

Estudio y purificación de los sustratos aceptores de la proteína O- fucosiltransferasa

Trabajo de Fin de Grado de Biotecnología, Septiembre 2014

Autor

Daniel Murciano Trigo

Director de proyecto

Ramón Hurtado Guerrero

Co-directora de proyecto

Jessika Valero González



1542

Universidad
Zaragoza



Índice

Índice	2
Resumen	4
Abstract	4
Introducción	5
1. Glicosilación	5
2. Glicosiltransferasas y O-fucosilación	5
3. Tromboespondinas y TSRs	6
Objetivos	8
Materiales y métodos	9
1. Preparación de cultivos y crecimiento celular	9
2. Recogida de muestras	10
3. Purificación	11
3.1. Purificación en columna de níquel del dominio TSR123	11
3.2. Desalting de TSR123	11
3.3. Segunda columna de níquel	12
3.3.1. Purificación en columna de maltosa-GST de TSR123	12
3.3.2. Purificación en columna de maltosa del dominio TSR1	13
4. Filtración en gel	13
4.1. Filtración en gel del dominio TSR123	13
4.2. Filtración en gel del dominio TSR1	14
5. Cristalización	14
6. Pruebas de expresión y purificación de TSR12 y TSR23	15
6.1. Transformación de células con el DNA	15
6.2. Elaboración de glicerol y preparación de cultivos	15
6.3. Purificación mediante columna de maltosa	16

Resultados	17
1. TSR123	17
1.1. Preparación de cultivos y crecimiento celular	17
1.2. Purificación en columna de níquel	17
1.3. Desalting y cuantificación	18
1.4. Segunda columna de níquel	19
1.5. Purificación en columna de maltosa-GST	20
1.6. Filtración en gel	21
1.7. Cristalización	22
1.8. Segundo proceso de cultivo y purificación de TSR123	23
2. TSR1	24
2.1. Preparación de cultivos y crecimiento celular	24
2.2. Purificación en columna de maltosa	24
2.3. Filtración en gel	25
3. TSR12 y TSR23	26
3.1. Prueba de expresión	26
3.2. Preparación de cultivos y crecimiento celular	26
3.3. Purificación con columna de maltosa y corte con proteasa	27
Discusión	28
Conclusiones	29
Bibliografía	30
Anexo I. Características de las proteínas	32
Anexo II. Relación de abreviaturas	34

RESUMEN

La O-fucosilación es una modificación post-traducciona que tiene lugar generalmente en un gran número de proteínas de membrana o secretadas. Múltiples estudios han revelado que esta modificación está implicada en la señalización celular y plegamiento de proteínas durante el desarrollo embrionario, así como en el metabolismo del tejido adulto. Entre los diferentes elementos implicados en el proceso de O-fucosilación destacan las glicosiltransferasas (GTs) POFUT1 y POFUT2 las cuales transfieren residuos de fucosa desde GDP-fucosa a sustratos aceptores específicos.

Mientras POFUT1 fucosila proteínas conteniendo repeticiones con estructura similar al factor de crecimiento epidermal (EGF). POFUT2 fucosila las repeticiones de trombospondinas tipo 1 (TSRs). En ambas repeticiones se fucosilan residuos de serina o treonina y están formadas por tres puentes disulfuro. Si bien tanto la estructura cristalina de POFUT2 como la de los dominios TSR ha sido resuelta mediante la difracción por rayos X en múltiples estudios, sigue sin conocerse con precisión el mecanismo de transferencia de cómo la POFUT2 reconoce los TSRs y de por tanto como se fucosilan.

En este sentido optimizaremos la expresión y purificación de diferentes dominios TSR para posteriormente caracterizar cualitativa y cuantitativamente la interacción entre estos y la enzima POFUT2. Además, algunos de estos dominios se utilizarán para obtener una estructura cristalina junto con la POFUT2 con el fin de elucidar el mecanismo de reacción de la fucosilación y se cómo esta GT reconoce a sus sustratos aceptores.

ABSTRACT

O-fucosylation is an important post-translational modification occurring on proteins. Many studies have demonstrated that this modification is involved in cellular signaling and protein folding both in embryonic development and adult tissues. Both glycosyltransferases (GTs), POFUT1 and POFUT2, proteins are responsible of this modification. They transfer residues of fucose from GDP-fucose to acceptor substrates.

While POFUT1 fucosylates epidermal growth factor (EGF) like domains, POFUT2 does it on Thrombospondin Repeats type I (TSRs) domains. Both GTs transfer fucose to serine and threonine residues on these domains. Though the crystal structures of POFUT2 and TSR have been resolved by X-ray crystallography, there is not a structure of the complex between POFUT2 and TSR, and thus the recognition mechanism of how POFUT2 recognizes these domains of the catalytic mechanism are not currently known.

In this study we will optimize the expression and purification of different TSR domains in order to characterize the interaction between those and POFUT2. Moreover these domains will be co-crystallized with POFUT2 with the aim of obtaining a complex that might unravel the above aspects of POFUT2.

INTRODUCCIÓN

1. Glicosilación

La glicosilación es un proceso consistente en la incorporación de moléculas de carbohidratos a otras moléculas biológicas (como por ejemplo azúcares, lípidos o proteínas). Alrededor del 3% del genoma humano está implicado en procesos de glicosilación y más del 50% de las proteínas expresadas se encuentran glicosiladas (Davies et al., 2005).

La glicosilación de proteínas es un proceso conservado evolutivamente y observado en todos los organismos desde bacterias hasta el ser humano. Entre las funciones de estos glicanos se encuentran la estabilización de proteínas, el marcaje antigénico, el proceso de señalización celular o el plegamiento proteico. (Luther and Haltiwanger et al., 2009). Además, diversas patologías humanas son causadas por desórdenes en procesos de glicosilación o reconocimiento de carbohidratos; es por ello que el estudio de las glicosiltransferasas (GTs) tiene un gran interés tanto científico como biomédico (Varki et al., 2009).

2. Glicosiltransferasas (GTs) y O-fucosilación

Las GTs son enzimas clave encargadas de la transferencia de azúcares a proteínas, lípidos, moléculas orgánicas y otros glicanos. Son enzimas con funcionalidades específicas que participan en multitud de procesos biológicos (Henrissat B. et al., 2008).

Entre los diversos procesos de glicosilación proteica se encuentra la O-fucosilación. La O-fucosilación es una modificación post-traducciona directamente implicado en el plegamiento, el desarrollo embrionario y la homeostasis de tejido adulto. (Lira-Navarrete, Valero-González, Hurtado-Guerrero et al., 2011).

El mecanismo de O-fucosilación es catalizado por las enzimas conocidas como POFUT2 (“Protein O-Fucosyltransferase type 2”) y POFUT1 (“Protein O-Fucosyltransferase type 1”) que actúan como GTs de inversión mediante la transferencia de moléculas de fucosa a sus sustratos protéicos. Ambas transfieren residuos de fucosa desde GDP-fucosa a proteínas con motivos ricos en cisteínas, en concreto sobre dominios TSR (“Thrombospondin Repeats type I”) y EGF (“Epidermal Growth Factor-Like”) que actúan como grupos receptores del carbohidrato (Harris and Spellman et al., 1993).

3. Trombospondinas y TSRs

Las trombospondinas (TSPs) son unas proteínas extracelulares que participan en la comunicación célula-célula y célula-matriz. Su estructura consta de cinco componentes que poseen patrones de expresión específicos en tejidos embrionarios y tejidos adultos, concretamente se ha encontrado una alta expresión de estas proteínas en tejido cardíaco, cartilaginoso y cerebral.

Las TSPs interactúan en la superficie celular con proteínas de membrana tales como integrinas, CD36 y proteoglicanos. Participan tanto en la regulación de la estructura de la matriz extracelular como en el fenotipo celular (Lawler J. et al., 2000). La principal función de las TSPs es a través de los TSRs (*Thrombospondin type 1 Repeats*) y consiste en la activación del TGF- β (*Transforming Growth Factor type β*) y son capaces de inhibir la angiogénesis o desarrollo de vasos sanguíneos (Murphy et al., 1992).

La estructura de las TSPs consta de 4 dominios: un N-terminal, un dominio de repeticiones tipo 1 (TSR), un dominio de repeticiones tipo 3 y un dominio C-terminal (**Figura 1**).

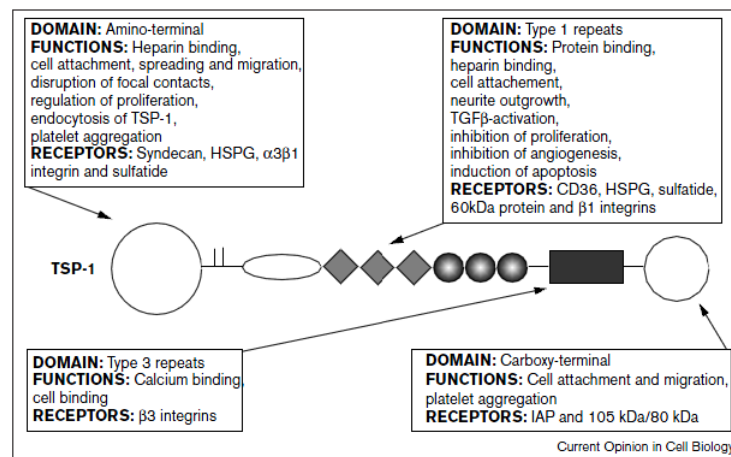


Figura 1. Esquema de los diferentes componentes de las TSPs

Las repeticiones de trombospondinas o TSR (“Thrombospondin type 1 Repeats”) son unas secuencias que se encuentran en numerosas proteínas humanas y que suelen ser fucosiladas en residuos de serina/treonina (Chun-I Chen et al., 2012). Más de 40 proteínas humanas contienen las secuencias consenso TSR dependientes de la fucosilación por POFUT2 (Hofsteenge et al., 2001).

