

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CsgA, PRINCIPAL
COMPONENTE PROTEICO DE LAS FIBRAS CURLI, EN CEPAS
RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*.**

Autora

ELIANA PATRICIA BENINCORE FLÓREZ



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CsgA, PRINCIPAL
COMPONENTE PROTEICO DE LAS FIBRAS CURLI, EN CEPAS
RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*.**

Autora

ELIANA PATRICIA BENINCORE FLÓREZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de
Química**

DIRECTOR

RODRIGO TORRES SÁEZ, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

COLOMBIA

2013

*Dedicado a mi madre, en la tierra y a mi padre, en el cielo. Con infinito
agradecimiento y amor.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y a todos los profesores de la escuela de Química que aportaron su conocimiento a mi formación académica y personal.

Al profe Rodrigo y a la profe Claudia por permitirme ser un integrante más de su grupo, GIBIM.

A mis compañeros del grupo de investigación por tantas experiencias vividas y sobre todo, tantos días de risa. Especialmente agradezco a Mary, porque su guía y asesoría me ayudaron muchas veces a salir de esos momentos en los que sentí decaer.

A mis queridos e incondicionales amigos, los de siempre: Diani, Nathy, Vero, Lau, Carlos, Sergio y Alex. Junto a ellos compartí todas las buenas y malas experiencias de vida universitaria. Con ellos aprendí aquellas cosas que sólo enseña la universidad de la vida.

A mi principito, Eduardo. Siempre siendo más de lo esperado. Todo su amor, compañía, apoyo, paciencia y demás, hicieron más grato todo este proceso, desde sus inicios. Junto a él aprendí que la vida es más bonita de a dos. Amor de mis amores.

A mi familia que siempre estuvo pendiente de mis necesidades y de mis logros; mi tía Luz, mi tío Omar, mi tía Nubi, una estrellita más en el cielo. Y a mis hermanitos, Mau, JuanDa y George.

A mi mamá por su verraquera, su amor y apoyo incondicional, por ser mi motor y mi ejemplo a seguir y por nunca renunciar a su rol de pamita. Por siempre hacer de lo imposible, algo posible.

A mi papito, siempre presente como el amor más grande de mi vida. La estrella que alumbra mi camino. Este y todos mis triunfos serán siempre dedicados a él.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 Objetivo general	18
1.2 Objetivos específicos	18
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 <i>Escherichia coli</i> .	19
2.2 Recombinación genética en <i>E. coli</i> .	19
2.2.1 <i>Vectores de expresión</i> .	20
2.2.1.1 <i>Promotores inducibles con IPTG</i> .	21
2.2.1.2 <i>Marcadores de fusión: His₆</i> .	22
2.2.2 <i>Extracción plasmídica mediante lisis alcalina</i> .	22
2.2.3 <i>Transformación</i> .	23
2.2.3.1 <i>Competencia celular</i> .	23
2.2.3.2 <i>Electroporación</i> .	24
2.3 <i>Expresión de proteínas intra y extracelularmente</i> .	24
2.4 <i>Producción de proteínas recombinantes mediante inducción con IPTG</i> .	26
2.4.1 <i>Temperatura de crecimiento e inducción</i> .	26
2.4.2 <i>Densidad celular en el punto de inducción</i> .	26
2.5 <i>Fibras amiloides funcionales: curli</i> .	27
2.6 <i>Proteína recombinante: CsgA</i> .	28
2.7 <i>Análisis de proteínas</i> .	30
2.7.1 <i>Cuantificación de proteínas</i> .	30
2.7.2 <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)</i> .	30

