



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

“Obtención de un sistema redox de interés biotecnológico:
clonaje, expresión y purificación de dos tiorredoxinas
bacterianas.”

Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología dirigido por
María F. Fillat y Andrés González

Claudia Guerrero Perales

Curso 2017/2018

Doña María Francisca Fillat Castejón, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y Don Andrés González Rodríguez, Investigador del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón y Profesor Colaborador Extraordinario del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

Que el Trabajo de Fin de Grado titulado “Obtención de un sistema redox de interés biotecnológico: clonaje, expresión y purificación de dos tiorredoxinas bacterianas”, presentado por Claudia Guerrero Perales, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y reúne los requisitos para ser presentado por su autora para optar al Grado en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, a 20 de junio de 2018.

Fdo. María F. Fillat Castejón

Fdo. Andrés González Rodríguez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen/Abstract	1
2. Antecedentes	2
2.1. Las cianobacterias	2
2.2. Estrés oxidativo y homeostasis del hierro en cianobacterias	2
2.3. Las proteínas Fur	3
2.4. FurA de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	3
2.5. Las tiorredoxinas	4
2.6. Las tiorredoxinas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	4
3. Objetivos	5
4. Materiales y métodos	6
4.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo empleados	6
4.2. Clonaje de <i>alr0052</i> y <i>all2341</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	6
4.2.1. Purificación de DNA genómico de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	6
4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	7
4.2.3. Electroforesis de DNA	7
4.2.4. Aislamiento, purificación y cuantificación de DNA	7
4.2.5. Doble digestión y ligación	7
4.2.6. Preparación de células quimiocompetentes	8
4.2.7. Transformación de células quimiocompetentes	8
4.3. Expresión de la tiorredoxina A (TrxA) y la tiorredoxina All2341 de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en <i>E.coli</i>	8
4.3.1. Ensayo de expresión de las proteínas recombinantes.....	8
4.3.2. Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE)	9
4.3.3. Sobreexpresión y obtención de biomasa	9
4.4. Purificación y caracterización de TrxA y la tiorredoxina All2341 de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	10
4.4.1. Empaquetamiento y equilibrado de la columna	10
4.4.2. Obtención del extracto crudo	10
4.4.3. Purificación por cromatografía de afinidad por unión a metales	10
4.4.4. Diálisis de la proteína	11
4.4.5. Cuantificación de la proteína	11
4.4.6. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad disulfuro reductasa	11
4.4.7. Entrecruzamiento de TrxA y la tiorredoxina All2341 con proteínas FUR.....	11
5. Resultados	12
5.1. Clonaje de los genes <i>alr0052</i> y <i>all2341</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en el vector de expresión pET-28a	12
5.1.1. Amplificación de los genes de interés y clonaje... ..	12
5.1.2. Identificación de clones recombinantes y aislamiento de los vectores de interés.....	13

5.2. Expresión de la tiorredoxina A (TrxA) y la tiorredoxina All2341 de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en <i>E. coli</i>	14
5.2.1. Ensayo de expresión de las proteínas recombinantes	14
5.2.2. Sobreexpresión y obtención de biomasa	15
5.3. Purificación de TrxA y la tiorredoxina All2341 de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	16
5.4. Evaluación de la actividad biológica de las tiorredoxinas recombinantes.....	17
5.4.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad disulfuro reductasa	17
5.4.2. Estudio de la interacción de TrxA y All2341 con las proteínas FUR mediante entrecruzamiento con glutaraldehído	18
6. Discusión	20
7. Conclusiones/Conclusions	23
8. Bibliografía	24
9. Anexos	26

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 5.1. Amplificación de los insertos	12
Figura 5.2.A. PCR de colonias transformadas con pET-28a: <i>alr0052</i>	13
Figura 5.2.B. PCR de colonias transformadas con pET-28a: <i>all2341</i>	13
Figura 5.3. Ensayo de expresión de TrxA recombinante	14
Figura 5.4. Ensayo de expresión de la tiorredoxina All2341 recombinante	15
Figura 5.5. Sobreexpresión de TrxA y All2341.....	15
Figura 5.6. Purificación de TrxA y All2341	16
Figura 5.7. Actividad disulfuro reductasa de TrxA y All2341	17
Figura 5.8. Entrecruzamiento de TrxA y FurA, y All2341 y FurA	18
Figura 5.9. Entrecruzamiento del mutante C104S y TrxA, el mutante C104S y All2341, el mutante C144S y TrxA, y el mutante C144S y All2341	19
Figura 5.10. Entrecruzamiento de FurB y TrxA, FurB y ALL2341, FurC y TrxA, y FurC y All2341	19
Figura 9.1. Mecanismo de la actividad disulfuro reductasa	26
Figura 9.2. Estructura del plásmido pET-28a.....	27
Tabla 5.1. Comparación de los procesos de purificación de TrxA y ALL234...17	
Tabla 5.2. Actividad disulfuro reductasa de TrxA, All2341 y DsbC	18
Tabla 9.1. Tiorredoxinas y tiorredoxinas reductasas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 según la <i>Cyanobase</i>	26
Tabla 9.2. Características de las cepas utilizadas	27
Tabla 9.3. Programas de PCR utilizados para los dos genes amplificados y las dos DNA polimerasas utilizadas	28
Tabla 9.4. Mezclas de reacción utilizadas en PCR	28
Tabla 9.5. Oligonucleótidos empleados en PCR	29
Tabla 9.6. Composición de los geles de poliacrilamida al 17% utilizados en las electroforesis desnaturizantes de proteínas (SDS-PAGE)	29

ABREVIATURAS

-Abs: Absorbancia

-C: Cisteína

-DNA: Ácido desoxirribonucleico (ADN)

-dNTPs: Mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfato

-D.O.: Densidad óptica

-DsbA: *Disulfide bond protein A*

-DsbC: *Disulfide bond protein C*

-DTT: 1,4-ditiotreitol

-EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

-G: Glicina

-g: Gramos

-h: Horas

-IMAC: *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (cromatografía de afinidad por unión a metales)

-IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

-K: Lisina

-kDa: Kilodalton

-Km: Kanamicina

-L: Litros

-l: Longitud de la cubeta

-LB: Luria-Bertani

-M: Concentración Molar

-mA: Miliamperio

-min: Minutos

-mL: Mililitros

-mM: Milimolar

-mV: Milivoltios

-ng: Nanogramos

-nm: Nanómetros

-O/N: *Overnight* (toda la noche)

-P: Prolina

-pb: Pares de bases

-PCC: Colección de cultivos del *Institut Pasteur*

-PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

-pI: Punto isoeléctrico

-PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

-PSA: Persulfato amónico

-p/v: Relación peso/volumen

-rpm: Revoluciones por minuto

-s: Segundos

-SDS: Dodecilsulfato sódico

-TA: Temperatura ambiente

-TBE: Tris Borato EDTA

-TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina

-TrxA: Tiorredoxina A

-U: Unidad de actividad enzimática

-V: Valina

-v/v: Relación volumen/volumen

-W: Triptófano

-°C: Grados centígrados

-ε: Coeficiente de extinción molar

-μg: Microgramos

-μL: Microlitros

-μM: Micromolar

-μm: Micrometros

1. RESUMEN

El control de la homeostasis del hierro es indispensable para evitar daños celulares. Para ello, gran parte de los procariotas poseen las proteínas Fur (Ferric uptake regulator). Fur es una proteína que actúa como regulador de la transcripción de genes implicados en el metabolismo del hierro. El parálogo de Fur en *Anabaena* sp. PCC 7120 es FurA. Recientemente, se ha descrito que FurA, además de ejercer su función reguladora presenta actividad disulfuro reductasa. En esta actividad se encuentran implicados sus motivos redox C₁₀₁VKC₁₀₄ y C₁₄₁PKC₁₄₄. Este resultado podría indicar la interacción de FurA con otras proteínas de la célula en reacciones redox. En este trabajo se llevó a cabo el clonaje y expresión de las tiorredoxinas TrxA y All2341 recombinantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 en *Escherichia coli* y su purificación mediante cromatografía de afinidad, con el objetivo de estudiar su potencial interacción con FurA y otras proteínas de la familia FUR. Los resultados mostraron que no existe una interacción directa entre las tiorredoxinas TrxA y All2341 y las proteínas de la familia FUR. Sin embargo, la presencia de TrxA parece favorecer la estabilidad de los dímeros de las proteínas de la familia FUR. Además, en esta estabilización podrían estar implicados los residuos de cisteína C₁₀₄ y C₁₄₄ que se encuentran presentes en los motivos redox de FurA.

1. ABSTRACT

Control of iron homeostasis is important to avoid cellular damages. A big part of the prokaryotes have Fur proteins (Ferric uptake regulator) to control iron homeostasis. Fur is a protein which performs as a transcription regulator of genes involved in iron metabolism. The paralogous gene of Fur in *Anabaena* sp. PCC 7120 is FurA. Recently, it has been described that FurA, in addition to her regulatory function, it presents a disulfide reductase activity. The redox motifs C₁₀₁VKC₁₀₄ y C₁₄₁PKC₁₄₄ are involved in this activity. This result could show the interaction of FurA with others proteins of the cell in redox reactions. In this project, the cloning and the expression of the recombinants thioredoxins TrxA and All2341 of *Anabaena* sp. PCC 7120 in *Escherichia coli* and its purification by using affinity chromatography was carried out with the aim to analyze its potential interaction with FurA and other proteins of FUR family. The results showed no evidence of direct interaction between the thioredoxins TrxA and All2341 and proteins of FUR family. Nevertheless, the presence of TrxA could increase the stability of the dimers of FUR family. In addition, the cysteine residues C₁₀₄ y C₁₄₄, which are in redox motifs of FurA, could be involved in this stabilization.

2. ANTECEDENTES

2.1. Las cianobacterias.

Las cianobacterias constituyen un grupo muy diverso de eubacterias que se caracterizan por realizar la fotosíntesis oxigénica, similar a la de los cloroplastos de las algas y las plantas superiores. Debido a la capacidad de las cianobacterias de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, su aparición en la Tierra hace aproximadamente 3000 millones de años permitió que la atmósfera pasara de un estado original reducido a otro oxidado, y que se formara la capa de ozono, que protegería de la radiación ultravioleta (Schopf, 2010).

Las cianobacterias contribuyeron al desarrollo de los eucariotas fotosintéticos, ya que, de acuerdo con la teoría endosimbiótica propuesta por Mereschkowsky en 1905, los cloroplastos de las células vegetales proceden de las cianobacterias. Esta teoría fue demostrada posteriormente en los años 60 por Lynn Margulis (Green, 2010).

Para desarrollar una fotosíntesis oxigénica, las cianobacterias poseen un aparato fotosintético formado por dos fotosistemas localizados en las membranas tilacoidales. Los centros de reacción de estos fotosistemas se caracterizan por poseer como pigmento básico la clorofila tipo *a*, a excepción de algunos tipos de cianobacterias. Además, asociados al fotosistema II, las cianobacterias poseen ficobilisomas que poseen clorofila *a* y ficobiliproteínas que actúan como complejos antena. Las cianobacterias juegan un importante papel en la aportación de nutrientes a los ciclos del carbono y del nitrógeno y en la producción primaria de los océanos por medio de la fijación del nitrógeno atmosférico (Bothe et al., 2010).

2.2. Estrés oxidativo y homeostasis del hierro en cianobacterias.

El hierro es un metal esencial para la mayoría de los microorganismos, interviniendo en gran cantidad de procesos biológicos. Concretamente, las cianobacterias necesitan 10 veces más hierro que otras bacterias no fotosintéticas ya que el hierro forma parte de los aparatos fotosintéticos (Ferreira y Straus, 1994). El hierro es un metal de transición muy abundante en la corteza terrestre. En el interior de los microorganismos, el hierro participa en la fotosíntesis, fijación de nitrógeno, metanogénesis, ciclo del ácido tricarbóxico, regulación génica y síntesis del DNA. Su capacidad para incorporarse a las proteínas en diversas formas (especie mono o binuclear o como clústers sulfoférricos y los grupos hemo) permite su versatilidad funcional. Esta variabilidad le permite adquirir el potencial redox (-300 a +700 mV), geometría y estado de spin necesarios para llevar a cabo la función biológica requerida (Andrews et al., 2003).

