAAAAGTGTAAAAGATCTTGTGTTATGATCAATATA
AGCATATTATTACCATGAAAGGACAAGAGCTTACTTAACTATGCTGAATTGATATTAAAGCTATTGATTAAAAAGAG
GGTGGAGTGGTAAGTCGTGAAGAGCTGTTATAATTGTTCTATTAGTGGAGATTCTAGCAATAAAAGTATAGACGTTAT
TATTAGTAGAATTGTCAAAAGATGGGAGATGATCCAAAATCCAAATATTCACTCTACGTGGAATAGGTTATAAGC
TTACTCAATGA-3'

Figura 1. Secuencia codificante del gen *cprR* (*cj1227c*) de *C. jejuni* ATCC 33560 / NCTC 11351 (675 pb). National Center for Biotechnology Information (NCBI).



Figura 2. Representación de los sitios de corte y del corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI*

Tabla 2. Secuencia y características de los oligonucleótidos (*primers*) utilizados para la amplificación del gen *cprR*.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	T _m (°C)	Longitud (nucleótidos)	Contenido en GC (%)	Tamaño del amplicón (pb)
<i>cprR sense</i>	5'GGAATTC CATATG ACAAATAT TCTTATGATAGAAGACG-3'	55,0	38	32,0	679
<i>cprR antisense</i>	5'C GAGCTC TATTGAGTAAGCT TATAACC-3'	53,0	28	43,0	

Marcado en azul en el *cprR sense* se puede encontrar el sitio de corte de la enzima de restricción *NdeI*. Resaltado en verde en el primer *cprR antisense* se indica el sitio de corte de la enzima *SacI*.

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción de PCR de alta fidelidad para la amplificación del gen *cprR* produciendo *cprR-NdeI-SacI*.

Mezcla de reacción PCR alta fidelidad	
Componentes	Volumen (μ L)
H ₂ O miliQ estéril	37,5
Buffer 10X (con MgCl ₂)	5
dNTPs	1
<i>Sense primer cprR</i> 10 μ M	1,5
<i>Antisense primer cprR</i> 10 μ M	1,5
DNA genómico <i>C. jejuni</i> (82 ng/ μ L)	2
<i>Pfu</i> DNA polimerasa	1,5
Volumen final	50 μL