2.8 Cromatografía de afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC).	31
2.9 Espectroscopia de Fluorescencia con Tioflavina T.	32
2.10 Microscopia de barrido – SEM	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Microorganismos utilizados.	36
3.1.1 <i>NEB C2566-pNH11.</i>	36
3.1.2 <i>LSR12-pMC1/pMC3.</i>	37
3.2 Crecimiento celular en medio líquido e inducción de la expresión de proteínas recombinantes.	37
3.2.1 <i>Inducción de la expresión de CsgA*-His₆.</i>	37
3.2.2 <i>Inducción de la expresión de CsgA-His₆.</i>	38
3.3 Células recombinantes.	38
3.3.1 <i>Obtención de células competentes.</i>	38
3.3.2 <i>Extracción del ADN plasmídico.</i>	38
3.3.3 <i>Electroporación.</i>	39
3.3.4 <i>Siembra del cultivo celular recombinante.</i>	39
3.4 Análisis de proteínas.	39
3.4.1 <i>Cuantificación de proteínas.</i>	39
3.4.2 <i>Selección de clones mediante SDS-PAGE.</i>	39
3.4.2.1 <i>Tinción.</i>	40
3.5 Obtención del extracto total de proteínas.	41
3.5.1 <i>Lisis celular por precipitación de proteínas con MeOH/Cloroformo.</i>	41
3.5.2 <i>Obtención por centrifugación.</i>	41
3.6 Purificación proteica mediante IMAC.	42
3.6.1 <i>Acondicionamiento de la resina Ni-NTA.</i>	42
3.6.2 <i>Purificación de CsgA- His₆.</i>	42
3.6.3 <i>Purificación de CsgA*-His₆ en un método por lotes.</i>	42
3.7 Espectroscopia de fluorescencia.	43
3.8 Microscopia electrónica de barrido – SEM.	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45

4.1 Crecimiento de cepas recombinantes y verificación de la adquisición plasmídica.	45
4.3 Crecimiento celular en medio líquido e inducción con IPTG.	51
4.4 Purificación, cuantificación y análisis SDS-PAGE de las proteínas recombinantes CsgA-His ₆ y CsgA*-His ₆ .	54
4.5 Espectroscopia de fluorescencia.	56
4.6 Microscopia electrónica de barrido – SEM	59
5. CONCLUSIONES	64
6. RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de CsgA.	29
Figura 2. Organización estructural de la resina Ni-NTA y su unión a proteínas marcadas con residuos de histidina.	32
Figura 3. a. Estructura cruz β de fibras amiloides, formadas a partir de las capas de láminas β . b. Arriba: Estructura de ThT. Abajo: Rotación de sus grupos aromáticos en torno al enlace común C- C.	34
Figura 4. Montaje empleado para los procedimientos electroforéticos.	40
Figura 5. Espectrofluorímetro Photon Technology International, Quantamaster QM-40.	43
Figura 6. Der.: Inmovilización de la muestra sobre una mica de muscovita. Izq.: Microscopio electrónico QUANTA FEG 650.	44
Figura 7. SDS-PAGE para los clones obtenidos a partir de la cepa recombinante NEB C2566-pNH11. Se resaltan las bandas alrededor de 17 y 35 KDa.	48
Figura 8. SDS-PAGE para los clones obtenidos a partir de la cepa recombinante LSR12-pMC1/pMC3. Se resaltan las bandas alrededor de 17 KDa.	50
Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa E. coli NEB C2566-pNH11	52

Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* LSR12-pMC1/pMC3. 52

Figura 11. Imágenes SDS-PAGE de la purificación de las proteínas recombinantes: **a.** CsgA-His6. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 25 μ L de muestra (5 μ g de proteína). **b.** CsgA*-His6. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2:15 μ L de muestra (5 μ g de proteína). 55

Figura 12. Espectros de fluorescencia obtenidos para diferentes concentraciones de CsgA-His6 purificada a partir de la cepa LSR12-pMC1/pMC3. 56

Figura 13. Espectros de fluorescencia obtenidos para CsgA*-His6 purificada a partir de la cepa NEB C2566-pNH11, medidos a diferentes concentraciones de proteína. 57

Figura 14. Relación entre la concentración de proteína y la intensidad de fluorescencia. 58

Figura 15. Micrografías de la proteína CsgA*-His6 que evidencian la formación de agregados oligoméricos causados por la autopolimerización de la proteína recombinante 60

Figura 16. Micrografías de la proteína CsgA-His₆ que evidencian la formación de un entramado fibrilar causado por la polimerización eficiente y ordenada de la proteína recombinante. 61

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Verificación de la transformación celular.	46
Tabla 2. Comparación de las cantidades relativas de las bandas de interés, obtenidas a partir de la cepa NEB C2566-pNH11.	49
Tabla 3. Comparación de las cantidades relativas de las bandas de interés, obtenidas a partir de la cepa LSR12-pMC1/pMC3.	51
Tabla 4. Concentración del cultivo celular a diferentes tiempos de inducción.	53
Tabla 5. Concentración de las proteínas purificadas.	54

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CsgA, PRINCIPAL COMPONENTE PROTEICO DE LAS FIBRAS CURLI, EN CEPAS RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*. *

AUTORA: Eliana Patricia Benincore Flórez **

PALABRAS CLAVE: *Escherichia coli*, fibras curli, amiloides, proteínas recombinantes, purificación IMAC, tioflavina T.