La aparición de la fotosíntesis oxigénica hace 3 billones de años provocó el aumento de los niveles de oxígeno en la atmósfera y la química del hierro cambió considerablemente. Hasta entonces su estado predominante había sido el estado ferroso, que es relativamente soluble, con el cambio atmosférico la forma predominante pasó a ser el estado férrico, muy insoluble. Además, el ión férrico reacciona rápidamente con oxígeno para dar lugar a óxidos e hidróxidos insolubles a pH fisiológico. Todo esto provocó una reducción de la biodisponibilidad del hierro (Andrews et al., 2003). Además, la capacidad del hierro de catalizar la reacción de Fenton genera radicales hidroxilo muy perjudiciales para los seres vivos, convirtiendo al hierro libre en una especie altamente tóxica para las células. En tal sentido, los organismos procariotas desarrollaron estrategias para enfrentarse a la deficiencia de hierro y a su potencial papel citotóxico.

Por lo tanto, la homeostasis del hierro está estrechamente relacionada con la homeostasis redox en cianobacterias para lo cual son cruciales las proteínas FUR (Ma et al., 2009) y otras proteínas redox como la peroxirredoxinas, glutarredoxinas y tioredoxinas. Las proteínas FUR actúan como reguladores transcripcionales de genes que intervienen en el transporte y metabolismo de los metales para mantener la homeostasis de los mismos en el interior celular. Dependiendo de su metal regulador, las proteínas Fur se engloban dentro de distintas subfamilias Fur (*Ferric uptake regulator*), Zur (*Zinc uptake regulator*), Mur (*Manganese uptake regulator*), Nur (*Nickel uptake regulator*), PerR (*Peroxide regulon repressor*) y Irr (*Iron response regulator*) (Fillat, 2014).

2.3. Las proteínas Fur.

Las proteínas Fur regulan la homeostasis del hierro, actuando generalmente como un correpressor clásico: cuando el metal co-represor (Fe^{2+}) se encuentra en alta concentración, ocupa los sitios reguladores de la proteína Fur (Pohl et al., 2003) y esta reprime la transcripción de los genes de la adquisición del hierro. Cada monómero de Fur une un ión ferroso en el sitio regulador y adquiere la forma dimérica activa, que interacciona con las regiones promotoras de los genes diana. Por el contrario, en condiciones de baja concentración de hierro, la proteína se encuentra en su forma apo y se disocia del DNA, permitiendo su transcripción. El dominio N-terminal que presenta una estructura hélice-giro-hélice es el dominio encargado de la unión al DNA, mientras que el dominio C-terminal es el encargado de la dimerización. Este último dominio contiene un motivo rico en histidinas ($\text{H}_2\text{XHX}_2\text{CX}_2\text{C}$) (Fillat, 2014). Respecto al sitio de unión al DNA, el complejo Fur- Fe^{2+} en *E. coli* se une normalmente entre los sitios -10 y -35 de los promotores de los genes a reprimir. Estos sitios de unión contienen las denominadas *Fur boxes*, que constan de una secuencia consenso palindrómica de 19 pb (De Lorenzo et al., 1987). Se han observado casos en los que los genes son reprimidos por la forma apo de Fur en lugar de por la forma unida al metal. El gen de la ferritina de *H. pylori*, *pfr*, se encuentra reprimido en deficiencia de hierro por la unión de apo-Fur al promotor. También se ha observado represión mediada por apo-Fur de los genes de SodB, HydA y citocromo c553 en *H. pylori* (Ernst et al., 2005; Carpenter et al., 2013). Además de actuar como represor, Fur también ejerce como activador de algunos genes, principalmente de aquellos que codifican proteínas de almacenamiento y empleo de hierro. En situaciones en las cuales los niveles de hierro son elevados, Fur se une al DNA impidiendo la transcripción de RNAs antisentido que se une a los RNA mensajeros de estos genes impidiendo la síntesis de proteínas codificadas por los mismos (Masse y Gottesman, 2002). Fur también actúa como activador transcripcional directo de algunos genes, sin intervención de RNAs antisentido, mediante la competencia de Fur con un represor por la unión al DNA o mediante el posicionamiento directo de la RNA polimerasa (Fillat, 2014).

El mecanismo principal de regulación de Fur suele ser el nivel transcripcional, se ha descrito la autorregulación negativa de Fur en diversos microorganismos como en *E. coli* (De Lorenzo et al., 1988). Aunque también se ha descrito regulación de Fur a nivel postranscripcional y postraduccional (Hernández et al., 2006b, Hernández et al., 2004).

2.4. FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120.

FurA es una proteína de 151 aminoácidos y contiene la secuencia rica en histidinas característica de las proteínas Fur. Contiene además cinco residuos de cisteína, cuatro de ellos dispuestos en motivos CXXC ($\text{C}_{101}\text{VKC}_{104}$ y $\text{C}_{141}\text{PKC}_{144}$), y uno aislado (C_{133}) que se encuentra

muy conservado entre las distintas Fur de cianobacterias (Fillat, 2014). Estos motivos CXXC se encuentran en el sitio de unión a metal estructural, necesario para mantener la conformación proteica adecuada. FurA es el miembro más abundante de la familia Fur en *Anabaena* sp. PCC 7120 y constituye una proteína esencial y altamente conservada en cianobacterias (González et al., 2016). Como regulador transcripcional interviene en la captación de hierro y su almacenamiento (González et al., 2012) y participa en la regulación de numerosas vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y la fotosíntesis entre otros procesos (González et al., 2013, González et al., 2010, González et al., 2014). La unión de la proteína con el DNA se produce siempre en condiciones reductoras y en presencia del metal co-represor, por lo que su actividad dependería tanto de la biodisponibilidad de hierro como del estado redox de la célula (Hernández et al., 2006a).

Recientemente se ha visto la implicación de los residuos de cisteína de los motivos C₁₀₁VKC₁₀₄ y C₁₄₁PKC₁₄₄ en una nueva actividad atribuida a esta proteína, la actividad disulfuro reductasa. Los potenciales redox determinados para estos motivos fueron de -235 mV y -238 mV respectivamente y son valores muy próximos a los del citoplasma celular (-220 mV y -240 mV) (Botello-Morte et al., 2016, Botello-Morte et al., 2014). Por lo tanto, no se puede descartar una posible interacción redox de FurA con tiorredoxinas y/u otras proteínas redox de la célula.

2.5. Las tiorredoxinas.

Las tiorredoxinas son proteínas globulares de pequeño tamaño. Se encuentran en todos los organismos y presentan una estructura característica denominada plegamiento “tipo tiorredoxina”. Este plegamiento consiste en cuatro o cinco hojas plegadas β centrales rodeadas por tres o más α -hélices (Martin, 1995). Las tiorredoxinas se caracterizan por contener un sitio activo redox conservado cuya secuencia de aminoácidos es WC(G/P)PC (Wolosiuk, 2016). Ambas cisteínas pueden encontrarse en estado oxidado formando puentes disulfuro, o reducido como grupos sulfhidrilos (con potenciales redox comprendidos entre -270 y -300 mV) lo que permite que las tiorredoxinas puedan actuar como oxidorreductasas reduciendo enlaces disulfuro de otras proteínas dianas. La principal función de las tiorredoxinas, entre otras, es el control en la respuesta a estrés oxidativo (Zeller y Klug, 2006). Además, la sobreexpresión de tiorredoxinas ha sido utilizada para dotar de ventajas agronómicas a los cultivos, por lo que las tiorredoxinas constituyen un grupo de proteínas de alto interés biotecnológico (Universidad Pública de Navarra, 2011).

Respecto al mecanismo de acción de las tiorredoxinas, el mismo es un proceso secuencial en el que participan ambas cisteínas del sitio activo redox. La cisteína más próxima al extremo N-terminal realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace disulfuro de la proteína diana, quedando unida a ésta transitoriamente mediante un enlace disulfuro intermolecular que luego es atacado por la segunda cisteína del centro activo de la tiorredoxina, formándose un nuevo enlace intramolecular entre las dos cisteínas de la tiorredoxina, quedando ésta oxidada y la proteína diana reducida y libre (Holmgren, 1995) (**Figura 9.1.** del Anexo). La regeneración de la tiorredoxina oxidada es llevada a cabo mediante la acción de tiorredoxinas reductasas.

2.6. Las tiorredoxinas de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Dado el papel esencial del control redox en las cianobacterias, *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta una variedad de genes implicados en la síntesis de tiorredoxinas y tiorredoxinas reductasas que se encuentran recogidas en la **Tabla 9.1.** del Anexo.

3. OBJETIVOS

-Objetivo general:

Producir dos tiorredoxinas cianobacterianas activas de interés biotecnológico por vía recombinante y estudiar su posible interacción con los parálogos de la familia FUR de *Anabaena*. Para ello, se marcaron los siguientes objetivos específicos:

-Objetivos específicos:

1. Clonar los genes *alr0052* y *all2341* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en el plásmido pET-28a.
2. Optimizar de las condiciones de expresión recombinante de TrxA y All2341 empleando el sistema BL21(DE3)/ pET-28a.
3. Purificar las tiorredoxinas TrxA y All2341 por cromatografía de afinidad de unión a metales (IMAC) con un grado de pureza adecuado y manteniendo su actividad biológica.
4. Comprobación de la actividad biológica de ambas tiorredoxinas mediante la evaluación de su actividad disulfuro reductasa.
5. Explorar la posible interacción de ambas tiorredoxinas con proteínas de la familia FUR de *Anabaena* sp. PCC 7120; FurA, FurB y FurC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo empleados.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron dos cepas distintas de *E.coli*, la primera de ellas *E.coli* DH5 α para la propagación del plásmido recombinante y la segunda *E.coli* BL21(DE3) para llevar a cabo la sobreexpresión de las proteínas deseadas. Las características de ambas se encuentran recogidas en la **Tabla 9.2.** del Anexo. También se realizaron cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Instituto Pasteur, París, Francia) con el fin de extraer DNA genómico para llevar a cabo la amplificación de los genes de interés.

Para el clonaje y la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó el plásmido pET-28a (Novagen) cuya estructura se encuentra en la **Figura 9.2.** del Anexo. Este plásmido presenta un gen de resistencia a kanamicina (Km^R) y un sitio de clonaje múltiple que permite la inclusión de genes, bajo el control de un promotor inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Se trata del promotor de la T7 RNA polimerasa del fago T7. Este promotor permite un alto nivel de expresión de proteínas. Además, el vector pET-28a permite incorporar a la proteína recombinante una cola de histidinas al extremo N-terminal o C-terminal, permitiendo realizar una purificación de la proteína mediante una cromatografía de afinidad por unión a metales (IMAC).

Los cultivos en medio líquido de *E.coli* requeridos durante el desarrollo del clonaje y la posterior expresión de la proteína recombinante fueron realizados en medio Luria-Bertani (LB) compuesto por 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura, agitando a 200 rpm a 37 °C. En cuanto a los cultivos en medio sólido, contenían la misma composición que los anteriores junto con un suplemento de agar al 1,5%. Los cultivos en medio sólido fueron incubados a 37°C en una estufa durante toda la noche (O/N). Ambos cultivos fueron suplementados con kanamicina a la concentración de 50 μ g/mL (LBK) en los casos necesarios.

4.2. Clonaje de *alr0052* y *all2341* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

4.2.1. Purificación de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Para llevar a cabo la purificación de DNA genómico de *Anabaena* se partió de un cultivo de 50-100 mL de la cianobacteria, crecido en medio BG11 hasta alcanzar un contenido de clorofila de 5-6 μ g/mL y una D.O._{750nm}=1,5. El cultivo con estas condiciones se centrifugó en tubos Falcon a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Se desechó el sobrenadante, se homogenizó el precipitado con el medio remanente y se distribuyó en dos eppendorf. Los dos tubos eppendorf fueron centrifugados nuevamente a 8000 rpm durante 2 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación, el precipitado fue resuspendido en 400 μ L de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA). Tras las resuspensión, se añadieron 20 μ L de 10% SDS, 450 μ L de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y 150 μ L de perlas de vidrio (Sigma G-9268). Se realizaron 4 ciclos (1 min en vortex y 1 min en hielo). Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y se transfirió la fase superior transparente a un eppendorf limpio. Se lavó con 1V de fenol, 1V de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y dos lavados sucesivos con 1V de cloroformo (recuperando la fase superior acuosa en todos los casos). A la fase superior acuosa del último lavado se le añadió 0,1V de 3M de NaAc y 2V de etanol absoluto frío. La mezcla se

homogenizó y se incubó a -80°C O/N. Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se lavó con 500 µL de etanol al 70% frío y se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó minuciosamente el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Por último, se resuspendió el precipitado en 30 µL de agua miliQ estéril y se cuantificó el DNA con el sistema Nano Value Plus (GE Healthcare). El DNA genómico así purificado fue conservado a -20°C.