El dominio TSR se caracteriza por estar formado por una irregular y dos hojas beta regulares: A, B y C (**Figura 2**). Nosotros estudiaremos los dominios TSR123 de la trombospondina 1 humana (Tan et al., 2002). En esta estructura se observa un asa en el “loop” formado entre los TSRs 2-3 y otro loop entre los TSRs 1-2 que corresponde a la región donde se produce la O-fucosilación, concretamente en el residuo de serina o treonina de la secuencia **CX_{2,3}(S/T)CX₂G** (Tucker et al., 2004).

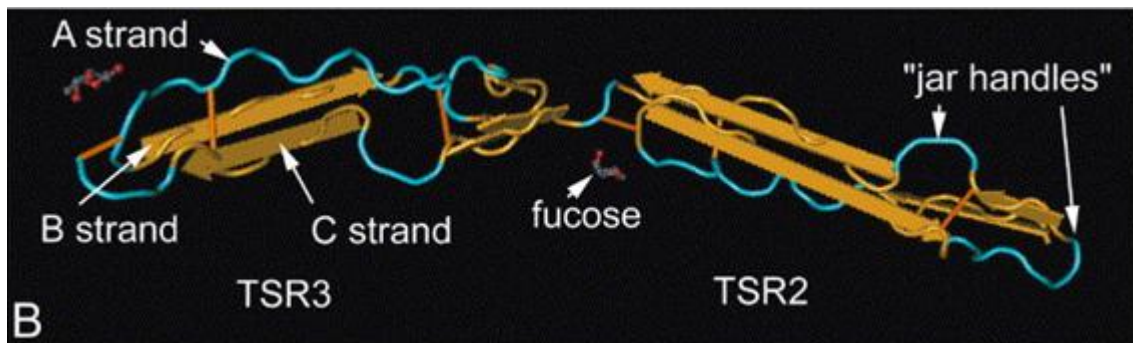


Figura 2. Estructura 3D de los TSRs con las cadenas ACB del TSR tipo 1.

Estudios realizados en ratones “knock out” para el gen de POFUT2 han demostrado que la O-fucosilación de los TSRs es crítica para procesos embrionarios tales como la restricción de la transición del tejido epitelial, correcto modelaje del mesodermo y localización correcta del endodermo (Du et al., 2010).

En la actualidad no se conoce ninguna enfermedad asociada directamente con un defecto genético en el locus de *POFUT2* en *H.sapiens*. Hoy en día se está estudiando más a fondo la O-fucosilación de proteínas, la interacción entre GTs y sus sustratos y el mecanismo de reconocimiento específico de las secuencia consenso de fucosilación.

Recientemente se ha obtenido la primera estructura cristalina de *HsPOFUT2* sola y en complejo con el donador GDP-fucosa, cuyo estudio sugiere que la especificidad del reconocimiento del enzima no radica en la totalidad del TSR sino en una estructura 3D inusual de una pequeña parte del TSR (Chen et al., 2012).

Por tanto, el estudio de la estructura de los TSR y de su interacción con la proteína POFUT2 permitirá conocer mejor el mecanismo reconocimiento de los TSRs por parte de la POFUT2 además de entender el mecanismo de la O-fucosilación.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo optimizar la expresión y purificación el dominio TSR123, así como sus subdominios TSR1, TSR12 y TSR23 para su estudio por separado y observar como son reconocidos y fucosilados por POFUT2.

Los objetivos específicos comprenden:

- Expresar y purificar estos dominios usando la cepa de Rossetta Gammi (DE3) de *E. coli*.
- Co-eluir la proteína TSR123 junto con la proteína POFUT2 mediante la técnica de filtración en gel su posterior cristalización.

Los resultados obtenidos en este trabajo podrán servir para futuros estudios que permitan la cristalización del complejo POFUT2-TSR123 o POFUT2 como dominios simples de TSR o dobles, o estudios cinéticos y termodinámicos entre ambas proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación de cultivos y crecimiento celular.

Tanto la proteína TSR123 como el dominio TSR1 con los que trabajamos fueron obtenidos de bacterias congeladas con glicerol a -80°C que contenían los vectores basados en pMALc2x para la expresión de las mismas. Estos vectores aportan una cola de ocho histidinas que facilitará la purificación de la proteína usando una columna de níquel, así como una proteína de unión a maltosa (MBP) que facilitará la sobreexpresión y la purificación mediante una columna de maltosa. La proteína con el vector estaba insertada en cepas de Rossetta-Gammi 2 (DE3) de *E. coli*. Estas cepas tienen la cualidad de formar puentes disulfuro citoplasmáticos que mejoran la expresión proteica, así como solubilizar altos porcentajes de proteína (Kuroki M. et al., 2014).

A las muestras de glicerol se les había añadido el antibiótico tetraciclina para favorecer la formación de los puentes disulfuro en el citoplasma y ampicilina como marcador de selección positivo del plásmido. La concentración de los antibióticos fue de $100\ \mu\text{g/ml}$ para la ampicilina y $10\ \mu\text{g/ml}$ para la tetraciclina.

Para poder obtener una mayor cantidad de muestra de proteína sembramos una alícuota de estas muestras de glicerol en un medio de cultivo rico que favorezcan el crecimiento de las bacterias que contienen la proteína de trabajo.

Para preparar los medios de cultivo se utilizó el medio 2xTY que se compone de: 16g de triptona, 10g de extracto de levadura, 5g de NaCl y NaOH para equilibrar el pH del cultivo hasta un valor final de 7. Con esta fórmula se prepararon precultivos de 100 ml en matraces de 250ml y cultivos de 2 litros en matraces de 5 litros. Tanto los precultivos como los cultivos se autoclavaron a 120°C durante 20 minutos para su esterilización. A estos medios también se les añadirían los antibióticos tetraciclina y ampicilina a una concentración de $10\ \mu\text{g/ml}$ y $100\ \mu\text{g/ml}$ respectivamente tras la esterilización.

En los matraces correspondientes a los precultivos se les añadió una muestra de $30\ \mu\text{l}$ de Rossetta Gammi 2 (DE3) transformadas con nuestro plásmido y se dejaron crecer en un agitador a 160rpm y 37°C de temperatura durante un periodo de 16-20 horas con el objetivo de alcanzar una densidad celular óptima correspondiente a un valor de absorbancia de 0,6 unidades a $600\ \text{nm}$.

A cada matraz de cultivo de 5 litros se le añadieron ampicilina y tetraciclina y 100 ml del precultivo preparado del día anterior. Estos matraces se incubaron en un agitador a 160rpm y 37°C de temperatura comprobando su densidad óptica a intervalos de una hora hasta conseguir una absorbancia de 0,6 unidades. (transcurridas aprox. 4 horas). Como muestra de blanco para las mediciones de absorbancia se utilizó una alícuota de cultivo al que se habían añadido los antibióticos pero no la muestra celular.

Tras conseguir la densidad celular deseada se añadió IPTG a una concentración final de 1mM a cada matraz como sustancia inductora de la transcripción de nuestra proteína gracias al operón *lac* existente en el vector pMAL (Hansen LH. et al., 1998). Una vez inducido el cultivo se incubó en un agitador a 160rpm y 18°C durante 16-20 horas.

Nota: todo el proceso de toma de muestras de cultivos, cambio de matraces, etc. se realizó con material estéril y trabajando con llama para mantener las condiciones de esterilidad. Las aperturas de los matraces estaban convenientemente tapadas para evitar la contaminación de los cultivos.

2. Recogida de muestras

El volumen de cultivo obtenido se repartió en tubos de centrifuga y se centrifugaron las muestras a 9000rpm y 4°C (centrífuga JP-Beckman) para poder obtener el “pellet” de células y desechar todo el sobrenadante. Todo el “pellet” se recogió en tubos de centrifuga de 15ml. Para la recogida del “pellet” se utilizó una solución de composición Tris 25mM, NaCl 150mM, Imidazol 20mM, pH 7,5 (**Solución A**). Las muestras de “pellet” más la solución A se centrifugaron 15 minutos a 4000rpm para eliminar el sobrenadante y conservar el “pellet” celular.

Las muestras de “pellet” recogido se homogeneizaron con 1ml de solución A por gramo de “pellet”. Utilizamos la **solución A** ya que va a ser este con el que equilibraremos la primera columna de purificación (en el caso de TSR1, TSR12 y TSR23 se homogeneizaron en solución Tris 25mM, NaCl 150mM, pH 7,5)

A esta mezcla se le añadieron 1µl de benzonasa, 1 mg de lisozima y un vial de inhibidor de proteasas (composición de 1µM PMSF, 10 µM benzamidina y 0.5 µM de leupeptina) por cada 10 gramos de “pellet”. La benzonasa se añade con el objetivo de eliminar las moléculas de DNA de la muestra, la lisozima produce la lisis de las células de *E. coli* y el inhibidor de proteasas impide la degradación de las proteínas. La muestra se incubó en una estufa a 37°C durante 20 minutos para dejar actuar a las enzimas.