DESCRIPCIÓN

Muchas enterobacteriáceas como *E. coli* pueden ensamblar fibras amiloides funcionales en su superficie celular. La mayoría de los amiloides bacterianos contribuyen a la formación de biopelículas y otros comportamientos en comunidad donde las células interactúan con una superficie o con otra célula. Los amiloides bacterianos, como todos los amiloides funcionales, comparten propiedades bioquímicas y estructurales con los amiloides eucarióticos asociados a enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Diabetes tipo II, entre otras.

In vivo, al menos seis proteínas, codificadas por los operones divergentes transcritos csgBA y csgDEFG, se dedican a la formación de curli en *E. coli*. El operón csgBA codifica la principal subunidad estructural, CsgA y la proteína nucleadora CsgB. Sin embargo, el desarrollo de este trabajo demostró que es posible obtener fibras curli obtenidas a partir de la polimerización *in vitro* de la proteína CsgA, en ausencia de las demás proteínas involucradas en la biogénesis curli.

Aquí, la proteína CsgA fue producida *in vivo*, por dos cepas recombinantes de *E. coli* que fueron diseñadas genéticamente para expresar CsgA de forma intracelular y extracelular, a fin de comparar la formación de fibras curli bajo diferentes condiciones de expresión. La purificación de esta proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC). Se verificó la obtención *in vitro* de estructuras amiloides mediante análisis por espectroscopia de fluorescencia, aprovechando las características tintoriales de las fibras de tipo amiloide, y se observó la formación de un entramado fibrilar morfológicamente similar al entramado que forma las biopelículas bacterianas *in vivo*, dado por la polimerización de la proteína CsgA obtenida extracelularmente. Por el contrario, se observó que la proteína CsgA obtenida del medio intracelular, formó estructuras desordenadas y amorfas que impidieron la formación de fibras curli.

*Trabajo de grado.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF PROTEIN EXPRESSION CsgA, MAJOR PROTEIN COMPONENT CURLI FIBER IN RECOMBINANT STRAINS OF *Escherichia coli*. *

AUTHOR: Eliana Patricia Benincore Flórez **

KEYWORDS: *Escherichia coli*, curli fibers, recombinant proteins, IMAC purification, thioflavin T.

SUMMARY

Many *Enterobacteriaceae* such as *E. coli* can assemble functional amyloid fibers on their cell surface. Most bacterial amyloid contributes to the formation of biofilms and other behaviors in community where cells interact with a surface or with another cell. Bacterial amyloid, like all functional amyloid, share biochemical and structural properties associated with disease-associated eukaryotic amyloids such as Alzheimer's, Parkinson's, Diabetes Type II, among others.

In vivo, at least six proteins encoded by the divergently transcribed *csgDEFG csgBA* operons, are dedicated to curli formation in *E. coli*. The *csgBA* operon encodes the major structural subunit, CsgA, and the nucleator protein CsgB. However, this work showed that it is possible to obtain curli fibers from the *in vitro* polymerization of CsgA protein in the absence of other proteins involved in the biogenesis of curli.

In vivo CsgA protein was produced by two recombinant strains of *E. coli* that were genetically engineered to express such CsgA intracellular and extracellular in order to compare the formation of curli fiber under different expression conditions. The purification of this protein was performed by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). We verified the results of the *in vitro* amyloid structures obtained using fluorescence spectroscopy analysis, taking advantage of the staining characteristics of amyloid fibers, and it was observed the formation of a lattice strain, morphologically similar to the fabric forming *in vivo* bacterial biofilms, given by CsgA protein polymerization obtained extracellularly. In opposition to this, it was observed that the protein obtained from the intracellular medium CsgA, formed amorphous and disordered structures which prevented the formation of curli fibers.

* Degree work.

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Las fibras amiloides son agregados insolubles de proteínas, asociados a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington, Parkinson y enfermedades priónicas, entre otras. La base de estas enfermedades es la agregación de proteínas que se depositan en los tejidos (Barnhart & Chapman, 2006), (Wang *et al.*, 2010).

Diversas investigaciones han mostrado que muchas *enterobacteriáceas* como *Escherichia coli* (*E. coli*) producen una clase de fibras amiloides funcionales llamadas *curli*, que proporcionan un sistema modelo en el estudio de los principios fundamentales de la formación de fibras amiloides, ya que las fibras *curli*, son bioquímica y estructuralmente similares a las fibras asociadas a enfermedades (Chapman *et al.*, 2002), (Epstein & Chapman, 2008).