4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica PCR fue utilizada en este trabajo para la amplificación de los genes *alr0052* y *all2341* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Los programas utilizados para dichas amplificaciones se encuentran recogidos en la **Tabla 9.3.** del Anexo. Se utilizaron dos DNA polimerasas distintas, para optimizar las condiciones de la PCR y las PCRs en colonias se utilizó la enzima *Taq* polimerasa (Biotools) y para llevar a cabo las PCR con las condiciones optimizadas se utilizó *Pfu Ultra* (Stratagene) que presenta actividad exonucleasa 3'-5' y logra una mayor fidelidad de copia. Como DNA molde se utilizó el DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 previamente purificado o directamente la colonia en el caso de las PCR en colonias. Las mezclas de reacción empleadas se encuentran en la **Tabla 9.4.** del Anexo. Los oligonucleótidos (Biomers) utilizados se encuentran en la **Tabla 9.5.** del Anexo y fueron diseñados con el programa bioinformático Vector NTI (Invitrogen).

4.2.3. Electroforesis de DNA.

La electroforesis de DNA fue utilizada en este trabajo para verificar la identidad de los productos de PCR, la eficiencia de las digestiones enzimáticas y los clonajes. Se utilizaron geles de agarosa del 0,8-1% en 50 mL de tampón TBE 1X (90 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Las electroforesis se realizaron a voltajes comprendidos entre 90-100 voltios. El patrón de peso molecular utilizado fue 1 Kb Gene Ruler (Thermo Scientific) y el tampón de carga fue DNA Loading 6X (Thermo Scientific). Por último, para la visualización del DNA se utilizó el sistema Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

4.2.4. Aislamiento, purificación y cuantificación de DNA.

Para llevar a cabo la extracción de los plásmidos se utilizó el kit comercial *GenElute Plasmid Mini-prep Kit* (Sigma). Para la purificación de los productos de PCR y los productos de digestiones se utilizó el kit comercial *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Por último, se utilizó el sistema Nano Value Plus™ (GE Healthcare) que permite estimar la concentración de DNA mediante espectroscopía de absorción molecular.

4.2.5. Doble digestión y ligación.

Para llevar a cabo los clonajes se realizaron dobles digestiones, tanto del plásmido pET-28a como de los productos de PCR, se mezclaron 5 µg de DNA (de vector pET-28a o de producto de PCR según la digestión a realizar, empleando a la vez las dos enzimas de restricción con un único buffer donde ambas tenían actividad) con *HindIII* (Fermentas, 10 U/µL), *NdeI* (Fermentas, 10 U/µL) y *Buffer Red R* (Fermentas). Las digestiones se realizaron a 37°C durante toda la noche (O/N).

Una vez purificado el plásmido y los productos de PCR digeridos, se llevó a cabo la ligación del vector con cada producto de PCR. Para ello se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Promega) y el

2X *Rapid Ligation Buffer* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación, se dejó a 4°C O/N.

4.2.6. Preparación de células quimiocompetentes.

Para la preparación de células quimiocompetentes se partió de un cultivo de *E.coli* en medio LB sólido. A partir de él, se realizó un precultivo en 10 mL de LB líquido que se incubó a 37°C/200 rpm O/N. Tras la incubación, se refrescó el cultivo a una concentración del 1% en 200 mL y se incubó a 37°C/200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) de 0,35-0,45 para alcanzar la fase de crecimiento bacteriano exponencial temprana. Para detener el crecimiento bacteriano en esta fase, se incubó el cultivo en hielo durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado lentamente en un total de 40 mL de Buffer 1 (14,7 g/L $CaCl_2$, 14,2 g/L $MgCl_2$ y 3,2 g/L NaAc). Se centrifugó de nuevo a 4000 rpm, 4°C durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 3 mL de Buffer 2 estéril frío (14,7 g/L $CaCl_2$ + 15% (v/v) de glicerol). Por último, se hicieron alícuotas de las suspensiones celulares a razón de 150 μ L y fueron conservadas a -80°C.

4.2.7. Transformación de células quimiocompetentes.

En primer lugar, se descongelaron alícuotas de células quimiocompetentes mediante baño de hielo y se añadieron 200 ng de vector recombinante a cada alícuota de células recién descongeladas. Se mezcló suavemente y se incubaron en hielo durante 10 min. A continuación, las alícuotas fueron incubadas a 42°C durante 90 segundos e inmediatamente incubadas en hielo nuevamente durante 1-2 minutos. Se añadieron 800 μ L de medio LB líquido (sin antibiótico) a las alícuotas asépticamente y fueron incubadas durante 45 min a 220 rpm a 37°C. Finalmente, las suspensiones anteriores fueron sembradas en placas de LB con kanamicina e incubadas a 37°C durante toda la noche.

4.3. Expresión de la tiorredoxina A (TrxA) y la tiorredoxina All2341 de *Anabaena* sp. PCC 7120 en *E.coli*.

4.3.1. Ensayo de expresión de las proteínas recombinantes.

Antes de llevar a cabo la producción a gran escala de las dos proteínas recombinantes, se realizaron ensayos de expresión con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de expresión para cada proteína. Para ello, se realizó un precultivo de 10 mL medio en LB líquido suplementado con kanamicina a partir de una placa de *E.coli* BL21(DE3) recién transformada con el correspondiente plásmido recombinante. El precultivo fue incubado a 37°C a 200 rpm durante toda la noche (O/N). Se inoculó 1 mL de este precultivo a distintos erlenmeyers que contenían 50 mL de medio líquido LBK y se incubaron a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar la fase de crecimiento bacteriano exponencial ($D.O_{600}=0,6-0,7$). Una vez alcanzada dicha densidad óptica, se adicionó IPTG hasta alcanzar distintas concentraciones finales (0; 0,25; 0,5 y 1 mM) para inducir la expresión recombinante y determinar la concentración de IPTG que permitía una mayor expresión de proteína recombinante soluble en el citoplasma. Los distintos erlenmeyers fueron incubados a 37°C a 200 rpm durante 4 horas y se tomaron muestras de cada erlenmeyer para su posterior análisis. Este primer ensayo permitió determinar la concentración de IPTG con

la que se obtenía una mayor expresión recombinante. Para determinar el tiempo con el cual se obtenía mayor expresión recombinante, se actuó de manera análoga pero induciendo con una concentración concreta de IPTG e incubando los erlenmeyers a distintos tiempos (0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y O/N), también se tomaron muestras de cada erlenmeyer. Estos ensayos permitieron determinar la concentración de IPTG y el tiempo de incubación necesarios para alcanzar una máxima expresión de proteína recombinante soluble en el citoplasma. Todas las muestras recogidas fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 2 min y los precipitados obtenidos fueron conservados a -20°C para su posterior análisis.

4.3.2. Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE).

Se realizaron electroforesis desnaturalizantes de proteínas para llevar a cabo el análisis de la expresión de proteínas recombinantes y de las posteriores purificaciones. Para ello, se realizaron geles de poliacrilamida al 17% cuya composición se encuentra recogida en la **Tabla 9.6.** del Anexo. Las muestras a analizar fueron mezcladas con tampón de carga 6X (10 mM Tris/HCl pH 8,8, 1 mM EDTA, 2,5% SDS, 5% de β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,02% azul de bromofenol), incubadas a 95°C durante 10 min para provocar la lisis celular y la desnaturalización proteica, y centrifugadas durante 1 min a 14000 rpm para eliminar detritos celulares y proteína insolubles. El patrón de peso molecular utilizado fue *LMW Protein Mixture* (Amersham Biosciences). El tampón de electroforesis utilizado estaba compuesto por 25 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM glicina y 3,5 mM SDS. Cada gel corrió hasta que el colorante alcanzaba el final del gel con un voltaje de 35 mA. Para la visualización de las bandas proteicas, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie (0,05% p/v Coomassie Blue R-250, 6% v/v ácido acético glacial, 45% v/v metanol) durante 45 minutos con agitación lenta. Posteriormente, los geles fueron desteñidos con una solución decolorante (10% v/v ácido acético glacial, 25% v/v metanol). Las imágenes fueron analizadas mediante Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad).

4.3.3. Sobreexpresión y obtención de biomasa.

Para llevar a cabo la obtención de biomasa se realizaron 10 precultivos de 10 mL de medio líquido LBK a partir de una placa de cultivo de *E.coli* BL21(DE3) recién transformada con el vector recombinante y se incubaron a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Se utilizaron estos precultivos como inóculos y se añadieron 10 mL de precultivo a cada erlenmeyer de 1 L de medio LBK (10 mL/L de inóculo). Se incubó a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una $D.O._{600}=0,6-0,7$. A continuación, se llevó a cabo la inducción de la expresión con IPTG y la posterior incubación empleando las condiciones previamente optimizadas durante el ensayo de expresión de las proteínas recombinantes. También, se recogieron alícuotas de 1 mL antes de llevar a cabo la inducción y después del proceso de incubación para verificar, mediante SDS-PAGE, que la sobreexpresión de ambas proteínas había sido correcta.

Por último, se colectaron las células (biomasa) por centrifugación a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. La biomasa obtenida fue pesada, etiquetada y conservada a -20°C hasta la purificación.

4.4. Purificación y caracterización de TrxA y la tiorredoxina All2341 de *Anabaena* sp. PCC 7120.

4.4.1. Empaquetamiento y equilibrado de la columna.

Con el objetivo de purificar las proteínas recombinantes producidas se empleó una cromatografía de afinidad por unión a metales (IMAC). En este caso, se utilizó como metal el Zn^{2+} que se unió a las colas de histidinas de las proteínas recombinantes permitiendo su purificación.

En primer lugar, se llevó a cabo el empaquetamiento de la columna utilizando 10 mL de la matriz de sefarosa *Chelating Sepharose™ Fast Flow* (GE Healthcare). Posteriormente, se lavó la columna con 10 volúmenes de agua miliQ con una velocidad de flujo de 3 mL/min. Para llevar a cabo la inmovilización del metal en la matriz se aplicaron 3 volúmenes de una disolución de $ZnSO_4$ 0,25 M. A continuación, se lavó con 10 volúmenes de agua miliQ para retirar el exceso de metal no adherido. Por último, se llevó a cabo el equilibrado de la columna con 10 volúmenes de tampón de unión (50 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl).

4.4.2. Obtención del extracto crudo.

Para la purificación con 10 mL de matriz se trataron aproximadamente 10 g de biomasa con células que expresaban eficientemente la proteína recombinante. Los 10 gramos de biomasa fueron descongelados y homogenizados con 50 mL de tampón de unión suplementado con 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), un inhibidor de proteasas. La suspensión celular fue sonicada en hielo con el equipo UP 200s (dr. Hielscher) (10 ciclos de 45 segundos con 30 segundos entre ciclos con una amplitud del 80% y un ciclo de 0,5). A continuación, las muestras fueron centrifugadas 3 veces a 20000 rpm durante 20 min a 4°C, recuperando el sobrenadante en cada una de las centrifugaciones. Por último, el sobrenadante obtenido fue filtrado utilizando filtros de 0,8 μm y 0,45 μm (Millipore). Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo para evitar la actuación de proteasas.

4.4.3. Purificación por cromatografía de afinidad por unión a metales.

Se aplicó el extracto crudo obtenido anteriormente a la matriz cromatográfica de sefarosa a una velocidad de flujo de 3 mL/min. A continuación, se lavó la columna con 5 volúmenes de tampón de unión suplementado con 0,5 M de $(NH_4)_2SO_4$ para debilitar las uniones inespecíficas de la matriz con otras proteínas. Seguidamente, se realizó un segundo lavado con tampón de unión suplementado con 35 mM de glicina hasta que la elución alcanzó una absorbancia a 280 nm inferior a 0,1 para garantizar que no habían quedado proteínas unidas de manera inespecífica a la matriz. Por último, se llevó a cabo la elución de la proteína recombinante empleando un gradiente de 0-1M de imidazol en tampón de unión, colectando alícuotas de 1 mL.

Se tomaron muestras del extracto crudo, volumen muerto y de ambos lavados que fueron analizadas junto a las fracciones de elución de la proteína recombinante, mediante SDS-PAGE, para verificar la correcta purificación. Una vez culminado el proceso de purificación, la matriz fue regenerada lavando con 5 volúmenes de EDTA 0,2 M y NaCl 0,5 M (pH=7), 3 volúmenes de NaCl 0,5 M y finalmente 5 volúmenes de agua miliQ. Finalmente, la matriz fue lavada con 5 volúmenes de etanol al 20% para su conservación a 4°C.