La muestra bacteriana se trasvasó a un vaso de vidrio de precipitados y se dejó en hielo. La lisis bacteriana se llevó a cabo por sonicación a una amplitud de 80% en 10 sesiones de 30 segundos con 30 segundos de descanso entre sesión; la sonicación se llevó a cabo en hielo para evitar el sobrecalentamiento y posible desnaturalización de las proteínas.

El proceso de sonicación tiene como objetivo extraer las proteínas de la matriz celular al medio de cultivo. Las muestras se centrifugan a 19500rpm a 4°C en series de 20 minutos hasta eliminar todo el “pellet” y podamos recoger todo el medio posible de sobrenadante.

Nota: en el proceso de cultivo, crecimiento celular y recogida de muestra seguimos el mismo protocolo para las muestras de TSR123, TSR1, TSR12 y TSR23.

3. Purificación

3.1. Purificación en columna de níquel del dominio TSR123

El volumen total de sobrenadante se filtró con filtros no-estériles de 0,45µm de poro para eliminar en un primer paso todo el extracto de *E. coli* de las muestras y no saturar la columna de afinidad. La columna utilizada fue una columna His-Trap de GE Healthcare® de 5ml.

Para la purificación de las muestras en columna de níquel se utilizó un equipo AKTA-purifier con un superloop de 50ml externo y el software UNICORN manager para automatizar el proceso. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de agua MQ (50ml) y 25 volúmenes de solución A. Para este proceso de purificación se prepararon dos tipos de solución: solución A (composición antes mencionada) y solución B (Tris 25mM, NaCl 150mM, Imidazol 200mM, pH 7,5). Todas las soluciones empleadas en este trabajo se filtraron y desgasificaron tras su preparación.

Tras inyectar la proteína en el sistema se llevó a cabo la elución de la misma usando un gradiente de solución B (mayor concentración de imidazol). El volumen de muestra obtenido se concentró en concentradores Millipore de 10kDa hasta conseguir un volumen final de 30ml.

3.2. Desalting de TSR123

En el proceso de desalting se utilizó una columna de desalting de 50ml (GE Healthcare) acoplada al sistema AKTA. La columna se lavó con 200ml de agua MQ y 100ml de solución C (Tris 25mM, NaCl 500mM, pH 7,5) que se utiliza para eliminar todo el imidazol de la muestra de proteína. Tras el desalting se obtuvieron 45ml de volumen de muestra.

Una vez realizado el desalting se calculó la concentración de proteína presente en el medio mediante espectrofotometría usando el método de Bradford. El método de Bradford consiste en utilizar 1 ml del reactivo de Bradford como blanco y después añadir 1 µl de solución de proteína. Los aminoácidos básicos de la proteína reaccionan con el reactivo y el máximo de absorbancia se mide con el espectrofotómetro a 595 nm.

Tras la cuantificación se añadió una solución de proteasa (Precision Protease ó PP) hasta una concentración 1/100 proteasa/proteína con el objetivo de separar la proteína de las colas de histidina y de la MBP. La muestra con la proteasa se dejó reaccionando durante 48 horas en una cámara frigorífica a 4°C de temperatura.

Tras el corte con la proteasa se analizó la muestra para comprobar la eficacia del corte mediante electroforesis en gel de acrilamida al 15%.

Nota: en este trabajo a las alícuotas cargadas en el gel de acrilamida se les añadió tampón de carga 4x y se calentaron a 100°C en TermBlock durante 15' antes de ser cargadas en el gel.

La geles de acrilamida usados en este trabajo se componían de dos fases, una fase compactadora (*stacking*) utilizada para agrupar las muestras cargadas y que todas partan del mismo punto en la electroforesis, y una fase separadora (*running*) en la que la movilidad de las muestras está restringida a la porosidad del gel y en la que las muestras se separan según su peso molecular.

Composición para dos geles de acrilamida al 15%:

- Fase separadora: 4,86 ml de H₂O MQ, 2,5 ml de acrilamida/bis-acrilamida, 2,5 ml de solución Tris pH 8,8, 50 µl de SDS, 100 µl de APS y 10 µl de TEMED.
- Fase compactadora: 3,8 ml de H₂O MQ, 500 µl de acrilamida/bis-acrilamida, 624 µl de solución Tris pH 6,8, 25 µl de SDS, 50 µl de APS y 5 µl de TEMED.

3.3. Segunda columna de níquel.

Tras comprobar la efectividad del corte con la proteasa se realizó una segunda purificación con columna de níquel His-Trap (GE Healthcare) en las mismas condiciones que la primera purificación. En este paso la proteína debe de aparecer en el flujo a través de la columna y no en el eluído.

Se obtuvieron 20ml de muestra en el flujo a través de la columna y 30 ml en el eluído. Ambas muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 15%.

3.3.1 Purificación del TSR123 usando columnas de maltosa y de glutatión.

Este paso permite la purificación de la muestra de TSR123 gracias a estar clonada en un vector pMAL que contiene la secuencia de la proteína de unión a maltosa MBP (Riggs P. et al., 2001). En la solución está presente además la proteína PP, que se debe eliminar usando la columna de GST. (Harper S. et al., 2011).

Se usaron las columnas de unión a maltosa y de GST (GE Healthcare) de 5ml acopladas al sistema AKTA. Ambas columnas se conectaron en serie, se lavaron con 100ml de agua MQ y se equilibraron con 50ml de solución Tris 25mM, NaCl 150mM, pH 7,5.

Los 20ml de proteína obtenidos en el paso anterior fueron concentrados hasta un volumen de 8ml y se inyectaron en el sistema. Tras la muestra de proteína pasaron 15ml de solución de equilibrado y se recogieron las fracciones de lavado (aprox. 15ml). Las columnas de unión a maltosa y de GST (GE Healthcare) han de ser recuperadas mediante su lavado con soluciones de maltosa y glutatión reducido respectivamente (en una concentración final de 10mM en ambos casos).

Estos 15ml de muestra se concentraron en concentradores Millipore hasta un volumen final de 2ml y se cuantificaron mediante el método de Bradford.

3.3.2. Purificación en columna de maltosa del dominio TSR1

Alternativamente al trabajo con TSR123 se realizó el cultivo del dominio TSR1. En este caso no se realizó una purificación con columna de níquel ya que la construcción carece de cola de histidinas.

La columna de unión a maltosa se lavó con 50ml de agua MQ y 25ml de solución Tris 25mM, NaCl 150mM, pH 7,5. La purificación se llevó a cabo en una bomba peristáltica.

El primer paso fue pasar la muestra de proteína por la columna obteniendo la primera fracción o flujo a través de la columna.

Después se fue pasando la solución por la columna y la muestra obtenida (lavado) se iba recogiendo y comprobando la presencia de proteínas mediante el reactivo de Bradford hasta comprobar que no quedaba proteína en el lavado.

La elución de la proteína TSR1 se realizó con solución Tris 25mM, NaCl 150mM, maltosa 10mM, obteniendo la fracción eluída hasta que dejó de reaccionar con el reactivo de Bradford. El volumen de eluído fue de unos 20ml.

Para el análisis por electroforesis de las fracciones de flujo a través de la columna, lavado y eluído se tomó una alícuota de cada una de ellas y se cargaron en un gel de acrilamida del 15%.

4. Filtración en gel

4.1 Filtración en gel del dominio TSR123

La filtración en gel se realizó en el sistema AKTA-purifier utilizando la columna de filtración en gel de 330ml de GE Healthcare equilibrada con solución Tris 25mM, NaCl 500mM pH 7,5. En primer lugar se realizó inyectando la muestra de proteína en solitario como último paso de purificación.

Con el objetivo de formar un complejo entre la proteína POFUT2, el dominio TSR123 y GDP como sistema de donor-aceptor de moléculas de O-fucosa se procedió a una segunda filtración en gel de la muestra purificada de TSR123 con una muestra purificada de POFUT2 en presencia de GDP.

Las muestras de POFUT2 y TSR123 se mezclaron en una proporción molar de 1:5 por lo que se midieron las concentraciones de cada muestra de proteína y se realizaron los cálculos necesarios para conseguir esta proporción en la filtración en gel. En este caso la columna se equilibró utilizando una solución que contiene Tris 25mM, NaCl 10mM y GDP 50 μ M. Se utiliza una solución con baja concentración de sal para favorecer la formación del complejo.

Una vez realizado el análisis por electroforesis se concentraron tanto la muestra del complejo como la de los monómeros de TSR123 en concentradores Millipore de 10kDa tipo eppendorf realizando un cambio de solución a Tris 25mM pH 7,5.

4.2. Filtración en gel del dominio TSR1

En el caso de la TSR1 la filtración en gel se realizó para purificarla a homogeneidad.

Tras pasar la muestra de proteína por la columna de filtración en gel el software nos representó cuatro picos de absorbancia, dos de ellos correspondientes a fracciones de proteínas no deseadas, otro correspondiente a la proteína MBP y otro correspondiente a la fracción con la muestra de TSR1.