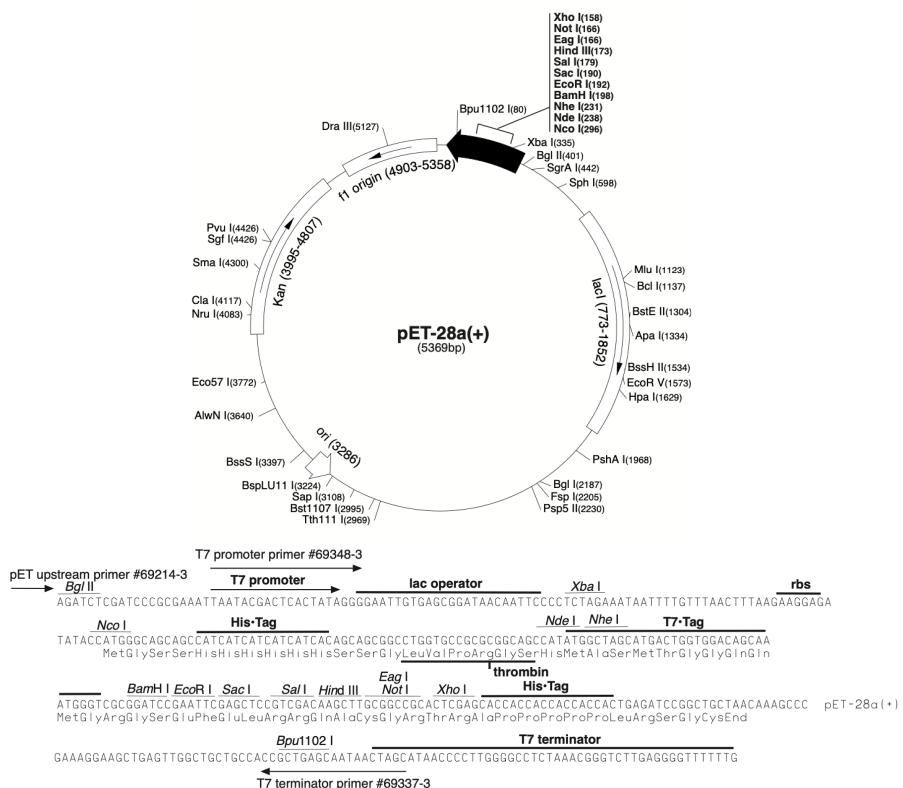


Figura 3. Mapa del vector pET-28a (+) (5369 pb) de Novagen. El vector cuenta con un gen de resistencia a kanamicina (indicado como *Kan*) codificando para aminoglicósido fosfotransferasa. Se encuentra también el origen de replicación (*ori*) que permite la replicación en *E. coli*. Contiene el gen codificando para LacI, regulador transcripcional del operón Lac que impide la transcripción hasta la inducción con alolactosa (artificialmente con IPTG). Se asocia al operador lac (*lac operator*) también indicado en la secuencia. LacI también reprime la expresión la T7 RNA polimerasa que actúa sobre la expresión del gen de interés. Presenta origen de replicación f1 (*f1 origin*) del fago M13 para la producción de DNA monohebra. El vector contiene una región *Multiple Cloning Site* (MCS) con sitios únicos de corte de las enzimas de restricción. Aparece indicado el *Ribosome Binding Site* (RBS) y la secuencia codificante para la cola de histidinas (His-Tag) en N-terminal y C-terminal para aislar en la purificación. Codifica también para el sitio de corte de la trombina (*thrombin*) que permitiría eliminar la cola de histidina de ser preciso y también la etiqueta T7 (*T7 Tag*). Contiene los promotores y terminadores de la transcripción *T7 promoter* y *T7 terminator* con utilidad para la secuenciación y para transcripción *in vitro* de la hebra directa o reversa.

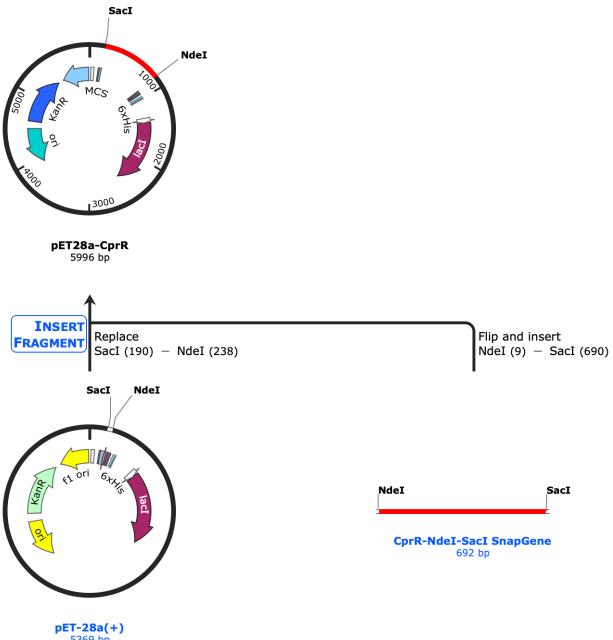


Figura 4. Representación del procedimiento de clonaje direccional del fragmento *cprR-NdeI-SacI* en el plásmido pET-28a (+) tras su digestión con las enzimas *NdeI* y *SacI*. Generado con SnapGene.