Se ha encontrado que el ensamble de amiloides funcionales puede ser utilizado como parte productiva de la biología celular, además de contribuir a la formación de *biofilms* y otros importantes procesos fisiológicos (Weiss-Muszkat *et al.*, 2010). El mecanismo de polimerización de las fibras amiloides aún no está completamente descrito, por lo que el estudio experimental de las fibras *curli* podría proporcionar información sobre cómo ocurre la formación de amiloides *in vivo* y cómo puede ser controlada y hacerse menos citotóxica. Este hecho despierta el interés científico hacia el estudio de las fibras *curli*, ya que podría proporcionar información acerca del mecanismo de formación de las fibras, las variables del proceso y su influencia sobre la citotoxicidad.

Además, todos los años dedicados al estudio de *E. coli* y la secuenciación completa de su ADN genómico, la convirtieron convertido no solo en el sistema modelo, sino también en el actor clave que dio paso al nacimiento de la tecnología del ADN recombinante. *E. coli* permite introducir genes extraños en su genoma o

en el de sus plásmidos, con relativa facilidad, haciéndolo un organismo inigualable para la expresión génica. Así, durante los últimos 20 años, cientos de vectores han sido diseñados e introducidos en *E. coli*, y han permitido estudiar la producción, expresión y plegamiento de proteínas recombinantes. Muchas de esas proteínas recombinantes han sido aprobadas para usos terapéuticos, resaltando la importancia de la expresión de proteínas heterólogas en investigaciones farmacéuticas (Balbás & Lorence, 2004).

En esta investigación se empleó la tecnología del ADN recombinante para estudiar la expresión de la principal subunidad proteica de las fibras curli, la proteína CsgA, usando cepas recombinantes de *E. coli*, LSR12-pMC1/pMC3 y NEB C2566-pNH11.

Una vez expresada la proteína, se purificó por técnicas cromatográficas. Para verificar la formación de fibras amiloides, se polimerizó la proteína purificada *in vitro*, y para evaluar la formación de las fibras amiloides se utilizaron las técnicas instrumentales Espectroscopia de fluorescencia y Microscopia de barrido electrónico (Nilsson, 2004).

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

- ✓ Evaluar la capacidad de las cepas recombinantes de *E. coli* LSR12-pMC1/pMC3 y NEB C2566-pNH11, para biosintetizar la proteína CsgA, en ausencia de las demás proteínas involucradas en la producción de proteínas curli.

1.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar transformación genética para obtener células recombinantes de *E. coli* NEB C2566-pNH11 y LSR12-pMC1/pMC3 que produzcan la proteína CsgA intra y extracelularmente.
- ✓ Seleccionar los mejores clones productores de CsgA para realizar cultivos a gran escala.
- ✓ Evaluar la producción de proteína CsgA intra y extracelular por inducción enzimática y su purificación por cromatografía IMAC.
- ✓ Analizar la polimerización de la proteína CsgA mediante espectroscopia de fluorescencia y microscopia electrónica de barrido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Escherichia coli*.

E. coli es una enterobacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, capaz de fermentar glucosa y lactosa, entre otras características. Ha sido ampliamente estudiada durante décadas, por lo que posiblemente es el organismo del cual se tiene más información a nivel genético, bioquímico y fisiológico. Si bien a la fecha se han secuenciado un gran número de genomas, en el caso de *E. coli* se cuenta con la información más completa y detallada de la función y regulación de muchos de sus genes, así como de sus vías metabólicas y mecanismos de regulación genética (Wu *et al.*, 2004). Los avances en el conocimiento de la fisiología de *E. coli* y en el desarrollo de herramientas moleculares, han permitido la obtención de cepas diseñadas específicamente para la producción de proteínas recombinantes (Lara, 2011).

2.2 Recombinación genética en *E. coli*.

E. coli es el mejor sistema procariótico para la expresión de genes exógenos, siendo el microorganismo preferido para la producción de más de una proteína recombinante en un solo hospedero, pues presenta características favorables, tales como su fácil manipulación genética, gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes, bajos costos asociados a medios de cultivo, alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, y rápida y eficiente expresión, con un tiempo aproximado de un día, para la producción de proteínas, lo que facilita la producción de cultivos a gran escala (Reshamwala & Noronha, 2013) .