El volumen de la fracción de TSR1 fue de unos 10ml que concentramos en concentradores Millipore de 10kDa hasta un volumen final de 500 μ l.

5. Cristalización

Las pruebas de cristalización realizadas en este trabajo fueron llevadas a cabo con la proteína TSR123 con el objetivo de estudiar la interacción de este dominio con la proteína POFUT2 mediante la resolución de la estructura de los cristales por difracción de rayos X.

Para la prueba de cristalización realizada utilizamos una muestra de TSR123 co-eluída con POFUT2. La técnica de cristalización empleada en este caso fue hanging-drop (gota colgante) en una placa de 24 pocillos con variaciones de PEG3350, PEG5000 y KSCN completando con agua MQ.

Estas condiciones corresponden a una mejora proveniente de estudios anteriores realizados en el grupo.

6. Prueba de expresión y purificación de TSR12 y TSR23.

6.1. Transformación de células con el DNA.

Los plásmidos que codifican los dominios TSR12 y TSR23 se obtuvieron de trabajos anteriores del grupo.

El protocolo de transformación consistió en mezclar 200ng de muestra de DNA (conservada en hielo) con 200µl de células de Rossetta Gammi 2. La mezcla se realizó en condiciones de esterilidad (con llama) y se dejó 30 minutos en hielo.

El siguiente paso fue realizar un choque térmico de 1 minuto a 42°C en TermBlock y después 2 minutos en hielo.

Tras el choque térmico se añadió a la muestra un volumen de 500 µl de medio SOC. El medio SOC es un medio de cultivo rico en nutrientes que aumenta la eficiencia de la transformación en *E. coli*. Su composición es : 2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂ y 20mM glucosa (Hanahan D. et al., 1983).

La mezcla se dejó en agitación durante 1-2 horas a 37°C y se añadieron 100 µl de muestra a una placa de LB-Agar. La composición del LB-Agar era de 20g/L de LB, 15g/L de Agar, Ampicilina (100 µg/ml) y Tetraciclina (10 µg/ml).

Las colonias se dejaron crecer durante 24-48 horas. Tras su crecimiento se tomó una colonia de cada construcción con una punta de pipeta que se introdujo en un tubo Falcon con 5ml de LB y 10 µl/ml de Ampicilina (100 µg/ml) y Tetraciclina (10 µg/ml). Estos medios se dejaron incubando a 37°C en agitación durante 24 horas y se utilizaron para congelarlos en muestras de glicerol a -80°C.

6.2. Elaboración de glicerol y preparación de cultivos.

Para la purificación de estos dominios se utilizaron muestras de células ya congeladas previamente en glicerol. Con estas muestras de glicerol se prepararon los precultivos y cultivos según el protocolo descrito en el apartado “preparación de cultivos y crecimiento celular”.

Se prepararon 2 litros de cultivo para cada proteína, se trabajó con estas cantidades ya que, al haber trabajado con construcciones similares, cabía esperar que estas proteínas también se expresaran. En este caso el objetivo era preparar una cantidad considerable de cultivo de proteína para así poder observar con claridad la expresión en los geles de acrilamida y comprobar si la proteasa de precisión podía cortar la construcción.

Como variación del método de expresión descrito hasta ahora se tomaron muestras de cultivo de ambas proteínas antes de inducir las con IPTG junto con alícuotas de “pellet” y alícuotas de sobrenadante tomadas tras la inducción con IPTG de las muestras de ambos dominios con el objetivo de comprobar la expresión de las construcciones.

6.3. Purificación mediante columna de unión a maltosa.

En el caso de los dominios TSR12 y TSR23, queríamos demostrar si podíamos cortar la construcción de la proteína unida a la proteína de fusión (MBP) por lo que el primer paso de purificación consistió en pasar las muestras por una columna de maltosa.

Siguiendo los pasos descritos anteriormente en el apartado 3.4.2 pasamos ambas muestras por una columna de unión a maltosa recogiendo las fracciones correspondientes al flujo a través de la columna, lavado y eluido de la columna.

Las muestras obtenidas fueron analizadas por electroforesis en gel de acrilamida al 15% junto con una alícuota de sobrenadante y otra de “pellet” tomadas antes de la purificación.

La fracción correspondiente al eluido fue cuantificada mediante el método de Bradford para calcular el volumen de proteasa de precisión que debíamos añadir para una proporción 1:10 y la mezcla la dejamos cortar durante un fin de semana.

RESULTADOS

1. TSR123.

1.1. Preparación de cultivos y crecimiento celular.

Se prepararon 3 matraces de 5 litros de capacidad con 2 litros de cultivo 2xTY en cada uno y sus correspondientes matraces de 250ml con 100ml de precultivo.

Durante el cultivo de las muestras en los matraces de 5 litros se realizaron 3 medidas de absorbancia a la hora, dos horas y 4,5 horas respectivamente:

Tras 4,5 horas el valor de absorbancia era el adecuado (0,63) para inducir las muestras con IPTG.

Después de centrifugar todo el medio de cultivo para desechar el sobrenadante recogimos un volumen de 30ml de “pellet”, a los que añadimos 30ml de solución A, 1mg de lisozima, 3µl de benzonasa y un vial de inhibidor de proteasa para iniciar el proceso de rotura celular.

1.2. Purificación en columna de níquel.

Después de la sonicación disponíamos de 30ml de muestra de proteína que hicimos pasar por la columna de níquel para su purificación. El análisis de la muestra por el software UNICORN del sistema AKTA nos dio dos picos de conectividad UV con el siguiente patrón (**Figura 3**):

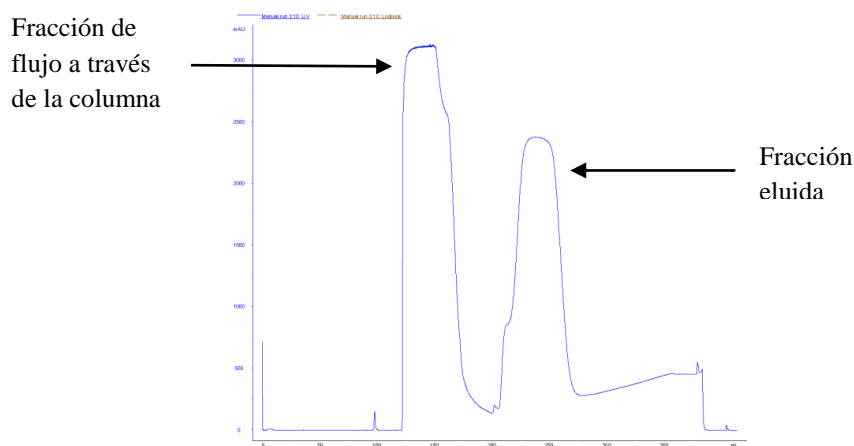


Figura 3. Picos UV columna de níquel TSR123.

El primer pico correspondía a todas las proteínas que no se habían unido a la columna de níquel, mientras que el segundo pico indicaba la presencia de nuestra proteína en la muestra de eluido. El volumen total de eluido fue de 60ml, que concentramos en concentradores Millipore de 10kDa hasta un volumen final de 30ml.

1.3. Desalting y cuantificación.

Los 30 ml de muestra de proteína obtenidos en el paso anterior se inyectaron en una columna de desalting de 50 ml para eliminar todo el imidazol de solución. La ventaja del desalting frente a la diálisis como método de eliminación de sales y para cambiar el medio de las proteínas es que el desalting es un proceso que se realiza a gran velocidad con respecto a la diálisis, lo que impide un cambio de conformación indeseado de las proteínas, por ello este es el método de elección para cambiar el medio a uno sin imidazol.

Tras el desalting obtuvimos 45 ml de muestra de proteína que cuantificamos por el método de Bradford a 595 nm en el espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Vis obteniendo una medida de absorbancia de 0,32 con una muestra de 1µl de proteína.

Previamente fue realizada una calibración del reactivo Bradford comercial obteniendo un valor de absorbancia de 0.086 para 1 µl de BSA de concentración 1mg/ml en 1 ml de reactivo de Bradford. Por tanto se puede realizar la cuantificación de proteína mediante la fórmula:

$$[]_{\text{proteína}} = \text{Abs}_{\text{proteína}} / 0,086.$$

$$0,32 = 0,086c \rightarrow c = 0,32/0,086 = 3,72 \text{ mg/ml de proteína, en 45ml} \rightarrow 167\text{mg/proteína}$$

Para cortar nuestra muestra se añadieron 1,67 mg de proteasa de precisión (PP) de una solución de 4 mg/ml para tener una proporción 1:100. Las muestras se dejaron reaccionando a 4°C durante 48 horas.

En trabajos anteriores se había comprobado que el corte de la proteína mediante proteasa de precisión no resultaba muy efectivo, por lo que en este caso se realizaron diferentes pruebas: corte en la solución Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 y corte en la solución Tris 25 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5. El motivo por el cual se optó por realizar estas pruebas fue el de minimizar la aparición de oligómeros, de cuya aparición se tiene constancia según trabajos anteriores. De esta manera se pretendía optimizar el corte con la proteasa de precisión

Se realizó un análisis por electroforesis en gel de acrilamida al 15% de una muestra control cortada (A), una muestra cortada con solución 150mM NaCl (B) y una muestra cortada con solución 500mM NaCl (C).