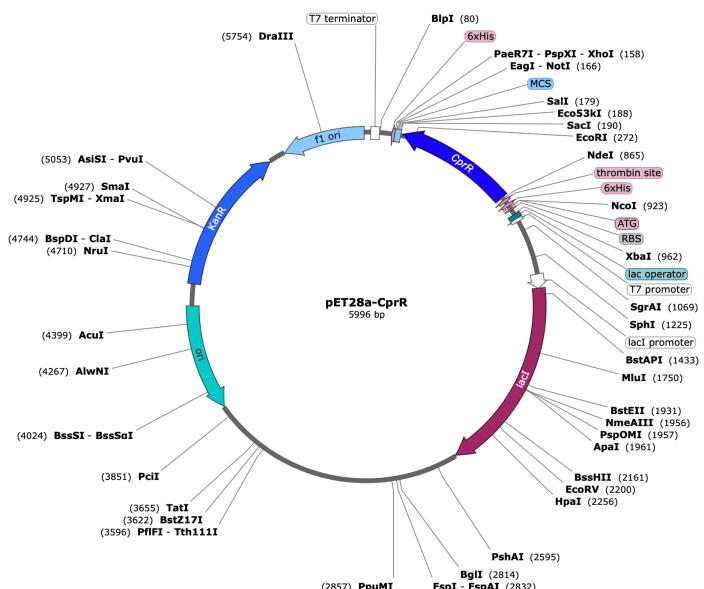


Figura 5. Representación del vector pET28a-CprR. La secuencia del gen *cprR* se encuentra clonada habiendo utilizado los sitios de restricción *NdeI* y *SacI*, dando lugar al vector recombinante que llevaría a la producción de la proteína recombinante CprR. La secuencia codificante de la proteína aparece como una flecha en azul oscuro y con el nombre del gen indicado (*cprR*). Se puede apreciar como el inicio de la secuencia viene precedido por el promotor de la transcripción T7 (T7 promoter), el Ribosome Binding Site (RBS), el codón de inicio de la traducción (ATG), cola de 6 histidinas (6xHis) y tras la secuencia codificante, el terminador de la transcripción del fago T7 (T7 terminator). Aparecen indicados todos los sitios de corte de enzimas de restricción comerciales. Representación del vector generada en SnapGene.

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción de PCR con *Taq* polimerasa para la amplificación del gen *cprR*.

Mezcla de reacción PCR	
Componentes	Volumen (μL)
H ₂ O miliQ estéril	18,85
Buffer 10X (con MgCl ₂)	2,5
dNTPs	0,75
Sense primer <i>cprR</i> 10 μM	0,7
Antisense primer <i>cprR</i> 10 μM	0,7
Vector purificado pET28a-CprR	1
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0,5
Volumen final	25 μL

En el caso de la PCR en colonia no se adicionó el vector pET28a-CprR purificado por Miniprep sino el sobrenadante tras la lisis de las colonias. El control negativo incluía H₂O miliQ en vez de sobrenadante y como control positivo se utilizó DNA genómico de *C. jejuni*.

Tabla 5. Composición de los geles SDS-PAGE separador y concentrador.

Componentes	Gel Separador 15%	Gel Concentrador 5%
	Cantidades para 1 gel	Cantidades para 1 gel
H₂O	0,71 mL	1,42 mL
TrisCl 1,5M pH 8,8	2,24 mL	0,25 mL
Acrilamida /Bisacrilamida 30%	3 mL	0,33 mL
SDS 10%	30 μL	10 μL
PSA 10%	20 μL	10 μL
TEMED	10 μL	10 μL

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas teóricas de la proteína recombinante CprR (incluyendo la cola de histidinas) calculadas por el programa Expasy ProtParam a partir de la secuencia de aminoácidos.

Parámetros	Valores His-CprR
Longitud	244 aa
Masa molecular (Da)	27654.71
Coeficiente de extinción molar (a 280 nm) (M⁻¹ cm⁻¹)	17880
Absorbancia (280 nm) a 1 mg/ml	0.647
Punto isoeléctrico teórico	6.31

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMTNILMIEDDLELAETAEYLEKFDMKVDIAHEPYIGLSKLA
LKEYQLIILDLSPGLDGLEVCEEIRKKYDTPIISSARHDITDKVNAELGADDYLPKPYNPKE
LQARIKSHLRRISNTKSAIAKSVKDLVYDQYKHIITMKGQELTLTNAEFDILSYLIKKEGGVVS
REELVYNCSSISEDSSNKSIDVIISRIRQKMGDDPKTPKYIHSIRGIGYKLTQ

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante CprR (contiene la cola de histidinas). Marcada en azul y subrayada, se encuentra la secuencia de aminoácidos conteniendo la cola de histidinas. Esta secuencia adicional la presenta incorporada la proteína recombinante al haberse expresado a partir del vector pET28a-CprR. La secuencia en letras de color negro es la de la proteína codificada en el genoma de *C. jejuni* ATCC 33560.

Tabla 7. Secuencia y características de los oligonucleótidos (*primers*) utilizados para la amplificación de promotores (*PcprR* y *PhtrA*) y la sonda inespecífica (*pKn22*).