Entre los parámetros más importantes para una exitosa producción de proteínas recombinantes en *E. coli* incluyen: eficiencia transcripcional y traduccional, estabilidad del vector de expresión, estabilidad proteolítica, localización y plegamiento de la proteína (Quiroga, 2010) .

Para lograr la expresión de más de una proteína recombinante en un solo huésped, se clonan los genes de interés en diferentes plásmidos que luego son introducidos dentro de una sola célula, proceso denominado transformación génica.

2.2.1 Vectores de expresión.

Un vector de expresión para *E. coli* debe contener todos los elementos que dirigen la transcripción y traducción del gen o los genes diana. Estos elementos incluyen promotores, secuencias reguladoras, terminadores de transcripción y orígenes de replicación, entre otros. Adicionalmente, el vector de expresión debe contener un elemento de selección, que normalmente es un gen que le confiere resistencia a antibióticos, para ayudar a la selección del plásmido dentro de la célula huésped. Otra característica importante de los vectores de expresión de *E. coli* es la presencia de un marcador de fusión, proteínas o péptidos que se unen genéticamente a la proteína de interés, con el fin de mejorar la expresión de la proteína diana, promover el plegamiento, aumentar la solubilidad y facilitar los procesos de purificación y detección (Hatti-kaul & Mattiasson, 2003). En contraste con los demás elementos, estos marcadores de fusión se transcriben en conjunto con los genes de interés. Cuando se traducen, se obtiene una proteína de fusión única, que incluye la proteína de interés y el marcador de fusión. Hoy en día, casi todas las proteínas se expresan con algún tipo de marcador de fusión, y el número y la diversidad de etiquetas está continuamente aumentando (Francis & Page, 2010).

2.2.1.1 Promotores inducibles con IPTG.

Un promotor para la efectiva expresión de proteínas heterológicas en *E. coli* debe tener tres características principales. Primero, éste debe ser fuerte para que la proteína de interés sea expresada entre el 10% y el 50% de las proteínas celulares totales. Además, debe presentar baja actividad transcripcional basal para evitar la transcripción no deseada antes de la inducción. Finalmente, la inducción debe ser simple y rentable (Quiroga, 2010).

El promotor T7 es uno de los promotores comercialmente disponibles para *E. coli*, en el que la expresión génica es impulsada por la RNA polimerasa T7, que transcribe el DNA cinco veces más rápido que la RNA polimerasa bacteriana (Studier & Moffatt, 1986). Debido a que *E. coli* carece de esta enzima, la polimerasa debe ser insertada en la célula mediante un plásmido inducible o mediante el uso de una cepa de *E. coli* que contenga una copia del gen de la polimerasa T7. En ausencia de un inductor, la polimerasa, que a su vez está bajo el control del promotor *lacUV5* (proveniente del operón lactosa en *E. coli*) no se produce, y por consiguiente, el gen de interés no es transcrito. Tras la adición del análogo no hidrolizable de la lactosa, el isopropil β -D1-tiogalactopiranosido (IPTG), la RNA polimerasa T7 se transcribe y se sintetiza. A continuación, la polimerasa inicia la transcripción del gen diana mediante la unión a un promotor específico de polimerasa T7. Una vez inducida, la mayor parte de la maquinaria celular está dedicada a la producción de la proteína recombinante, que comprende hasta 50% de la proteína celular total (Peti & Page, 2007).

El promotor *trc* es un promotor híbrido construido a partir de ciertas regiones del promotor *trp* y del promotor *lacUV5*. Al igual que el promotor T7, su expresión es inducida con IPTG, y es ampliamente usado para sobre expresar proteínas recombinantes en *E. coli*, con un aumento de expresión entre el 15% y el 30% de las proteínas celulares totales (Francis & Page, 2010).

2.2.1.2 Marcadores de fusión: His₆.

Estos residuos son péptidos que se unen genéticamente a la proteína diana. El gen que codifica la expresión del marcador de histidinas, se encuentra ubicado justo después del codón de inicio de la transcripción y expresa 6 a 10 residuos consecutivos de histidina, unidos al extremo N-terminal de la proteína expresada a partir del gen clonado, y sirve como el marcador de afinidad para la rápida y fácil purificación de la proteína (Hatti-kaul & Mattiasson, 2003).

Las proteínas de interés para este estudio, CsgA y CsgA*, tienen como marcador de fusión una cola de seis residuos de histidina (*His₆*). Este marcador no aumenta la expresión de proteína ni su solubilidad, pero si facilita la purificación. Las proteínas unidas a este marcador son purificadas usando cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado, IMAC (por sus siglas en inglés *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) (Hage, 2006).