Las bandas que aparecen en el gel representan la proteína de unión a maltosa (40kDa), la proteína TSR123 (20kDa) y el complejo MBP-TSR123 (60kDa) (**Figura 4**).

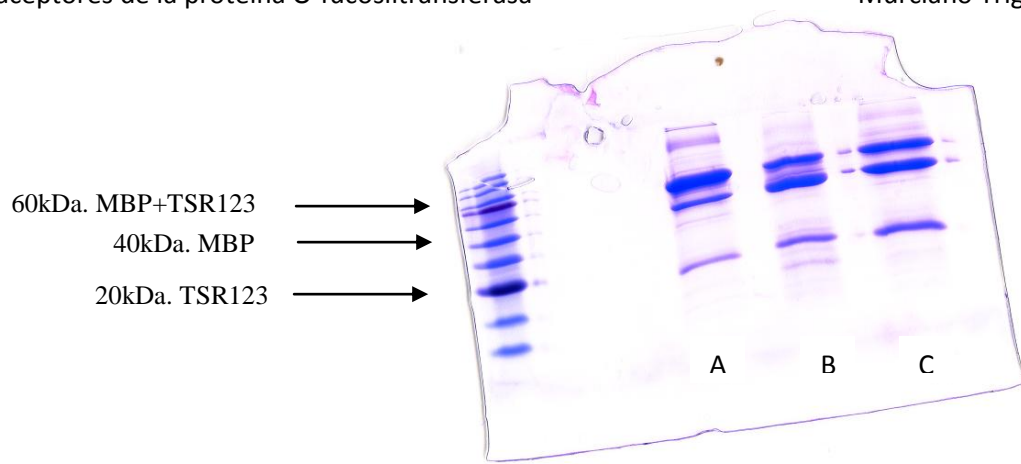


Figura 4. Gel acrilamida tras columna de níquel TSR123.

Se observó el mismo patrón para las bandas B y C (50% de corte) por lo que comprobamos que la proteasa de precisión no cortaba mejor a una mayor concentración de sal.

1.4. Segunda columna de níquel.

Los 45 ml de muestra obtenida tras el desalting volvieron a ser inyectados en el sistema AKTA para una segunda purificación con columna de níquel. En este paso se pretende eliminar la proteína de fusión MBP-8His y parte de la fracción no cortada de nuestra proteína.

El software UNICORN nos dio un patrón de picos de conectividad similar al anterior, recogimos los tubos 4-7 (correspondientes a la fracción flujo a través de la columna) y los tubos 10-14 (correspondientes a la fracción eluída). El resto de picos correspondían a problemas de entrada de aire o suciedad en el circuito (**Figura 5**).

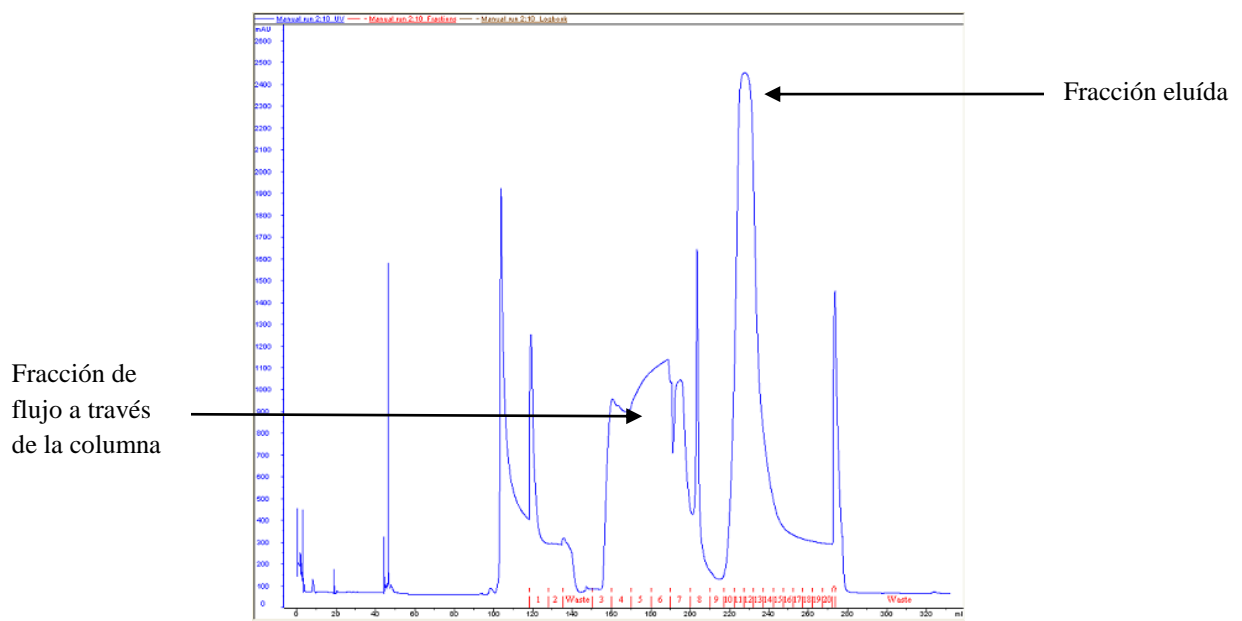


Figura 5. Picos UV segunda columna de níquel TSR123

Se tomó una alícuota de ambas fracciones y se analizó por electroforesis en gel de acrilamida al 15% (**Figura 6**).

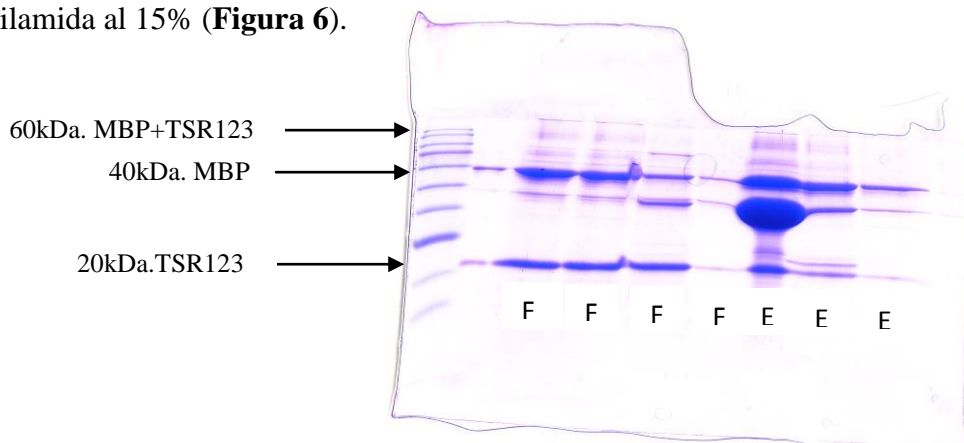


Figura 6. Gel acrilamida tras segunda columna de níquel TSR123.

La banda de proteína apareció en todas las fracciones de flujo a través de la columna (F). Al no obtuvimos muestra en el eluído (E) no fue necesario realizar otro desalting.

1.5. Purificación en columna de maltosa-GST.

Los 20 ml obtenidos de muestra de proteína de la columna de níquel se inyectaron en el sistema AKTA para ser purificados mediante columnas de maltosa y GST. En este paso queremos eliminar las proteínas no cortadas unidas a las proteínas de fusión MBP mediante la columna de maltosa y la proteasa de precisión mediante la columna de GST.

Recogemos la fracción de lavado de las columnas y obtenemos 15 ml de muestra de proteína que concentramos en concentradores Millipore de 10kDa hasta un volumen final de 3 ml. También se recogió la fracción de eluído para un posterior análisis.

La muestra se cuantificó por método de Bradford con un valor de absorbancia de 0,34.

$$0,34/0,086 = 3,92 \text{ mg/ml} \rightarrow \text{en 3ml de proteína} = 11,78 \text{ mg de proteína.}$$

Nota: esta medida de concentración se podría realizar mediante el método de cuantificación por absorbancia a 280nm (espectro en el que se miden las proteínas) ya que en este punto la muestra ya debe de contener proteína pura. La medición se realiza con 120 μl de la solución en la que se encuentran las proteínas y 1 μl de muestra de proteína. El cálculo de moles se realiza mediante la fórmula de Beer-Lambert utilizando el coeficiente de extinción molar de TSR123 ($19500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y la masa molecular de la proteína (5740 Da).

1.6. Filtración en gel.

Para la filtración en gel necesitábamos co-eluir la proteína POFUT2 con la TSR123 en una proporción molar 1:5. Para ello disponíamos de una muestra de 5,6mg de POFUT2 (PM = 45000 Da) y 11,78 de nuestra muestra de TSR123 (PM = 20000 Da).

Calculamos los moles de cada proteína: n (POFUT2): $5,6/45000 = 0,12$ mmol

n (TSR123): $11,78/20000 = 0,6$ mmol

Con estos datos comprobamos que teníamos una proporción molar POFUT2/TSR123 de 1:5 que era exactamente la misma a la que queríamos co-eluir las proteínas en la filtración en gel.

Tras la filtración en gel el software UNICORN nos dio un patrón de tres picos de UV (**Figura 7**):

-El primero correspondía a oligómeros formados de TSR123 (O).