4.4.4. Diálisis de la proteína.

Las proteínas purificadas fueron sometidas a un proceso de diálisis para eliminar el imidazol y conservarlas en un tampón con una fuerza iónica menor al tampón de unión. El tampón de diálisis utilizado estaba compuesto por 50 mM Tris-HCl pH=8 y 300 mM NaCl. La diálisis fue llevada a cabo a un volumen final de 3 L. El tampón fue cambiado como mínimo cada 6 horas realizando 4 cambios. La diálisis fue realizada a 4°C con agitación suave. Por último, se tomó el sobrenadante de las tripas de diálisis (evitando el posible precipitado) y se congelaron alícuotas a -20°C.

4.4.5. Cuantificación de la proteína.

Para determinar la concentración de proteína se midió la absorbancia a 280 nm de las muestras obtenidas tras el proceso de diálisis con el equipo Specord 250 Plus (Analytik Jena AG) y se aplicó la ley de Beer-Lambert ($Abs = \epsilon \cdot C \cdot l$). El coeficiente de extinción molar teórico utilizado para TrxA fue $14180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y para la tiorredoxina All2341 fue $15460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los coeficientes de extinción molar teóricos se obtuvieron con la utilización del programa bioinformático Vector NTI (Invitrogen). Para las mediciones de absorbancia se utilizó como blanco el tampón de diálisis.

4.4.6. Evaluación *in vitro* de la actividad disulfuro reductasa.

La actividad disulfuro reductasa de TrxA y de la tiorredoxina All2341 de *Anabaena* sp. fue estimada a través del ensayo de la reducción de la insulina mediada por DTT (Holmgren, 1979). La agregación de las cadenas reducidas de insulina fue determinada mediante la medición de la densidad óptica a 650 nm. Se utilizaron como controles positivos las oxidorreductasas DsbA y DsbC de *E.coli*. La mezcla de reacción contenía 0,13 mM de insulina (Sigma) en un tampón compuesto por 50 mM Tris/HCl pH=7,5, 100 mM NaCl y 2 mM EDTA. Se añadieron los volúmenes necesarios de proteína y DTT_{red} a la cubeta para alcanzar concentraciones de 10 μM y 0,33 mM, respectivamente. Se utilizó como control negativo el tampón con insulina y DTT en ausencia de proteína. La reacción de precipitación de la insulina fue medida a 25°C con el equipo Specord 250 Plus (Analytik Jena AG).

4.4.7. Entrecruzamiento de TrxA y la tiorredoxina All2341 con proteínas FUR.

Con el objetivo de caracterizar las proteínas de interés se llevó a cabo un estudio del posible entrecruzamiento de TrxA y la tiorredoxina All2341 con FurA, FurB, FurC de *Anabaena* sp., y los mutantes C104S y C144S de FurA, en los que se había alterado uno de los motivos CXXC. Para ello, se mezclaron 4,5 μL de una proteína con 4,5 μL de otra de manera que se obtuviese una concentración final de cada una de ellas comprendida entre 25 y 40 μM . Esta mezcla se incubó durante 10 min. A continuación, se añadió a la mezcla 1 μL de glutaraldehído a una concentración final de 5% (p/v) y se incubó durante 20 min en oscuridad. Finalmente, se realizó una electroforesis SDS-PAGE para analizar los resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Clonaje de los genes *alr0052* y *all2341* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en el vector de expresión pET-28a.

5.1.1. Amplificación de los genes de interés y clonaje.

Se llevó a cabo la extracción de DNA genómico de *Anabaena* sp. que fue utilizado como molde para la amplificación de los genes de interés. El DNA genómico fue cuantificado mediante Nano Value Plus (GE Healthcare) (868,5 ng/ μ L), reflejando un procedimiento de extracción exitoso. Mediante PCR se amplificaron los genes *alr0052* (codifica para la tiorredoxina TrxA) y *all2341* (codifica para la tiorredoxina All2341). Para ello, se llevó a cabo primeramente una PCR con la enzima *Taq* (Biotools) para optimizar las condiciones de amplificación y verificar la calidad de los oligonucleótidos. Una vez establecidas las condiciones de amplificación, se realizó una segunda PCR con la polimerasa de alta fidelidad *Pfu Ultra* (Stratagene). En todos los casos, se realizaron electroforesis en geles de agarosa para comprobar que las amplificaciones presentaban el tamaño correcto, una concentración de DNA apropiada y la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

Se llevaron a cabo las amplificaciones de *alr0052* y *all2341* con la enzima *Taq* (Biotools) empleando una temperatura de hibridación de 55°C para ambos genes, obteniendo en ambos casos una correcta amplificación tal y como se puede observar en la **Figura 5.1.A**. A continuación, se realizó la amplificación de *alr0052* con *Pfu Ultra* (Stratagene) con una temperatura de hibridación de 55°C obteniendo una tenue banda (en torno a 1000 pb) que correspondía a una amplificación inespecífica (**Figura 5.1.B**). Por ello, se decidió aumentar la temperatura de hibridación a 59°C, observándose una correcta amplificación a dicha temperatura (**Figura 5.1.C**). Respecto a la amplificación de *all2341* con *Pfu Ultra* (Stratagene), también se aumentó la temperatura de hibridación respecto a la utilizada con *Taq* hasta 57°C para evitar las amplificaciones inespecíficas que se habían observado previamente con el uso de *Pfu Ultra* en la amplificación de *alr0052*, observándose una correcta amplificación (**Figura 5.1.D**).

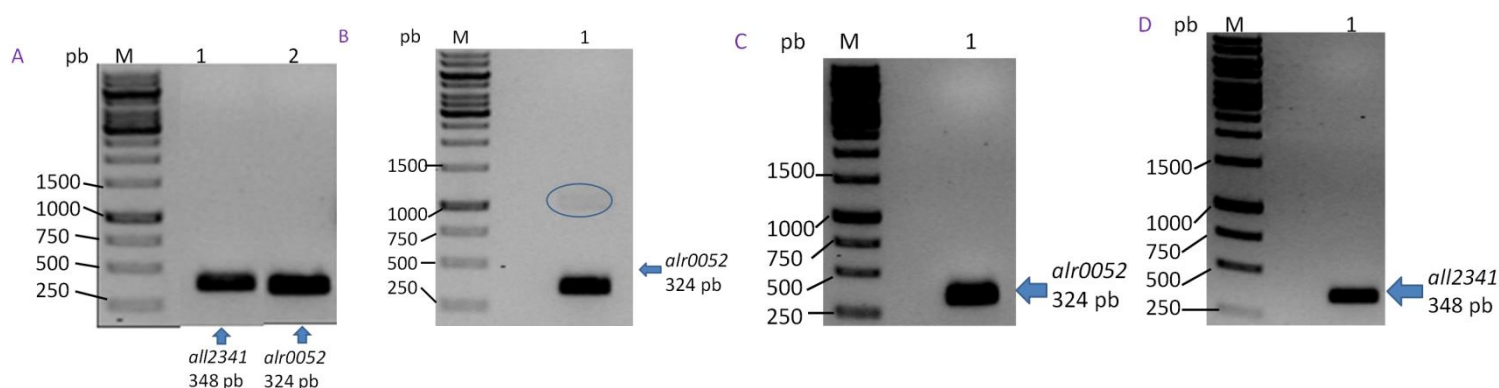


Figura 5.1. Amplificación de los insertos. (A) Amplificación de *all2341* y *alr0052* con *Taq* (Biotools) con una temperatura de hibridación de 55°C: carril M: marcador de peso molecular (en pb); carril 1: *all2341*; carril 2: *alr0052*. (B) Amplificación de *alr0052* con *Pfu Ultra* (Stratagene) con una temperatura de hibridación de 55°C: carril M: marcador de peso molecular (en pb); carril 1: *alr0052*; rodeado con círculo azul: banda inespecífica en torno a 1000 pb. (C) Amplificación de *alr0052* con *Pfu Ultra* (Stratagene) con una temperatura de hibridación de 59°C: carril M: marcador de peso molecular (en pb); carril 1: *alr0052*. (D) Amplificación de *all2341* con *Pfu Ultra* (Stratagene) una temperatura de hibridación de 57°C: M: marcador de peso molecular (en pb); carril 1: *all2341*.

Una vez que se verificó la correcta amplificación de los insertos que contenían la secuencia génica de *alr0052* y *all2341*, estos se purificaron y cuantificaron. Por otro lado, se llevó a cabo el aislamiento del plásmido pET-28a mediante minipreps. A continuación, se realizaron las dobles digestiones con las endonucleasas *Hind*III y *Nde*I tanto del plásmido como de los insertos por separado, los DNA restringidos se purificaron y se cuantificaron. Por último, se llevó a cabo la ligación de cada uno de los insertos con pET-28a obteniendo los vectores de sobreexpresión **pET-28a:*alr0052*** y **pET-28a:*all2341***.

5.1.2. Identificación de clones recombinantes y aislamiento de los vectores de interés.

Se transformaron las células quimiocompetentes de *E.coli* DH5 α (previamente preparadas) mediante choque térmico con las mezclas de ligación de **pET-28a:*alr0052*** y **pET-28a:*all2341***. Las células recién transformadas se sembraron en placas de LBK y se incubaron a 37°C durante toda la noche. A continuación, se seleccionaron 6 colonias de cada vector recombinante (recogidas con un palillo) y se llevó a cabo una PCR de colonias amplificando en cada caso el gen de interés. Se utilizó como control negativo la mezcla de reacción de PCR sin DNA molde. Tras finalizar las PCRs, se realizó una electroforesis para identificar las colonias que habían incorporado los plásmidos con inserto. En la **Figura 5.2.A.** se observa que las 6 colonias analizadas incorporaron el plásmido **pET-28a:*alr0052***.

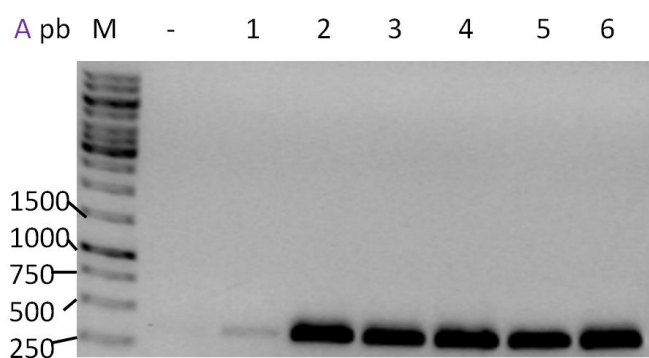


Figura 5.2.A. PCR de colonias transformadas con pET-28a:*alr0052*. Carril M: marcador de peso molecular (en pb); carril -: control negativo; carriles del 1 al 6: distintas colonias de *E.coli* DH5 α transformadas.

En la **Figura 5.2.B.** se aprecia que las 6 colonias han incorporado el plásmido **pET-28a:*all2341*** a excepción de la colonia 4 que posiblemente haya incorporado el plásmido recircularizado o sin digerir.

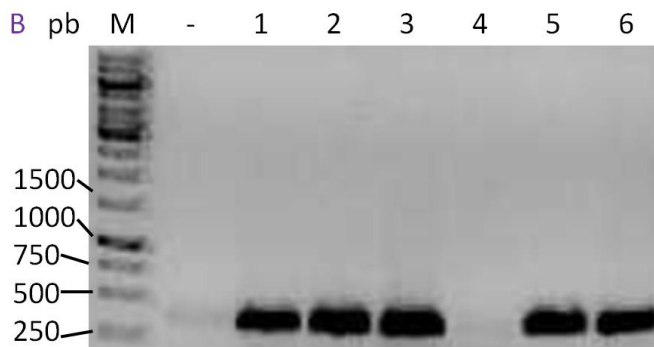


Figura 5.2.B. PCR de colonias transformadas con pET-28a:*all2341*. Carril M: marcador de peso molecular (en pb); carril -: control negativo; carriles del 1 al 6: distintas colonias de *E.coli* DH5 α transformadas.

Una vez identificadas las colonias que habían incorporado los plásmidos con los insertos, se seleccionó la colonia 2 de las células transformadas con **pET-28a:alr0052** y la colonia 1 de las células transformadas con **pET-28a:all2341**. Ambas fueron cultivadas en medio líquido LB suplementado con kanamicina y se obtuvieron los plásmidos mediante miniprep. A continuación, fueron enviados a secuenciar a la empresa *Sistemas Genómicos* ubicada en Valencia. Se comprobó que ambos insertos no contenían mutaciones indeseadas. Por último, se transformaron células quimiocompetentes *E.coli* BL21(DE3) (previamente preparadas) mediante choque térmico con los plásmidos **pET-28a:alr0052** y **pET-28a:all2341**, y se sembraron en placas de LBK, obteniendo de esta manera las cepas de sobreexpresión.