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	T _m (°C)	Longitud (nucléotidos)	Contenido en GC (%)	Tamaño del amplicón(pb)
<i>PcprR</i> sense	5'-GGTCATGAGCTATATCAACTTTC-3'	47,0	24	38,0	334
<i>PcprR</i> antisense	5'-CTGGTTCCAAGAGGGTG-3'	45,0	18	56,0	
<i>PhtrA</i> sense	5'- GCCGTTGCAGTCGATTG-3'	47,0	18	61,0	365
<i>PhtrA</i> antisense	5'- CTAGCTAGGCGACGGTAAGC-3'	51,0	20	60,0	
<i>pKn22</i> sense	5'- CGGTCAAGCTGTACACGAGTCAG-3'	57,0	23	56,0	150
<i>pKn22</i> antisense	5'- GAACGCCATAGCCTACAGTAGGC-3'	56,0	23	56,0	

Tabla 8. Composición de la mezcla de reacción de PCR con *Taq* polimerasa para la amplificación de los promotores *PcprR/PhtrA/pKn22* para su uso en la evaluación de la actividad biológica de CprR recombinante y los ensayos de inhibición *in vitro*.

Mezcla de reacción PCR	
Componentes	Volumen (μL)
H ₂ O miliQ estéril	18,85
Buffer 10X (con MgCl ₂)	2,5
dNTPs	0,75
<i>Sense primer</i> <i>PcprR/PhtrA</i> 10 μM	0,7
<i>Antisense primer</i> <i>PcprR/PhtrA</i> 10 μM	0,7
DNA genómico <i>C. jejuni</i>	1
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0,5
Volumen final	25 μL

Para la amplificación de *pKn22* el DNA genómico de *C. jejuni* se sustituyó por el de *Anabaena* sp. PCC1720.

Tabla 9. Composición PAGE 8% poliacrilamida para evaluación de la actividad biológica y ensayos de inhibición *in vitro*.

Componentes	Gel Separador 15%
	Cantidades para 1 gel
H ₂ O	3,85 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	2,67 mL
25 mM Tris, 190 mM glicina, pH 8	2 mL
Glicerol 50%	1,4 mL
PSA 10%	50 μL
TEMED	30 μL

Tabla 10. Composición de las incubaciones en el EMSA para volumen final de 20 μ L (todos los volúmenes indicados en μ L).

Pocillo	Test	H ₂ O	Buffer (10X)	BSA (1 mg/ml)	DTT 10 mM	pKn22 120 ng/ μ L (120ng)	PcpR (101,5 ng/ μ L) (120ng)	CprR 20 μ M	Molaridad final CprR (μ M)
1	PcpR	12,93	2	1	2	0,89	1,18	0	0
2	PcpR	11,57	2	1	2	0,89	1,18	2	2
3	PcpR	10,97	2	1	2	0,89	1,18	3	3
4	PcpR	9,97	2	1	2	0,89	1,18	4	4

Pocillo	Test	H ₂ O	Buffer (10X)	BSA (1 mg/ml)	DTT 10 mM	pKn22 120 ng/ μ L (120ng)	PhtrA 120 ng/ μ L (120ng)	CprR 20 μ M	Molaridad final CprR (μ M)
1	PhtrA	12,15	2	1	2	0,89	1	0	0
2	PhtrA	11,75	2	1	2	0,89	1	2	2
3	PhtrA	11,15	2	1	2	0,89	1	3	3
4	PhtrA	10,15	2	1	2	0,89	1	4	4

Tabla 11. Composición de las diferentes condiciones en el ensayo de inhibición realizado con los posibles compuestos inhibidores de CprR, V y XII.

Pocillo	Test	H ₂ O	Buffer (10X)	BSA (1 mg/ml)	DTT 10 mM	pKn22 187,5 ng/ μ L (120ng)	PhtrA 120 ng/ μ L (120ng)	CprR 20 μ M	Compuestos inhibidores CV y CXII
1	PhtrA (control -)	13,36	2	1	2	0,64	1	0	0
2	PhtrA (control +)	10,36	2	1	2	0,64	1	3	0
3	PhtrA +2 mM CV	7,7	2	1	2	0,64	1	3	2,66
4	PhtrA +1 mM CV	9,04	2	1	2	0,64	1	3	1,32
5	PhtrA + 0,5 mM CV	9,7	2	1	2	0,64	1	3	0,66
6	PhtrA +2 mM CXII	8,25	2	1	2	0,64	1	3	2,11
7	PhtrA +1 mM CXII	9,31	2	1	2	0,64	1	3	1,05
8	PhtrA + 0,5 mM CXII	9,83	2	1	2	0,64	1	3	0,53

Tabla 12. Composición de las diferentes condiciones en el ensayo de inhibición realizado con los posibles compuestos inhibidores de CprR crisina (Cr), apigenina (Api), nimodipino (Nimo) y nisoldipino (Niso).