-El segundo correspondía al complejo POFUT2-TSR123 (C).

-El tercero correspondía a monómeros de TSR123 (M).

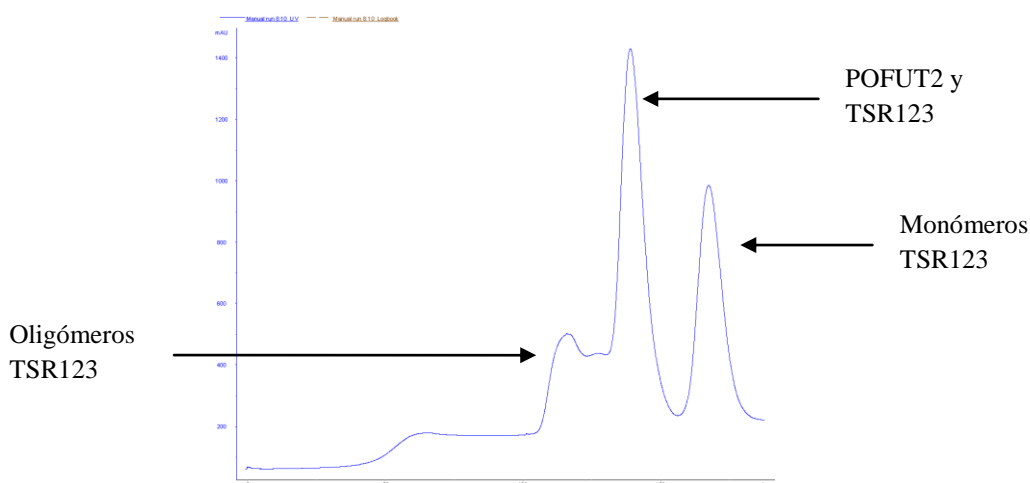


Figura 7. Picos UV co-elución POFUT2 y TSR123.

Se recogieron las tres fracciones de la filtración y se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida al 15%. En este gel también se analizó la muestra de eluido (E) obtenida de la columna de maltosa-GST (**Figura 8**). En las muestras de oligómeros de TSR123 también aparecen restos de la POFUT2.

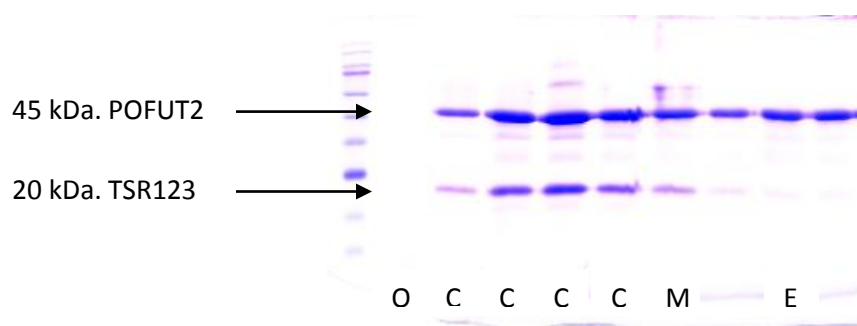


Figura 8. Gel acrilamida tras co-elución de POFUT2 y TSR123.

La muestra de POFUT2 más TSR123 se concentró hasta 1 ml de volumen realizando un cambio de solución a Tris 25mM sin NaCl con el objetivo de utilizarla para cristalización. La muestra de monómeros de TSR123 también se concentró (1 ml) y cambió de solución para su posterior uso en otros experimentos.

1.7. Cristalización

El último paso del estudio sobre la TSR123 trataba de intentar cristalizar la proteína unida a la POFUT2 en el complejo co-eluido mediante la filtración en gel.

Una de las técnicas utilizadas para la cristalización fue la de hanging-drop o gota colgante en una placa de 24 pocillos. En la preparación del líquido madre incluimos variaciones del precipitante (PEG3350 y PEG5000) y de una sal de tiocianato de sodio (KSCN) que proporcionaba unas condiciones en las que se habían observado buenos resultados de cristalización.

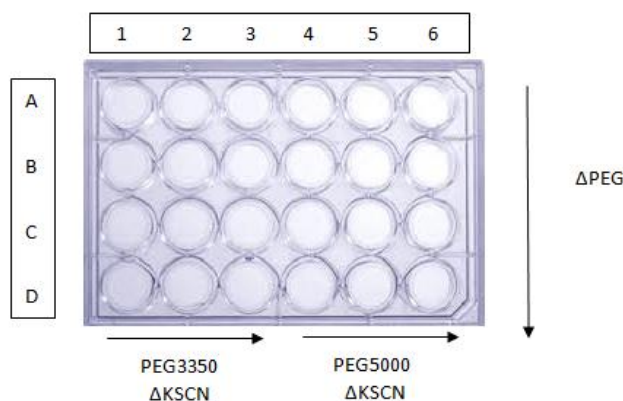


Figura 9. Placa de gota colgante para POFUT2 y TSR123

Basándonos en este esquema, las composiciones del líquido madre variaron en la concentración de PEG según las filas A-D: A (100 μ l), B (150 μ l), C (200 μ l) y D (250 μ l). En las columnas 1-3 se utilizó PEG3350 y en 4-6 PEG5000.

Las composiciones de líquido madre variaron en concentración de KSCN según las columnas 1-3 y 4-6: 1,4 (50 µl), 2,5 (100 µl), 3,6 (150 µl). Todos los pocillos se rellenaron con agua MQ hasta un volumen final de 500 µl.

De este líquido se tomó una gota de 1 µl que se mezcló con 1 µl de nuestra muestra de POFUT2-TSR123 a una concentración de 5mg/ml (medido por método de Bradford) para formar la gota colgante sobre cada uno de los pocillos de la placa.

Nota: en este punto se miden de nuevo las muestras por método de Bradford ya que al tener una muestra de varias proteínas o un complejo proteico no es útil el método de cuantificación a 280nm al no conocer la proporción exacta en la que se encuentran las dos proteínas.

1.8. Segundo proceso de cultivo y purificación de TSR123.

El segundo proceso de cultivo y purificación de la proteína TSR123 siguió los mismos pasos que el primero, con intención de purificar más cantidad de proteína y volver a co-eluirla con POFUT2 para repetir las pruebas de cristalización.

Se prepararon 6 litros de cultivo de proteína obteniendo un volumen de “pellet” de 30 ml que, tras el proceso de rotura celular, se purificaron mediante columna de níquel. En este punto ocurrió un problema con los gradientes de solución A → solución B que nos obligó a repetir el proceso perdiendo parte de proteína.

Tras la purificación realizamos un desalting de la muestra eluída de la columna de níquel y obtuvimos un volumen final de 25 ml. La cuantificación mediante el método de Bradford nos dio una medida de absorbancia de 0,4.

$$0.4/0.086 = 4,65 \text{ mg/ml en } 25 \text{ ml} \rightarrow 4,65 \times 25 = 116 \text{ mg proteína}$$

A esta muestra le añadimos 1,16 mg de proteasa de precisión para obtener la proporción 1:100 y se dejó cortando todo un fin de semana a 4°C.

El análisis de las muestras cortadas y sin cortar se realizó por electroforesis en gel de acrilamida al 15%.

En la segunda columna de níquel ocurrió otro problema debido a que se tomó la fracción eluída en lugar de la fracción flujo a través de la columna (recordamos que en este paso la proteína se encuentra en esta fracción) por lo que al desechar esta fracción se desechó prácticamente toda la muestra de proteína.

La comprobación de este error se dio tras la purificación mediante columna de maltosa-GST en la no apareció banda de proteína en ninguna de las bandas de electroforesis, por lo que tuvimos que interrumpir el proceso en este punto al no disponer de muestra de proteína con la que trabajar.

2. TSR1

2.1. Preparación de cultivos y crecimiento celular

Se prepararon 4 litros de cultivo de TSR1 con sus correspondientes precultivos. Las mediciones de la absorbancia durante la incubación a 160rpm y 37°C fueron las siguientes.

A las 4 horas la medida de absorbancia (0,58) era óptima para inducir los cultivos con IPTG. Tras la lisis celular los 15ml de “pellet” se congelaron para utilizarlos más adelante.

Se tomaron alícuotas de los precultivos de TSR1 para conservarlas en glicerol a -80°C.

2.2. Purificación en columna de maltosa.

En el caso de la proteína TSR1 el protocolo no incluye la purificación con columna de níquel ya que la construcción del gen no tenía colas de histidinas, por lo que el primer paso de purificación de los 15ml de “pellet” descongelado fue la columna de maltosa. Las muestras fueron filtradas previamente con un filtro no-estéril de 0,45 µm.

En la purificación con columna de maltosa no necesitamos utilizar el sistema AKTA-purifier ya que no es necesario realizar un gradiente de concentraciones de diferentes soluciones tampón (columna de níquel) ni esta columna es tan sensible como para necesitar un control estricto de flujo/presión como la columna de GST, por lo que acoplamos la columna a un sistema de bomba para su utilización.

La columna fue lavada con 10 volúmenes de agua MQ y equilibrada con 5 volúmenes de solución Tris 25mM, NaCl 150mM, pH 7,5.

En este caso, la fracción de nuestra proteína se encuentra unida a la MBP, por lo que la fracción que queremos obtener es la eluída, que será la que se habrá quedado unida a la columna.