5.2. Expresión de la tiorredoxina A (TrxA) y tiorredoxina All2341 de *Anabaena* sp. PCC 7120 en *E.coli*.

5.2.1. Ensayo de expresión de las proteínas recombinantes.

Con el objetivo de conocer las condiciones óptimas para una máxima expresión de TrxA y la tiorredoxina All2341, se realizaron ensayos de expresión de ambas proteínas recombinantes en *E.coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos **pET-28a:alr0052** y **pET-28a:all2341**.

En el caso de TrxA, se realizaron dos ensayos de expresión, uno para determinar la concentración de IPTG a la cual la producción de la proteína recombinante era máxima y otro para determinar el tiempo de incubación óptimo para una expresión máxima. En la **Figura 5.3.A.** se puede observar que la adición de IPTG inducía la expresión de la proteína recombinante en todas las concentraciones ensayadas, aunque no se observaron grandes diferencias de expresión entre las distintas concentraciones de IPTG utilizadas. La **Figura 5.3.B.** muestra la expresión de TrxA a distintos tiempos de incubación empleando la misma concentración de IPTG. Se puede ver que a tiempo 0 h no se observa expresión de TrxA recombinante. Sin embargo, se aprecia un aumento en la expresión a medida que aumenta el tiempo de incubación entre las 0 y las 4 horas. A partir de las 4 horas, no se aprecian diferencias en la producción de proteína recombinante y se mantiene prácticamente constante entre las 4, 6 horas y O/N. Al incubar O/N no se observó degradación proteica. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió realizar la posterior producción de TrxA recombinante a mayor escala utilizando 0,5 mM de IPTG y un tiempo de incubación de 4 horas.

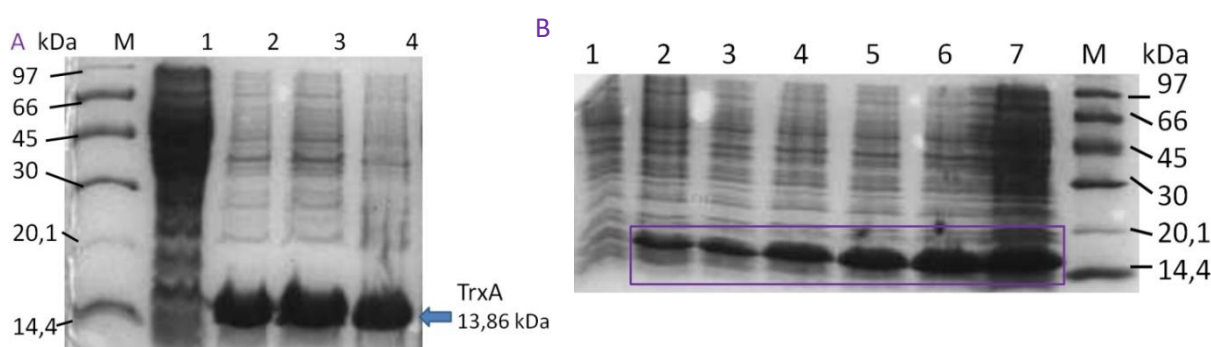


Figura 5.3. Ensayo de expresión de TrxA recombinante. (A) Ensayo de expresión con distintas concentraciones de IPTG: carril M: marcador de peso molecular (en kDa); carriles del 1-4: *E.coli* BL21(DE3) transformadas con pET-28a:alr0052 inducidas con distintas concentraciones de IPTG 0, 0,25, 0,5 y 1 mM, respectivamente. (B) Ensayo de expresión con distintos tiempos de incubación: carriles 1-7: *E.coli* BL21(DE3) transformadas con pET-28a:alr0052 incubadas a distintos tiempos 0, 30 min, 1, 2, 4, 6 horas y O/N; carril M: marcador de peso molecular (en kDa). El peso molecular de la proteína corresponde al peso molecular con las colas de histidinas (recuadro).

Para la producción de la tiorredoxina All2341 recombinante se realizó un único ensayo de expresión con el objetivo de optimizar el tiempo de incubación. Se incubaron las células transformadas con el plásmido **pET-28a:all2341** a distintos tiempos como en el ensayo realizado para TrxA. Los resultados obtenidos fueron similares y tampoco se observó degradación proteica (**Figura 5.4.**). Por ello, se decidió realizar la posterior producción de tiorredoxina All2341 a mayor escala utilizando 0,5 mM de IPTG y un tiempo de incubación de 4 horas.

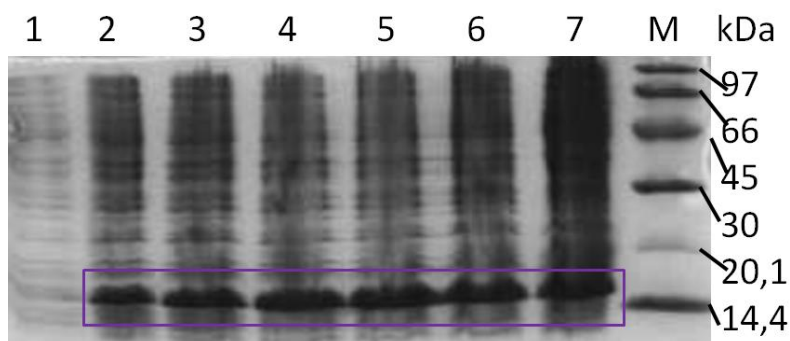


Figura 5.4. Ensayo de expresión de la tiorredoxina All2341 recombinante. Carriles 1-7: *E.coli* BL21(DE3) transformadas con pET-28a:all2341 incubadas a distintos tiempos 0, 30 min, 1, 2, 4, 6 horas y O/N; carril M: marcador de peso molecular (en kDa). El peso molecular de la proteína corresponde al peso molecular con las colas de histidinas (15,07 kDa, recuadro).

5.2.2. Sobreexpresión y obtención de biomasa.

Se llevó a cabo la sobreexpresión y la obtención de biomasa en las condiciones óptimas determinadas en el ensayo de expresión recombinante para cada una de las proteínas. Se cultivaron 10 L de *E.coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos **pET-28a:alr0052** y otros 10 L para las transformadas con **pET-28a:all2341**. La expresión de las tiorredoxinas recombinantes fue inducida con 0,5 mM de IPTG y los cultivos se incubaron durante 4 horas. Se llevó a cabo la recogida de biomasa obteniendo 21 g de biomasa de BL21(DE3) transformadas con **pET-28a:alr0052**, y 20,4 g de las células transformadas con **pET-28a:all2341**. Se tomaron alícuotas antes de la inducción y después de la incubación para comprobar, mediante SDS-PAGE, que la sobreexpresión se había dado correctamente. En la **Figura 5.5** se puede observar que antes de la inducción no existía una sobreexpresión de las proteínas recombinantes. Sin embargo, tras la inducción con IPTG y las 4 horas de incubación se aprecia una sobreexpresión de las proteínas.

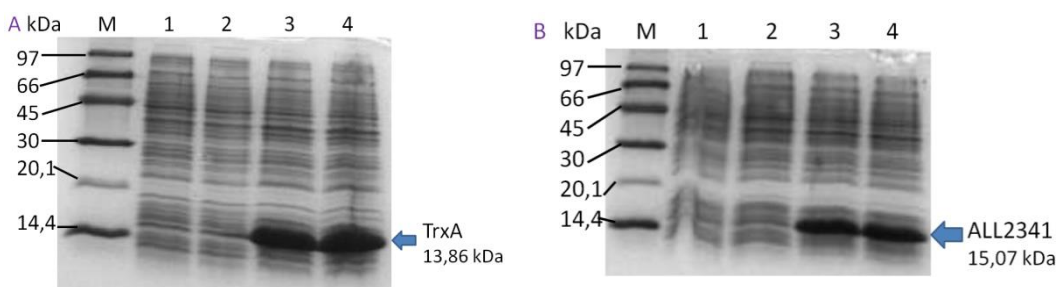


Figura 5.5. Sobreexpresión de (A) TrxA y (B) All2341. Carril M: marcador de peso molecular (en kDa); carriles 1-2: *E.coli* BL21(DE3) transformadas sin inducir; carriles 3-4: *E.coli* BL21(DE3) transformadas inducidas con 0,5 mM IPTG incubadas durante 4 h. El peso molecular de la proteína corresponde al peso molecular con las colas de histidinas.

La biomasa obtenida fue conservada a -20°C para llevar a cabo posteriormente la purificación de las proteínas recombinantes.

5.3. Purificación de TrxA y la tiorredoxina All2341 de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se descongelaron en torno a unos 10 g de biomasa de cada proteína y se llevó a cabo la obtención del extracto crudo a partir de ellas tal y como se explicó en el **apartado 4.4.2. de Materiales y Métodos**. Una vez obtenido el extracto crudo, se llevó a cabo la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad por unión a metales. Se tomaron muestras en cada uno de los pasos de purificación para analizar, mediante SDS-PAGE, que la purificación había sido realizada con éxito. Como se puede observar en la **Figura 5.6.** en el extracto crudo se aprecian numerosas bandas correspondientes a todas las proteínas citosólicas de la bacteria que fueron liberadas tras la lisis celular. Se observa que a medida que se realizaron los lavados esas bandas desaparecen indicando que esas proteínas fueron eluidas y no se quedaron fijas a la matriz. No se apreció pérdida de las proteínas recombinantes de interés ni en el volumen muerto ni en los procedimientos de lavados en ninguno de los dos procesos de purificación realizados. En el último carril, se observan las proteínas purificadas que fueron eluidas con un gradiente de imidazol.

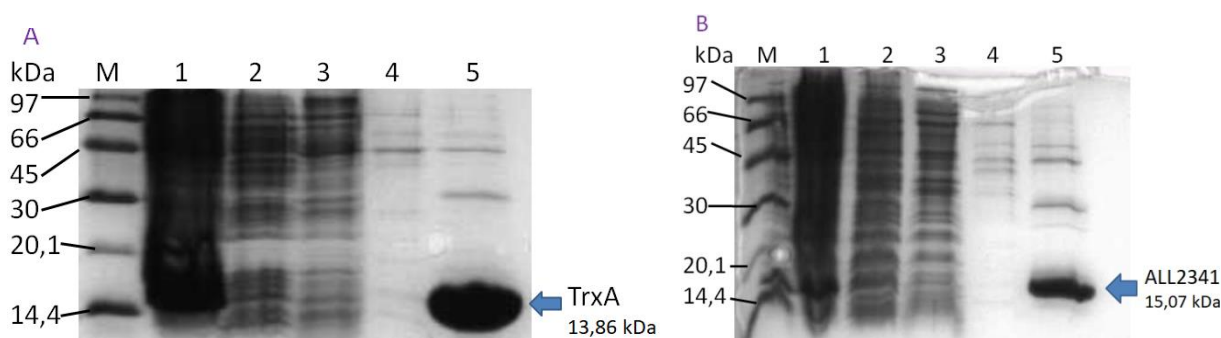


Figura 5.6. Purificación de TrxA (A) y All2341 (B). Carril M: marcador de peso molecular (en kDa); carril 1: extracto crudo, carril 2: volumen muerto; carril 3: lavado 1 con tampón de unión con 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 4: lavado 2 con tampón de unión con 35 mM de glicina; carril 5: proteína recombinante purificada. El peso molecular de la proteína corresponde al peso molecular con las colas de histidinas.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para seleccionar las alícuotas de proteína purificadas que contenían un nivel de pureza adecuado, estas alícuotas fueron mezcladas y dializadas. En el proceso de diálisis de TrxA frente al tampón de diálisis (50 mM Tris-HCl pH=8 y 300 mM NaCl), no se observó precipitado mientras que en el de All2341 (frente al mismo tampón de diálisis) se observó un ligero precipitado que no fue recogido. Tras la diálisis se llevó a cabo la cuantificación de cada proteína. En la **Tabla 5.1.** se recogen las concentraciones de cada proteína y los rendimientos de la purificación de cada una de ellas. Como se puede apreciar la purificación de TrxA permitió obtener un mayor rendimiento respecto a la purificación de All2341.

Tabla 5.1. Comparación de los procesos de purificación de TrxA y All2341.