Poci llo	Test	H ₂ O	Buffer (10X)	BSA (1 mg/ml)	DTT 10 mM	pKn22 187,5 ng/µL (120ng)	PhtrA 120 ng/µL (120ng)	CprR 20 µM	Compuestos inhibidores Cr y Api
1	PhtrA (control -)	13,36	2	1	2	0,64	1	0	0
2	PhtrA (control +)	10,36	2	1	2	0,64	1	3	0
3	PhtrA +2 mM Cr	8,36	2	1	2	0,64	1	3	2
4	PhtrA +1 mM Cr	9,36	2	1	2	0,64	1	3	1
5	PhtrA + 0,5 mM Cr	9,86	2	1	2	0,64	1	3	0,5
6	PhtrA +2 mM Api	8,36	2	1	2	0,64	1	3	2
7	PhtrA +1 mM Api	9,36	2	1	2	0,64	1	3	1
8	PhtrA + 0,5 mM Api	9,86	2	1	2	0,64	1	3	0,5

Poci llo	Test	H ₂ O	Buffer (10X)	BSA (1 mg/ml)	DTT 10 mM	pKn22 187,5 ng/µL (120ng)	PhtrA 120 ng/µL (120ng)	CprR 20 µM	Compuestos inhibidores nimo y niso
1	PhtrA (control -)	13,36	2	1	2	0,64	1	0	0
2	PhtrA (control +)	10,36	2	1	2	0,64	1	3	0
3	PhtrA +2 mM nimo	7,09	2	1	2	0,64	1	3	3,27
4	PhtrA +1 mM nimo	8,72	2	1	2	0,64	1	3	1,64
5	PhtrA + 0,5 mM nimo	9,54	2	1	2	0,64	1	3	0,82
6	PhtrA +2 mM niso	7,33	2	1	2	0,64	1	3	3,03
7	PhtrA +1 mM niso	8,84	2	1	2	0,64	1	3	1,52
8	PhtrA + 0,5 mM niso	9,6	2	1	2	0,64	1	3	0,76

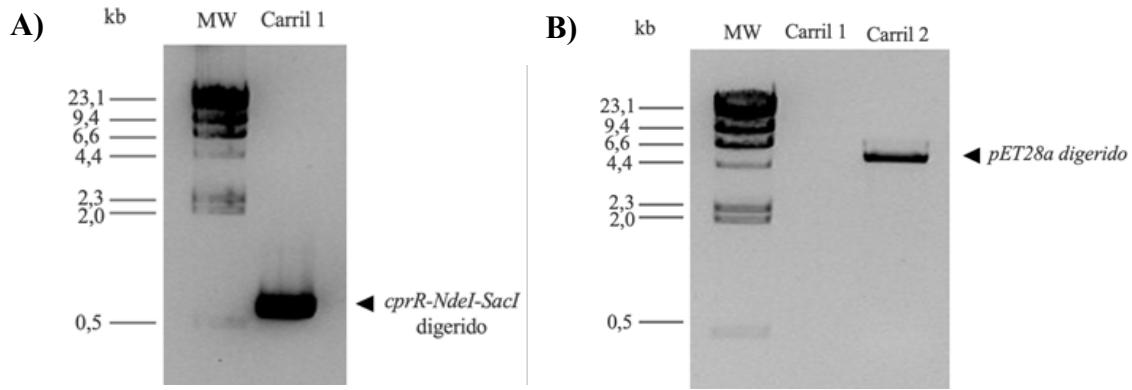


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA necesarios para el clonaje del gen *cprR* en el vector pET28a. A) Región codificante del gen *cprR* de *C. jejuni* NCTC 11351 amplificada por PCR y digerida con FastDigest *NdeI* y FastDigest *SacI*. B) Vector pET-28a digerido con FastDigest *NdeI* y FastDigest *SacI*. MW: Lambda/*HindIII*.