Al pasar los 15 ml de muestra de proteína obtenemos la fracción flujo a través de la columna, después comenzamos a pasar la solución de equilibrado y comprobamos mediante reactivo de Bradford la muestra que va saliendo hasta que la reacción no de color azul (indica que ya no hay presencia de proteínas), el volumen obtenido fue de aproximadamente 80 ml y corresponde a la fracción lavado. La muestra de lavado se conservó para su análisis por electroforesis.

Para eluir la proteína utilizamos una solución Tris 25mM, NaCl 150mM, maltosa 10mM, pH 7,5. La fracción eluída también fue comprobada con reactivo de Bradford para asegurarnos que no quedaba proteína unida a la columna. El volumen final de eluído fue de 25 ml.

Mediante el método de Bradford cuantificamos la muestra eluída, dándonos un valor de absorbancia de 0,12.

$$0,12/0,086 = 1,39 \text{ mg/ml en } 25 \text{ ml} \rightarrow 1,39 \times 25 = 34,64 \text{ mg de proteína.}$$

A esta muestra se añadió PP en una proporción 1:10 para producir el corte de la proteína de unión a maltosa.

El análisis de varias muestras de lavado (L) y eluído (E) se realizó mediante electroforesis en gel de acrilamida del 10% (**Figura 10**).

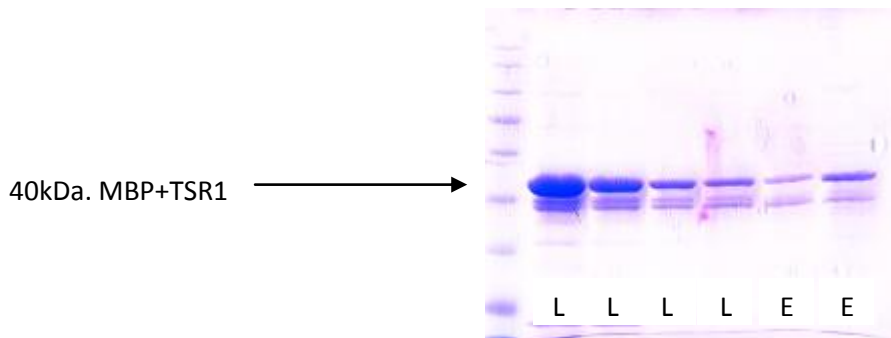


Figura 10. Gel acrilamida tras columna de maltosa TSR1.

2.3. Filtración en gel

Los 25 ml de muestra de eluido de la proteína TSR1 se concentraron hasta un volumen de unos 2 ml y se inyectaron al sistema AKTA para realizar una filtración en gel. En este caso el objetivo no era co-eluir la proteína con POFUT2 sino simplemente utilizar la columna de filtración como medio de purificación.

Durante el proceso observamos cuatro picos de UV: uno correspondiente a la MBP y otro correspondiente a la TSR1 y dos correspondientes a las fracciones con el resto de proteínas de la muestra (**Figura 11**).

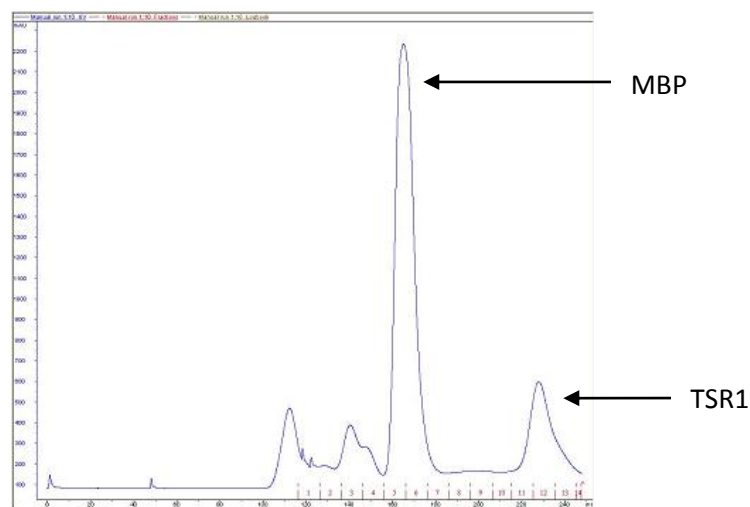


Figura 11. Picos UV filtración en gel de TSR1.

Tras la filtración en gel obtuvimos 10 ml de muestra de proteína que concentramos en un concentrador Millipore de 3kDa hasta un volumen final de 500 μ l. Esta muestra de proteína la congelamos a -80°C para futuros trabajos.

La muestra congelada de proteína se utilizaría para realizar futuros estudios de cristalización junto con la proteína POFUT2 con el objetivo de comprobar la estructura del complejo POFUT2 – TSR1 y compararla con el complejo POFUT2 – TSR123.

3. TSR12 y TSR23

3.1. Prueba de expresión.

Para el estudio de los sub-dominios TSR12 y TSR23 disponíamos tanto de muestras de células transformadas con la proteína congeladas en glicerol como DNA de las proteínas obtenido en trabajos anteriores.

La idea inicial consistía en transformar células como el DNA disponible, realizar una prueba de expresión en placas de LB-Agar y utilizar las colonias de células obtenidas como punto de partida para realizar los cultivos. La transformación de células y la prueba de expresión se realizaron siguiendo el protocolo explicado en el apartado 7,1 de *Materiales y métodos*.

Sin embargo ante la falta de tiempo disponible se comenzó la preparación de cultivos de ambos dominios utilizando las muestras congeladas en glicerol al mismo tiempo que se realizaba el trabajo de transformación de células y pruebas de expresión, que quedarían conservadas para futuros experimentos.

3.2. Preparación de cultivos y crecimiento celular.

Se prepararon 2 litros de cultivo de proteína TSR12 y otros 2 litros de la proteína TSR23 a partir de las muestras de glicerol congeladas a -80°C . Antes de inducir el crecimiento con IPTG se guardaron alícuotas de ambos cultivos para su posterior análisis.

Tras el crecimiento celular obtuvimos aproximadamente 10ml de “pellet” de cada una de las proteínas del que se guardó una muestra para su posterior análisis.

Las muestras de “pellet” se sometieron a ruptura celular y se guardó una alícuota del sobrenadante.

Antes de realizar la purificación de las proteínas, las muestras guardadas de muestra sin inducir, de “pellet” inducido y de sobrenadante inducido se analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 15% para estudiar en que fracción de las mencionadas se expresaban las proteínas.

Se comprobó que, como se esperaba, la fracción con mayor nivel de expresión de las proteínas era el sobrenadante tras la inducción con IPTG.

3.3. Purificación con columna de maltosa y corte con proteasa de TSR23

Las muestras de proteína obtenidas tras la lisis celular se purificaron mediante el uso de columna de maltosa siguiendo el protocolo descrito para la purificación de la proteína TSR1. Se guardaron tanto las fracciones eluidas como las correspondientes al flujo a través de la columna y al lavado para su posterior análisis. El volumen total de fracción eluída fue de unos 20 ml por muestra.

Se cuantificaron las fracciones eluidas, donde deberían aparecer nuestras proteínas, mediante el método de Bradford, ante la poca absorbancia mostrada el volumen de muestra para la cuantificación en este caso fue de 5 μ l, dándonos un valor de absorbancia de 0,15uds.

$$\text{TSR23} : 0,15/0,086 \times 5 = 0,35 \text{ mg/ml en } 20 \text{ ml} \rightarrow 0,35 \times 20 = 7 \text{ mg de proteína}$$

Nota: el proceso de purificación del cultivo de la proteína TSR12 no se realizó en este trabajo sino en uno anterior a la purificación de TSR23.

Con estos datos añadimos 0,7 mg de proteasa para conseguir una proporción 1:10 (10 veces mayor de lo habitual), dada la baja cantidad de proteína y tras haber comprobado que en la proteína TSR12 la proteasa de precisión apenas cortaba y se dejó cortar durante un fin de semana.

El análisis de las muestras de flujo a través de la columna, eluído tras corte con proteasa y lavado se realizó mediante electroforesis en gel de acrilamida al 15%. Conjuntamente se analizaron muestras de “pellet” y sobrenadante de la proteína en el mismo gel.

Los resultados nos indican que en ninguno de los dos casos se produjo corte de la proteína por la proteasa de precisión.

DISCUSIÓN

El estudio del proceso de O-fucosilación ha adquirido gran importancia en los últimos años debido a la relevancia biológica que implican los procesos de glicosilación en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos de los organismos.

En el proceso de O-fucosilación están implicadas dos proteínas, POFUT1 y POFUT2, que fucosilan los dominios EGF y TSR respectivamente. Recientemente se ha conseguido la estructura cristalina tanto de POFUT1 (Lira-Navarrete et al., 2011) como de la POFUT2 (Chen C. et al., 2012) así como del dominio TSR (Tan K. et al., 2002) (Page R.C. et al., 2011).

Sin embargo en el caso de la proteína POFUT2 y los dominios TSR, todavía son muy escasos los estudios realizados y es de gran interés biológico y científico el buscar respuestas a las funciones que estas moléculas llevan a cabo en los organismos y cómo influyen en el metabolismo de los mismos.