Proteína	Biomasa (g)	Concentración proteína (μM)	Concentración proteína (mg/mL)	Volumen total (mL)	Masa de proteína (mg)	Rendimiento de biomasa (mg proteína/g biomasa)
TrxA	11	691	9,58	13	124,54	11,32
All2341	10,4	194	2,92	10	29,2	2,81

5.4. Evaluación de la actividad biológica de las tiorredoxinas recombinantes.

5.4.1 Evaluación *in vitro* de la actividad disulfuro reductasa.

Se llevó a cabo la medida de la actividad disulfuro reductasa (Holmgren, 1979) para verificar que las proteínas recombinantes purificadas en el laboratorio eran biológicamente activas y además, comparar su actividad disulfuro reductasa. Como se puede observar en la **Figura 5.7.**, ambas proteínas recombinantes eran biológicamente activas, demostrado por la precipitación de la insulina debido a la agregación de sus cadenas reducidas por la proteína recombinante. Se aprecia además que ambas tiorredoxinas presentaban una actividad disulfuro reductasa similar. Ambas tiorredoxinas recombinantes presentaron una actividad del mismo orden de magnitud que la oxidoreductasa DsbC de *E. coli* empleada como control.

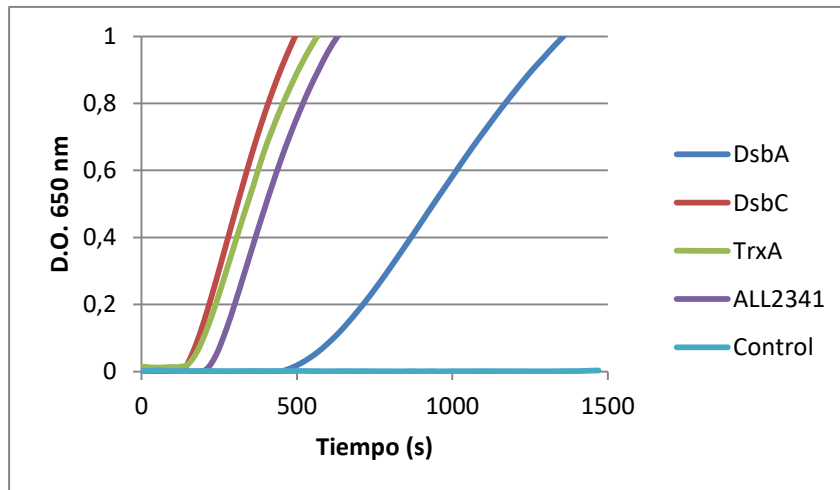


Figura 5.7. Actividad disulfuro reductasa de TrxA y All2341. Controles positivos: DsbA y DsbC, control negativo: mezcla de reacción en ausencia de proteína.

A partir de estos datos, se calculó la actividad disulfuro reductasa de las proteínas purificadas y de DsbC (**Tabla 5.2.**).

Tabla 5.2. Actividad disulfuro reductasa de TrxA, All2341 y DsbC.

Proteína	Δ Abs/min	Δ Abs/min·mol proteína
TrxA	0,173	$3,46 \times 10^7$
All2341	0,165	$3,30 \times 10^7$
DsbC	0,210	$4,20 \times 10^7$

5.4.2. Estudio de la interacción de TrxA y All2341 con las proteínas FUR mediante entrecruzamiento con glutaraldehído.

Con el objetivo de conocer si las proteínas FUR eran capaces de interactuar con las tiorredoxinas TrxA y All2341, se llevó a cabo un ensayo de entrecruzamiento de las proteínas purificadas con FurA, dos mutantes de FurA (C104S y C144S), FurB y FurC de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Los resultados fueron visualizados mediante una electroforesis SDS-PAGE. La **Figura 5.8.** muestra el estudio de las interacciones entre FurA y TrxA, y FurA y All2341. Se observa que FurA en presencia de glutaraldehído presenta bandas en torno a los 17 kDa (monómero de FurA) y los 34 kDa (dímero de FurA), y una banda al comienzo del gel de alto peso molecular que no puede penetrar en él (oligómeros de FurA de alto peso molecular). En cuanto a All2341 se aprecia que la presencia de glutaraldehído provoca una disminución en la intensidad de la banda (15,07 kDa). En el carril 7 donde se corrió la mezcla de TrxA y FurA se observan las mismas bandas que se encontraban en los carriles de TrxA y FurA por separado, y no se observa la presencia de nuevas bandas. Aunque se observa una mayor intensidad de la banda (~34 kDa) en presencia de TrxA. En el carril 8, donde se corrió All2341 y FurA, se observan resultados similares a los encontrados en el carril 7.

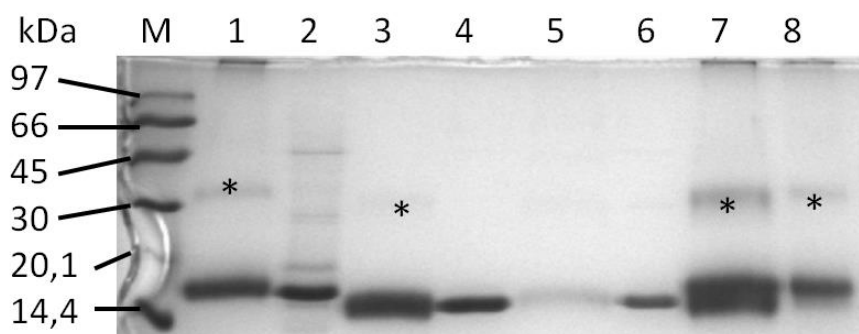


Figura 5.8. Entrecruzamiento de TrxA y FurA, y All2341 y FurA. Carril M: marcador de peso molecular (en kDa); carril 1: FurA en presencia de glutaraldehído; carril 2: FurA en ausencia de glutaraldehído; carril 3: TrxA en presencia de glutaraldehído; carril 4: TrxA en ausencia de glutaraldehído; carril 5: All2341 en presencia de glutaraldehído; carril 6: All2341 en ausencia de glutaraldehído; carril 7: TrxA y FurA; carril 8: All2341 y FurA. Los dímeros están marcados con un *.

En la **Figura 5.9.** se muestra el estudio del entrecruzamiento de los mutantes C104S y C144S con TrxA y All2341. El mutante C104S en presencia de glutaraldehído muestra distintas bandas. Para el mutante C144S no se aprecia ninguna banda con claridad en presencia de glutaraldehído. La mezcla de TrxA y C104S fue depositada en el carril 7, se observan las mismas bandas encontradas para TrxA y C104S por separado y no se aprecia la presencia de ninguna nueva banda. Se encontraron resultados similares para las mezclas de TrxA y C144S, All2341 y C104S, y All2341 y C144S.

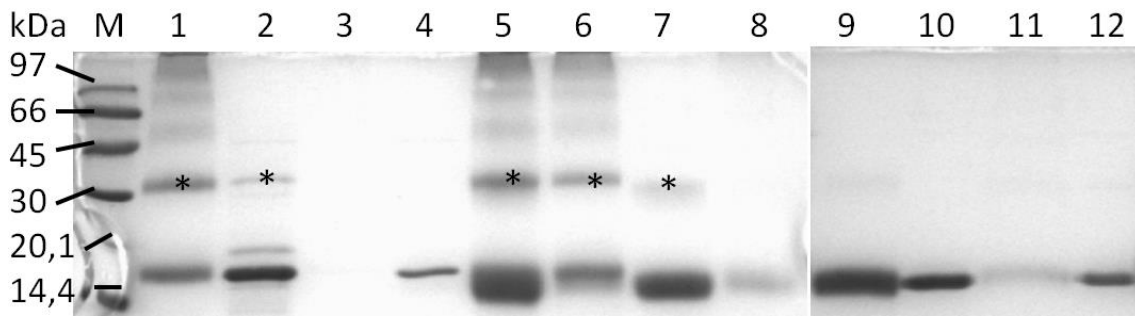


Figura 5.9. Entrecruzamiento del mutante C104S y TrxA, el mutante C104S y All2341, el mutante C144S y TrxA, y el mutante C144S y All2341. Carril M: marcador de peso molecular (en kDa); carril 1: mutante C104S en presencia de glutaraldehído; carril 2: mutante C104S en ausencia de glutaraldehído; carril 3: mutante C144S en presencia de glutaraldehído; carril 4: mutante C144S en ausencia de glutaraldehído; carril 5: TrxA y C104S; carril 6: All2341 y C104S; carril 7: TrxA y C144S; carril 8: All2341 y C144S; carril 9: TrxA en presencia de glutaraldehído; carril 10: TrxA en ausencia de glutaraldehído; carril 11: All2341 en presencia de glutaraldehído; carril 12: All2341 en ausencia de glutaraldehído. Los dímeros están marcados con un *.

La **Figura 5.10.** muestra el estudio del entrecruzamiento de FurB y TrxA, FurB y All2341, FurC y TrxA, y FurC y All2341. Se puede observar que tanto FurB como FurC presentan bandas en torno a los 15 kDa (monómeros) y 30 kDa (dímeros); y al comienzo del gel existe una banda de alto peso molecular que no puede penetrar en él. La mezcla FurB y TrxA presenta la mismas bandas que FurB y TrxA por separado y no se aprecia la presencia de nuevas bandas. Sin embargo, se observan bandas más intensas en la mezcla de ambas proteínas. En el caso de FurB y All2341 no se observó la presencia de bandas nuevas ni variaciones en la intensidad de las bandas presentes. Para FurC y TrxA se observaron las mismas bandas que por separado ligeramente intensificadas aunque en menor medida que las mezclas con FurB. Por último, no se observaron bandas nuevas para la mezcla de FurC y All2341.

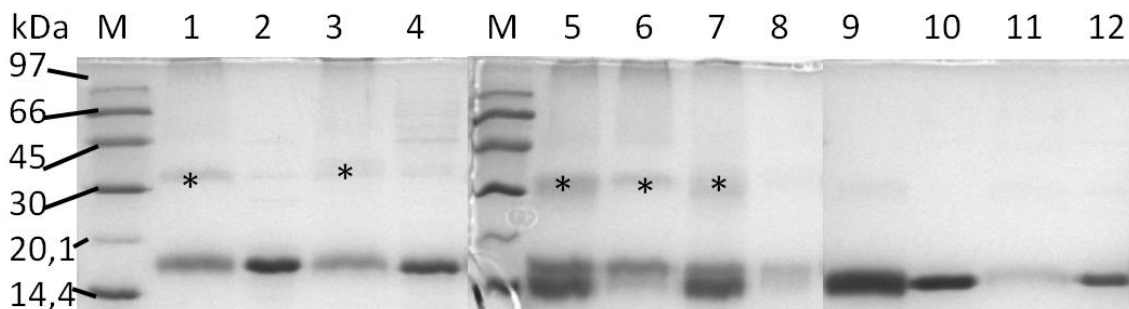


Figura 5.10. Entrecruzamiento de FurB y TrxA, FurB y All2341, FurC y TrxA; y FurC y All2341. Carril M: marcador de peso molecular (en kDa); carril 1: FurB en presencia de glutaraldehído; carril 2: FurB en ausencia de glutaraldehído; carril 3: FurC en presencia de glutaraldehído; carril 4: FurC en ausencia de glutaraldehído; carril 5: FurB y TrxA; carril 6: FurB y All2341; carril 7: FurC y TrxA; carril 8: FurC y All2341; carril 9: TrxA en presencia de glutaraldehído; carril 10: en ausencia de glutaraldehído; carril 11: All2341 en presencia de glutaraldehído; carril 12: All2341 en ausencia de glutaraldehído. Los dímeros están marcados con un *.

6. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue clonar, expresar y purificar las tiorredoxinas TrxA y All2341 de *Anabaena* sp. PCC 7120 conservando su actividad biológica para estudiar su posible interacción con distintas proteínas de la familia Fur.

Para la obtención de los insertos necesarios para el clonaje de ambos genes en el vector pET-28a se tuvo que llevar a cabo un aumento de la temperatura de hibridación para las PCRs realizadas con *Pfu Ultra* (Stratagene) respecto a la temperatura utilizada con *Taq* (Biotools) ya que con *Pfu Ultra* aparecieron amplificaciones inespecíficas. El objetivo de este aumento de la temperatura de hibridación fue aumentar la especificidad de los oligonucleótidos por el molde de DNA para evitar las amplificaciones inespecíficas.