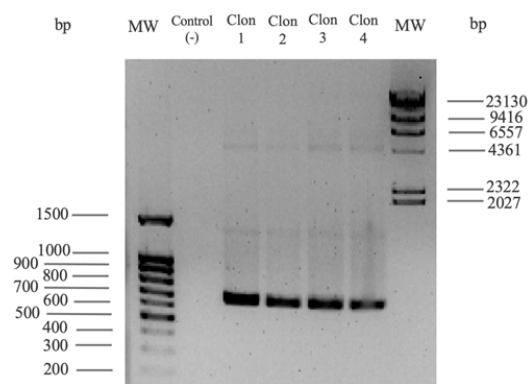


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los clones seleccionados transformados con pET28a-CprR (clon 1-4) purificados. MW Carril 1: Marcador de pesos 100pb DNA Ladder. En el carril 2 se cargó el control negativo (H_2O miliQ). En los carriles 3-6 se cargaron las PCR de los clones 1-4. La banda intensa se corresponde con amplificación del gen *cprR*. MW: Marcador de pesos Lambda/*HindIII*

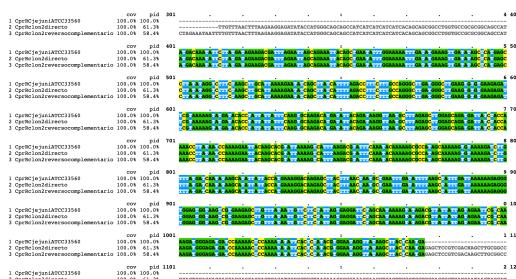


Figura 9. Alineamiento de secuencias del clon 2 (secuenciación de la hebra directa y secuencia complementaria a la secuenciación del reverso) respecto de la secuencia del gen *cprR* en el genoma de *C. jejuni* ATCC 33560. El alineamiento de secuencias generado con el programa ClustalW. Ha identificado una identidad del 100% con la secuencia codificante del gen *cprR* en el genoma *C. jejuni* ATCC 33560 tomado como referencia. Para alinear se identifican bloques de identidad que se pueden observar en la imagen. Los nucleótidos representados son indicados por la base nitrogenada: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) o Citosina (C). N representa nucleótido no identificado (A, T, G o C).

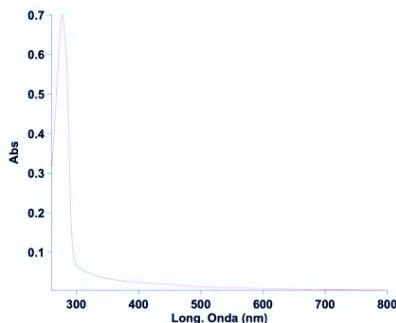


Figura 10. Espectro UV-visible entre 250 nm y 700 nm de la solución de proteína CprR recombinante purificada. Representada en el eje de las ordenadas la absorbancia y en el eje de las abscisas la longitud de onda en nanómetros. La línea con el pico se corresponde con las medidas de absorbancia de la muestra a diferentes longitudes de onda. Se aprecia un pico de absorbancia a 280 nm correspondiente a la presencia de la proteína purificada.

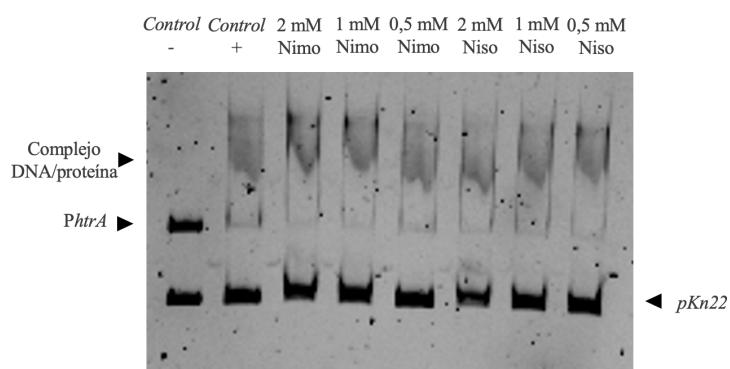


Figura 11. Ensayo de retardo en gel (EMSA) para la evaluación de la capacidad inhibitoria de nimodipino y nisoldipino sobre actividad biológica *in vitro* del regulador transcripcional CprR. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. En todos los casos se añadieron 120 ng de DNA específico (promotor diana) e inespecífico (*pKn22*), el Control – contiene DNA sin proteína y el resto de muestras incluyen el regulador CprR a una concentración de 3 μ M. Ensayos de retardo en gel realizados en presencia de los compuestos nimodipino (Nimo) y nisoldipino (Niso) a concentraciones de 2 a 0,5 mM.