En el presente trabajo se ha realizado la expresión y purificación de los diferentes dominios TSR trabajando por separado con el dominio TSR123 y los subdominios TSR1, TSR12 y TSR23, optimizando los protocolos de expresión y purificación conocidos con el objetivo de obtener muestras de las proteínas en condiciones óptimas para la co-cristalización con la proteína POFUT2.

En el caso de las proteínas TSR12 y TSR23 el trabajo ha estado dirigido a estudiar la eficiencia de los procesos de expresión en *E. coli* y de purificación de las muestras obtenidas para comprobar si podíamos obtener muestras purificadas mediante el uso de la proteasa de precisión.

Los resultados del trabajo han revelado que la expresión de las proteínas en células de *E. coli* en las condiciones realizadas es óptima, así como la inducción del crecimiento celular mediante la adición de IPTG en los cultivos de todas las proteínas expresadas.

Los procesos de purificación han demostrado la eficacia del uso de columnas de níquel para purificar la TSR123 gracias a la presencia de las colas de histidina en el vector de clonación.

La utilización de columnas de unión a maltosa y GST resultó efectiva a la hora de purificar una cantidad considerable de nuestra proteína, si bien se comprobó que el tratamiento de las muestras purificadas con este método con la proteasa de precisión produjo un corte de aproximadamente el 50%, lo que resultó en una pérdida significativa de muestra de proteína en los casos de la TSR123, en este punto se probaron modificaciones tanto en la concentración de sal de las soluciones tampón como en las condiciones de temperatura para la reacción con la proteasa que no revelaron mejoras significativas en el proceso. El corte en la proteína TSR1 tuvo una eficacia del 100%.

En las pruebas realizadas para la TSR12 y la TSR23 se comprobó que la eficacia del corte con la proteasa de precisión fue prácticamente nula, lo cual sugiere que nuevas metodologías deberían ser empleadas.

La filtración en gel realizada para la eliminación de oligómeros de TSR123 y la purificación de TSR1 resultó satisfactoria como se comprobó en los análisis posteriores.

En el grupo se obtuvieron cristales de las muestras de co-elución de las proteínas POFUT2 y TSR123. Se difractaron en una fuente de luz ALBA a 2,5Å de resolución. Desafortunadamente el análisis de la estructura reveló que los datos correspondían únicamente a la estructura de la proteína TSR123 y no al complejo de ambas proteínas.

CONCLUSIONES

- Se ha logrado la expresión y purificación de la TSR123 y TSR1.
- La TSR12 y TSR23 se lograron expresar aunque no purificar.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Chen CI, Keusch JJ, Klein D, Hess D, Hofsteenge J, Gut H. Structure of human POFUT2: insights into thrombospondin type 1 repeat fold and O-fucosylation. *EMBO J*. 2012 May 15. doi: 10.1038/emboj.2012.143.
- Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Dec;15(6):637-45. Epub 2005 Nov 2.
- Du J, Takeuchi H, Leonhard-Melief C, Shroyer KR, Dlugosz M, Haltiwanger RS, Holdener BC (2010) O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats restricts epithelial to mesenchymal transition (EMT) and maintains epiblast pluripotency during mouse gastrulation. *Dev Biol* 346: 25–38.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Journal of Molecular Biology* **166** (4): 557–580.
- Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ. The effect of the *lacy* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and in *Pseudomonas fluorescens*. *Curr Microbiol*. 1998. Jun; 36(6):341-7
- Harper S, Speicher D. W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol*. 2011;681:259-80.
- Harris RJ, Spellman MW (1993) O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* 3: 219–224.
- Henrissat B, Sulzenbacher G, Bourne Y. Glycosyltransferases, glycoside hydrolases: surprise, surprise!. *Curr Opin Struct Biol*. 2008 Oct;18(5):527-33. Epub 2008 Oct 1.
- Hofsteenge J, Huwiler KG, Macek B, Hess D, Lawler J, Mosher DF, Peter-Katalinic J (2001) C-mannosylation and O-fucosylation of the Thrombospondin Type 1 Module. *J Biol Chem* 276: 6485–6498.

- Kuroki M, Napathorn SC. High expression of fusion proteins consisting of a single-chain variable fragment antibody against a tumor associated antigen and interleukin-2 in *Escherichia coli*. *Anticancer Res.* 2014 Aug;34(8):3937-46.
- Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol.* 2000.
- Lira-Navarrete E, Valero-González J, Villanueva R, Martínez-Júlvez M, Tejero T, Merino P, Panjikar S, Hurtado-Guerrero R (2011) Structural insights into the mechanism of protein O-fucosylation. *PLoS One* 6: e25365.
- Luther KB, Haltiwanger RS (2009) Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1011–1024.
- Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Höök M. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell.* 1992.
- Page RC, Klenotic PA, Misra S, Silverstein RL. Expression, purification and structural characterization of functionally replete thrombospondin-1 type 1 repeats in a bacterial expression system. *Protein Expr Purif.* 2011 Dec;80(2):253-9.
- Richard P. Tucker, The thrombospondin type 1 repeat superfamily, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 36, Issue 6, June 2004, Pages 969-974, ISSN 1357-2725.
- Tan K, Duquette M, Liu JH, Dong Y, Zhang R, Joachimiak A, Lawler J, Wang JH (2002) Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: a novel layered fold and its biological implication. *J Cell Biol* 159: 373–382.

ANEXO I. Características de las proteínas.

POFUT2

Secuencia:

EKKFLLYDVNFGEGFNLRRDVYMRVANTVRSRDRSGENYILVLPWGRLLHHW
KRMEVALSWRLFFDLESLNRFIPVIEFEDFLDENRPIDQVIYLQHYAEGWGTEY
VRKFEKRSCLPPAESHYKQVEEFKWKGFYSYEDVYSRNFQCVSIQGDSGTLK
DLLKHSNFSESTSIMVDRAETILHEHYGEVDYWKARRSMRYSNDLVDVADAFR
KKYLDSDDKRDKTKLVDDWTKEKPRRTAIGGPYLGHWRRRDFLYAKKAQLP
TIPGTAKILQDLCKKLDLQKIYLATDAPDQEVDELKALLNGELEVYRFTDTQKL
NDGQIAIIDQYLCAAHAAFIGSYESTFTFRIQEDREIIGFPSTTFNRLCPDTEPTCE
QPAKWKIVY

PI/Mw:

6.07 / 45604.70

Coefficiente de extinción molar (ϵ): 88155 M⁻¹cm⁻¹

TSR123

Secuencia:

GPGSADDGWSPWSEWTSCSTSCGNGIQQRGRSCDSLNNRCEGSSVQTRTCHIQ
ECDKRFKQDGGWSHWSPWSSCVTCGDGVITRIRLCNSPSPQMNGKPCGEAR
ETKACKKDACPINGGWGPWSPWDICSVTCGGGVQKRSRLCANNPTQFGGKDC
VGDVTENQICNKQDCPIDG

PI/Mw:

6.82 / 19126.12

Coefficiente de extinción molar (ϵ): 49500 M⁻¹cm⁻¹

TSR1

Secuencia:

GPGSADDGWSPWSEWTSCSTSCGNGIQQRGRSCDSLNNRCEGSSVQTRTCHIQ
ECD

PI/Mw:

4.65 / 6038.40

Coefficiente de extinción molar (ϵ): 16500 M⁻¹cm⁻¹

TSR12

Secuencia:

GPGSADDGWSPWSEWTSCSTSCGNGIQQRGRSCDSLNNRCEGSSVQTRTCHIQ
ECDKRFKQDGGWSHWSPWSSCSVTCGDGVITRIRLCNSPSPQMNGKPCEGEAR
ETKACKKDACPI

PI/Mw:

7.61 / 12847.16

Coefficiente de extinción molar (ϵ): 33000 M⁻¹cm⁻¹

TSR23

Secuencia:

KRFKQDGGWSHWSPWSSCSVTCGDGVITRIRLCNSPSPQMNGKPCEGEARETK
ACKKDACPINGGWGPWSPWDICSVTCGGGVQKRSRLCENNPTPQFGGKDCVGD
VTENQICNKQDCPIDG

PI/Mw:

8.29 / 13105.74

Coefficiente de extinción molar (ϵ): 33000 M⁻¹cm⁻¹

Nota: todos los puntos isoeléctricos, pesos moleculares y coeficientes de extinción molar de las proteínas se han obtenido a partir de sus respectivas secuencias mediante la herramienta ProtParam de EXPASY®.

ANEXO II. Relación de abreviaturas.

APS: Persulfato amónico.

BSA: Bovine Serum Albumin.

EGF: Epidermal Growth Factor-Like.

GDP: Guanosina Difosfato.

GST: Glutation-S-Transferase.

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

LB: Lysogeny Broth.

MBP: Maltose Binding Protein.

MQ: MiliQ.

Mw: Molecular Weight.

PEG: Polietilen Glicol.

PI: Punto Isoeléctrico.

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride.

POFUT: Protein O-Fucosyltransferase.

PP: Precision Protease.

TEMED: N,N,N',N'--- tetrametiletlenodiamina.

TGF- β : Transforming Growth Factor type β .

TSP: Thrombospondin.

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano.

TSR: Thrombospondin Repeats type I.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

SOC: Super Optimal broth with Catabolite repression.