Se llevaron a cabo los clonajes de *alr0052* y *all2341* y se realizaron PCR de colonias a partir de las placas con kanamicina en las que se habían sembrado las células transformadas con los plásmidos recombinantes. Las PCRs de colonias demostraron que la mayoría de los clones obtenidos tras la transformación habían incorporado el plásmido recombinante, a excepción de una colonia que había sido transformada con **pET-28a:all2341**. El hecho de que esta colonia creciese en la placa suplementada con kanamicina indicaba que era resistente a kanamicina, y por lo tanto, había incorporado el plásmido. Sin embargo, la PCR colonia resulto negativa lo que mostraba que no había incorporado el plásmido recombinante sino el plásmido sin digerir. Otra posible explicación podría ser que se hubiese dado un fenómeno de recircularización del plásmido, aunque esto es menos probable puesto que el plásmido había sido digerido con dos enzimas de restricción diferentes creando, por lo tanto, extremos no cohesivos. Sin embargo, para la doble digestión se utilizaron las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI* en un tampón en el cuál la efectividad de *NdeI* no era del 100%. Aunque se llevó a cabo la digestión durante toda la noche para garantizar un corte efectivo de *NdeI*, podría ser que *NdeI* no hubiese llegado a alcanzar el 100% de efectividad generándose de esta manera un único corte que permitiese la recircularización del plásmido. Una tercera opción pudiera haber sido que la extracción del DNA molde para esta colonia hubiera sido ineficiente, quizás por menos cantidad de biomasa recogida con el palillo y luego lisada por calor. Si la cantidad de DNA extraído de la colonia es muy baja, se pueden dar PCRs negativas por la baja concentración de DNA molde.

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Esta cepa es deficiente para las proteasas Lon y OmpT, lo que permite una disminución de la degradación proteica. Esto se pudo apreciar en los resultados de este trabajo, puesto que durante las incubaciones de mayor tiempo no se observó degradación proteica de las proteínas recombinantes sobreexpresadas de forma soluble en el citoplasma (**apartado 5.2.1. de Resultados**). Además, esta cepa contiene el locus DE3 que es el gen de la RNA polimerasa del fago T7, necesario para inducir la expresión de las proteínas recombinantes puesto que están reguladas por el promotor de la T7 RNA polimerasa. La expresión de este gen está regulada por el promotor Lac que a su vez se encuentra reprimido por el represor LacI, cuyo gen se encuentra codificado en el propio plásmido de expresión, al igual que los genes *alr0052* y *all2341* en el vector pET-28a. Por lo tanto, este doble sistema de control nos permite evitar el goteo del promotor y la inducción de los dos genes al mismo tiempo. Los ensayos de expresión permitieron conocer el tiempo de incubación óptimo para obtener una expresión máxima, estos tiempos de incubación fueron similares para ambas proteínas. Los tiempos de incubación óptimos dependen de las características físico-químicas de la proteína, de su manera de expresarse en la célula (forma soluble, cuerpos de inclusión, etc), de su estabilidad dentro del

citoplasma, de su toxicidad o no para el hospedador y por supuesto del sistema de expresión y las condiciones de cultivo (medio, temperatura, agitación, cantidad del inóculo, etc) utilizados, lo que explica la similitud de los tiempos de incubación óptimos para ambas proteínas. Para All2341 solo se realizó un único ensayo de expresión para conocer el tiempo de incubación óptimo puesto que las variaciones de concentración de IPTG no afectaban en gran medida a la expresión de la proteína recombinante. Además, la biomasa obtenida en los distintos procesos de recogida de biomasa de las dos proteínas fue similar.

Se decidió purificar ambas proteínas mediante una cromatografía de afinidad por unión a metales (IMAC) empleando el mismo protocolo de purificación. Este tipo de purificación se pudo llevar a cabo puesto que se incorporó una cola de histidinas en el extremo N-terminal de ambas proteínas. Las histidinas presentan afinidad por los metales divalentes permitiendo la unión de la proteína a la matriz. En otros trabajos de purificación de tiorredoxinas de otras especies bacterianas se utilizaba el Ni^{2+} como metal divalente (Tanaka et al., 2004). Sin embargo, en este trabajo se decidió utilizar el Zn^{2+} como metal divalente para la purificación puesto que el Ni^{2+} es más inespecífico, por lo que podría unirse a otras proteínas de *E. coli* con menor afinidad, fijándolas a la matriz y reduciendo así el nivel de pureza de la proteína a purificar. Se realizó el mismo protocolo de purificación para ambas proteínas puesto que se trataba de dos tiorredoxinas similares de la misma especie bacteriana con características físico-químicas teóricas muy similares en cuanto a pI, hidrofobicidad, peso molecular, etc; obteniendo con éxito ambas proteínas puras. Sin embargo, los rendimientos de purificación no fueron los mismos para las dos proteínas. El rendimiento de purificación de TrxA fue aproximadamente 4 veces mayor que el de All2341. Estas diferencias pueden ser debidas a ligeras desviaciones experimentales en la preparación de los distintos tampones utilizados (tampones de lavados, de elución o de diálisis), a un diferente estado de la matriz en el momento de purificación o a una diferente afinidad por la matriz. A pesar de estas diferencias en los rendimientos se consiguió obtener ambas proteínas puras. En cuanto al proceso de diálisis, también se decidió utilizar el mismo protocolo para ambas proteínas por las razones explicadas anteriormente. Durante la diálisis de TrxA no se apreció ningún precipitado, pero en la de All2341 precipitó una pequeña cantidad de proteína. Este hecho nos sugiere que el protocolo de diálisis utilizado no sería exactamente el más adecuado para All2341. Por lo tanto, queda pendiente la optimización del protocolo de diálisis para All2341.

La medida *in vitro* de la actividad disulfuro reductasa permitió comprobar que ambas proteínas recombinantes habían sido sobreexpresadas satisfactoriamente y convenientemente purificadas y conservadas, manteniendo una elevada actividad biológica según los ensayos *in vitro* realizados. La actividad biológica de las tiorredoxinas se evalúa *in vitro* a través del ensayo de Holmgren. Durante este ensayo la tiorredoxina reduce a la insulina causando la agregación de las cadenas reducidas de insulina que precipitan. La medida de la turbidez causada por dicha precipitación es directamente proporcional a la actividad disulfuro reductasa. El poder reductor procede del DTT reducido (Holmgren, 1979). La capacidad de reducir enlaces disulfuros de proteínas dianas de las tiorredoxinas permite que estas puedan ser comparadas con oxidorreductasas. Por ello, las oxidorreductasas DsbA y DsbC de *E. coli* fueron utilizadas como control positivo en este estudio. Ambas oxidorreductasas habían sido obtenidas previamente por vía recombinante en este laboratorio. Mientras que la oxidorreductasa DsbA presentó una actividad disulfuro reductasa menor que las tiorredoxinas de interés, DsbC presentó una actividad mayor que estas. Ambas tiorredoxinas presentaron una actividad similar entre ellas y similar también a DsbC. DsbC presentó una actividad disulfuro reductasa aproximadamente 1,2

veces mayor a la presentada por TrxA, y 1,3 veces mayor a la de All2341. TrxA presentó una actividad 1,05 veces mayor que ALL234. Por lo tanto, ambas tiorredoxinas presentaban una potente actividad biológica similar.

Los estudios de entrecruzamiento permitieron estudiar las posibles interacciones entre las tiorredoxinas purificadas y distintas proteínas de la familia Fur. La incubación de las proteínas con glutaraldehído permite detectar interacciones *in vitro* entre proteínas. El glutaraldehído es capaz de unir covalentemente las proteínas, produciendo entrecruzamientos. En el caso de que no hubiera interacción, se observarían las mismas bandas que las que presentaban las proteínas por separado. Sin embargo, en el caso de que hubiera interacción, se observaría la presencia de nuevas bandas correspondientes a heterodímeros o heterooligómeros. La presencia de dos motivos con actividad redox ($C_{101}VKC_{104}$ y $C_{141}PKC_{144}$) en la estructura de FurA (Botello-Morte et al., 2014) suscitó el interés por el estudio de una posible interacción redox entre proteínas de la familia FUR y las tiorredoxinas. Podrían establecerse distintos tipos de interacciones entre ambas proteínas incluyendo interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o redox, mediante los dominios CXXC. Las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas se observarían con los entrecruzamientos de las proteínas nativas y también con los de los mutantes. Sin embargo, las interacciones redox sólo se observarían con los mutantes puesto que la segunda cisteína de los motivos CXXC es la implicada en romper el complejo que se forma entre ambas proteínas (unidas por un puente disulfuro intermolecular formado por la primera cisteína del motivo), por lo que si se muta esta cisteína por una serina, no se podrá producir la rotura del complejo y ambas proteínas quedarán unidas por un enlace disulfuro intermolecular. Por esta razón, se utilizaron estos dos mutantes para este análisis.

Los resultados de la electroforesis SDS-PAGE de FurA, FurB y FurC mostraban la presencia de dímeros y oligómeros de alto peso molecular que no penetraban en el gel. Además, el mutante C144S y All2341 apenas presentaron bandas en presencia de glutaraldehído lo que podría sugerir una desestabilización de estas proteínas por parte del glutaraldehído. Respecto a los entrecruzamientos, no se observaron nuevas bandas en las mezclas de proteínas por lo que se podría decir que no existe una interacción directa entre las tiorredoxinas estudiadas y las proteínas de la familia FUR de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Sin embargo, en algunas mezclas de proteínas se observó un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a algunos oligómeros, lo cual podría sugerir que la presencia de las tiorredoxinas favorece la estabilización de estos. Se podría inferir que la presencia de TrxA favoreció la estabilización del dímero de FurA (34 kDa), de FurB (30 kDa) y de FurC (34 kDa) (aunque en menor medida que para los anteriores). Por otro lado, la presencia de tiorredoxinas no pareció aumentar la estabilidad de los mutantes de FurA, sugiriendo que los residuos C_{104} y C_{144} de los centros redox de FurA podrían estar implicados en la estabilización del dímero mediada por tiorredoxinas. Por lo tanto, se podría decir que algunos de los residuos de cisteínas presentes en los motivos con actividad redox de FurA participan en la estabilización del dímero mediada por tiorredoxinas. No obstante, estos resultados no son suficientes para afirmar esta posible estabilización de los dímeros por lo que estos resultados deberían ser reforzados con otros estudios que explicasen cómo se produce dicha estabilización.

7. CONCLUSIONES

1. El clonaje de los genes *alr0052* y *all2341* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en el plásmido pET-28a permitió la obtención de un elevado número de clones recombinantes.
2. El empleo del sistema de expresión pET-28a/BL21(DE3) permitió alcanzar elevados niveles de expresión de las proteínas recombinantes TrxA y All2341.
3. La cromatografía de afinidad por unión a metales (IMAC) utilizando Zn^{2+} con el protocolo de purificación propuesto en este trabajo permitió la purificación de ambas proteínas, manteniendo su actividad biológica, siendo el rendimiento de TrxA 4 veces mayor que el de All2341.
4. La evaluación *in vitro* de la actividad disulfuro reductasa permitió demostrar que las proteínas TrxA y All2341 presentaban una potente actividad disulfuro reductasa.
5. Las tioredoxinas TrxA y All2341 no interaccionaron con las proteínas FUR.

7. CONCLUSIONS

1. The cloning of the genes *alr0052* and *all2341* of *Anabaena* sp. PCC 7120 in pET-28a allowed obtaining a large number of recombinants clones.
2. The use of pET-28a/BL21(DE3) expression system allowed to reach high levels of expression of TrxA and All2341 recombinants proteins.
3. IMAC purification by using Zn^{2+} with the protocol proposed in this project allowed the purification of both proteins, maintaining its biological activity, being the purification efficiency of TrxA 4 times larger than All2341.
4. The *in vitro* disulfide reductase activity evaluation allowed to show that the proteins TrxA and ALL2341 presented a powerful disulfide reductase activity.
5. The thioredoxins TrxA and All2341 didn't interact with FUR proteins.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, S. C., Robinson A. K., et al.** (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, (27), pp.215-237.
- Botello-Morte, L., Bes, M., et al.** (2014). Unraveling the Redox Properties of the Global Regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120: Disulfide Reductase Activity Based on Its CXXC Motifs. *Antioxidants and redox signaling*, (20), pp. 1396-1406.
- Botello-Morte, L. Pellicer S., et al.** (2016). Cysteine mutational studies provide insight into a thiol-based redox switch mechanism if metal and DNA binding in FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Antioxidants and redox signaling*, (24), pp. 173-185.
- Bothe, H., Schmitz O., et al.** (2010). Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (74), pp. 529-551.
- Carpenter, B. M., Gilbreath J. J., et al.** (2013). Identification and characterization of novel *Helicobacter pylori* apo-Fur-regulated target genes. *Journal of Bacteriology*, (195), pp. 5526-5539.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., et al.** (1988). Fur (ferric uptake regulator) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, (173), pp. 537-546.
- De Lorenzo, V., Wee S., et al.** (1987). Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor, *Journal of Bacteriology*, (169).
- Ernst, F. D., Homuth, G., et al.** (2005). Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *Journal of Bacteriology*, (187), pp. 3687-3692
- Ferreira F. y Straus N. A.** (1994). Iron deprivation in cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, (6), pp. 199-210.
- Fillat, M. F.** (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (546), pp. 41-52
- González A., Bes M. T., et al.** (2010). Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology. *Plant and Cell Physiology*, (51), pp. 1900-1914
- González A., Bes M. T., et al.** (2012). FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environmental Microbiology*, (14), pp. 3175-3187.
- González A., Bes M. T., et al.** (2016). Expanding the Role of FurA as Essential Global Regulator in Cyanobacteria. *Plos One*.
- González A., Espinosa Angarica V., et al.** (2014). The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120: *in silico* prediction and experimental validation of novel target genes. *Nucleic Acids Research*, (42), pp. 4833-4846.

- González A., Valladares A., et al.** (2013). FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Letters*, (587), pp. 2682-2690.
- Green, B.**, (2010). After the primary endosymbiosis: an update on the chromalveolate hypothesis and the origins of algae with Chl c. *Photosynth. Res.*, (107), pp. 103-115.
- Hernández, J., López-Gomollón, et al.** (2006a). Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn²⁺ are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters. *Biomaterials*, (19), pp. 259-268.
- Hernández, J. A., Muro-Pastor A. M., et al.** (2006b). Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Molecular Biology*, (355), pp. 325-334.
- Hernández J., Peleato M. L., et al.** (2004). Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Letters*, (577), pp. 35-41.
- Holmgren, A.** (1979). Reduction of Disulfides by Thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, (18), pp.9113-9119.
- Holmgren, A.** (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, (3), pp. 239-343.
- Ma, Z., Jacobsen F.E., et al.** (2009). Metal transporters and metal sensors: how coordination chemistry controls bacterial metal homeostasis. *Chemical reviews*, (109), pp. 4644-4681.
- Martin J. L.** (1995). Thioredoxin- a fold for all reasons. *Structure*, (3), pp. 245-250.
- Masse E. y Gottesman S.** (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (99), pp. 4620-4625.
- Pohl E., Haller J. C., et al.** (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.*, (4), pp. 903-915.
- Schopf, J. W.**, (2010). The paleobiologic record of photosynthesis. *Photosynth. Res.*, (107), pp. 87-101.
- Tanaka, R., Araki, Y., et al.** (2004). Expression and Purification of the *Bacillus subtilis* Thioredoxin Superfamily Protein YkvV. *Biosciences Biotechnologie Biochemistry*, (68), pp.1801-1804.
- Wolosiuk, R. A., Stolowicz F. G., et al.** (2016). Diversidad estructural y funcional de las tiorredoxinas vegetales.
- Zeller, T. y Klug G.** (2006). Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften*, (93), pp. 259-266.
- Universidad Pública de Navarra (2011).** *Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas*. P-201104.

9. ANEXOS

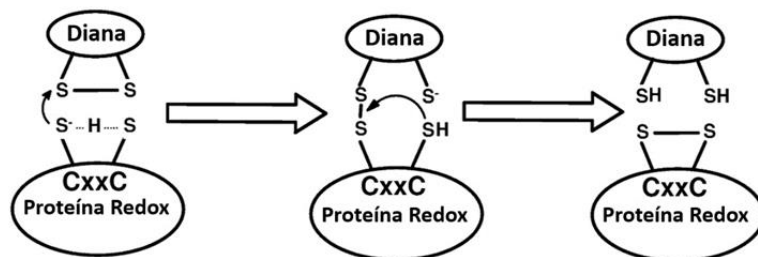


Figura 9.1. Mecanismo de la actividad disulfuro reductasa. La proteína redox con actividad disulfuro reductasa reduce el puente disulfuro de la proteína diana. Autor de la figura: Raúl Díaz-Guerra Aparicio. (Figura adaptada de Nebraska Redox Biology Center Educational Portal, 2018).

Tabla 9.1. Tiorredoxinas y tiorredoxinas reductasas de *Anabaena* sp. PCC 7120 según la Cyanobase.

Gen	Proteína
<i>all0737</i>	Tiorredoxina reductasa
<i>all1893</i>	Tiorredoxina
<i>all2341</i>	Tiorredoxina
<i>all2367</i>	Tiorredoxina
<i>alr0052</i>	Tiorredoxina, TrxA
<i>alr0570</i>	Tiorredoxina
<i>alr2204</i>	Tiorredoxina reductasa
<i>alr2205</i>	Tiorredoxina
<i>alr3955</i>	Tiorredoxina
<i>alr4065</i>	Tiorredoxina reductasa
<i>asl2469</i>	Tiorredoxina reductasa
<i>asl7641</i>	Tiorredoxina

Tabla 9.2. Características de las cepas utilizadas.

CEPA	GENOTIPO	CASA COMERCIAL	USO
<i>E. coli</i> DH5 α	F - ϕ 80 <i>lac</i> Z Δ M15 Δ (<i>lac</i> ZYA- <i>arg</i> F)U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK - , mK +) <i>phoA supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i> λ -	Invitrogen	Clonaje y propagación de plásmidos
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>ompT hsdS B</i> (r B - m B -) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen	Expresión y purificación de proteínas recombinantes

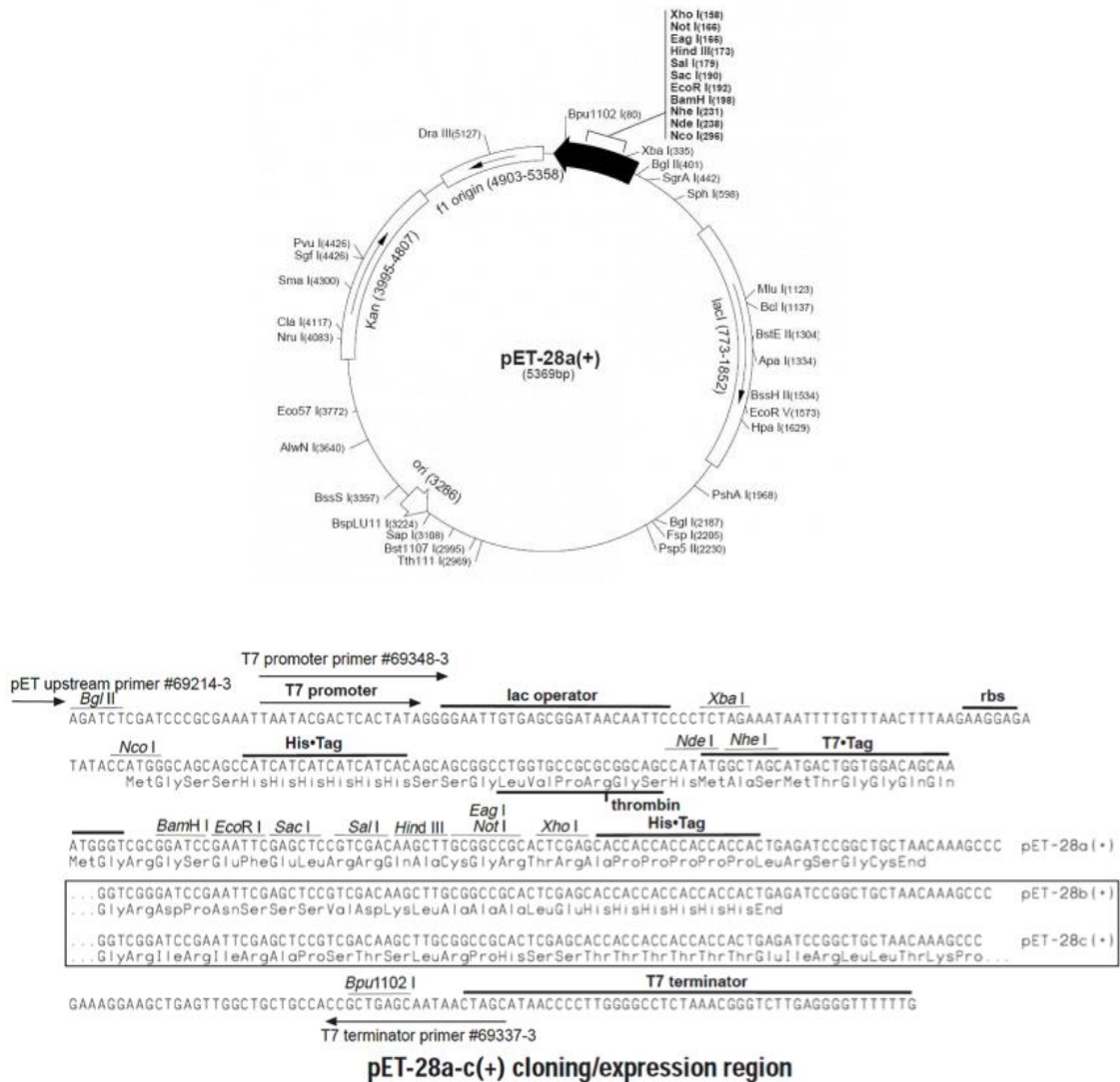



Figura 9.2. Estructura del plásmido pET-28a.

Tabla 9.3. Programas de PCR utilizados para los dos genes amplificados y las dos DNA polimerasas utilizadas.

30 ciclos



	Desnaturalización inicial	Desnaturalización cíclica	Hibridación	Extensión cíclica	Extensión final	Mantenimiento de muestras
<i>alr0052</i> con <i>Taq</i>	95°C durante 5 min	95°C durante 30 s	55°C durante 30 s	72°C durante 2 min	72°C durante 5 min	4°C
<i>alr0052</i> con <i>Pfu Ultra</i>	95°C durante 5 min	95°C durante 30 s	59°C durante 30 s	72°C durante 2 min	72°C durante 5 min	4°C
<i>all2341</i> con <i>Taq</i>	95°C durante 5 min	95°C durante 30 s	55°C durante 30 s	72°C durante 2 min	72°C durante 5 min	4°C
<i>all2341</i> con <i>Pfu Ultra</i>	95°C durante 5 min	95°C durante 30 s	57°C durante 30 s	72°C durante 2 min	72°C durante 5 min	4°C

Tabla 9.4. Mezclas de reacción utilizadas en PCR.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)	VOLUMEN (μL)
Agua miliQ	36,7	36
Buffer 10X	5	5
MgCl ₂ 50 mM	1,5	1
dNTPs 10 μM	1	1,5
Oligonucleótido directo 10 μM	1,4	1,5
Oligonucleótido reverso 10 μM	1,4	1,5
DNA 86,85 ng/μL	2	2
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/μL)	1	-
<i>Pfu Ultra</i> polimerasa (2,5 U/μL)	-	1,5

Tabla 9.5. Oligonucleótidos empleados en PCR. Las secuencias en negritas son los sitios de corte de las enzimas *NdeI* (Alr0052cloning-up y All2341cloning-up) y *HindIII* (Alr0052cloning-dw y All2341cloning-dw).

	USO	SECUENCIA
Alr0052cloning-up	Oligonucleótido directo para amplificación de <i>alr0052</i>	5'- GGAATT CCATATG TCAGCAGCCGCACAAGTTA CAGATTC-3'
Alr0052cloning-dw	Oligonucleótido reverso para amplificación de <i>alr0052</i>	5'- CCC AAGCTT TACAGATGCTTTTCTAG-3'
All2341cloning-up	Oligonucleótido directo para amplificación de <i>all2341</i>	5'- GGAATT CCATATG GAGACTGCAATGAGTAAGG GTGTAATC-3'
All2341cloning-dw	Oligonucleótido reverso para amplificación de <i>all2341</i>	5'-CCC AAGCTT CTAATTATTATTTAAATGCG-3'

Tabla 9.6. Composición de los geles de poliacrilamida al 17% utilizados en las electroforesis desnaturalizantes de proteínas (SDS-PAGE).

COMPONENTES	GEL SEPARADOR (17%)	GEL CONCENTRADOR (5%)
H₂O	0,36 mL	1,4 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,24 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	0,25 mL
Acrilamida/Bis 30%	3,4 mL	0,33 mL
SDS 10%	30 µL	10 µL
PSA 10%	20 µL	10 µL
TEMED	10 µL	10 µL