2.2.2 Extracción plasmídica mediante lisis alcalina.

Muchos métodos han sido desarrollados para aislar ADN plasmídico, pero actualmente, la extracción mediante lisis alcalina es el procedimiento más usado, pues no requiere de instrumentos sofisticados y la extracción se realiza en tan solo unos minutos con altos niveles de eficiencia.

El procedimiento se basa en la ventaja de la desnaturalización alcalina del ADN plasmídico y cromosomal y de la renaturalización selectiva del ADN plasmídico después de la neutralización de la solución.

Se utilizó el kit de extracción *plasmídica UltraClean 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit* de *MO BIO LABORATORIES* (Mo Bio Laboratories. Inc., 2010). Inicialmente las bacterias se lisan mediante tratamiento con una solución que contiene SDS, que desnaturaliza las proteínas de la membrana celular, y NaOH que desnaturaliza todo el ADN plasmídico y cromosomal. Posteriormente la solución se neutraliza

con acetato de potasio, permitiendo que el ADN plasmídico se renaturalice a su forma de doble cadena, mientras que el ADN cromosomal precipita, al igual que el SDS y las proteínas bacterianas, con el acetato de potasio. Este precipitado es eliminado por centrifugación. El ADN plasmídico queda soluble en el sobrenadante y finalmente es obtenido mediante precipitación con etanol.

2.2.3 Transformación.

La transformación es el proceso mediante el cual las bacterias incorporan ADN exógeno, presente en el medio y se introduce a través de la membrana de la célula bacteriana. En algunas especies de bacterias, la transformación ocurre de forma natural, pero en la mayoría, debe realizarse artificialmente (Ausubel *et al.*, 2003). En general, dos métodos son usados para efectuar la transformación celular. El primero es denominado transformación por choque térmico, e implica el uso de cloruro de calcio para contrarrestar la repulsión electrostática entre el plásmido y la membrana celular. Posteriormente, un aumento térmico repentino crea poros en la membrana plasmática, permitiendo la inserción del ADN foráneo. El segundo método, denominado electroporación, requiere la aplicación de un pulso eléctrico de alto voltaje que aumenta la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana celular (Collection, 2013). Ambos métodos hacen porosa la membrana celular, permitiendo la entrada del ADN exógeno.

2.2.3.1 Competencia celular.

Para que ocurra la transformación, la bacteria debe estar en un estado de competencia que ocurre bajo determinadas condiciones fisiológicas, en las que la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten que la célula se vuelva susceptible a la incorporación de ADN. Naturalmente, el ADN no se incorpora dentro de la célula, pues éste es una molécula hidrofílica, mientras que la membrana plasmática está formada por una bicapa lipídica hidrofóbica.

En el presente trabajo, las células se hacen competentes mediante lavados sucesivos con glicerol 10% (v/v), de modo que se disminuya la fuerza iónica de la suspensión celular, al eliminar las sales.

2.2.3.2 *Electroporación.*

La electroporación con alto voltaje es actualmente, el método más eficiente para la transformación de *E. coli* con ADN plasmídico. El procedimiento consiste en aplicar un pulso eléctrico de alto voltaje a la mezcla que contiene las células en estado de competencia y el plásmido que se desea insertar. El pulso eléctrico produce agujeros transitorios en la membrana celular a través del cual entra el ADN foráneo. La intensidad de campo necesaria para la transformación de alta eficiencia de *E. coli* es alrededor de 12.5 kV/cm. Bajo estas condiciones, se han reportado más de 10^{10} células transformadas por μg de plásmido (Ausubel *et al.*, 2003).

2.3 Expresión de proteínas intra y extracelularmente.

Hay dos modos básicos de expresión de proteínas recombinante: intracelular y extracelularmente. En el primer caso, la proteína heteróloga se acumula en el citoplasma de la célula huésped, ya sea como una proteína soluble o como un agregado insoluble. En el segundo caso, la secuencia génica de la proteína heteróloga se modifica para que sea secretada al medio de cultivo. También podría incluirse dentro de la célula huésped, un vector que exprese una proteína chaperona que conduzca a la proteína de interés hacia el medio extracelular. La selección de cualquiera de los modos, afecta a los niveles de expresión, obtención y purificación de la proteína diana (Hochfeld, 2006). Adicionalmente, cada sistema de expresión tiene costos específicos que dependen del proceso que deba seguirse.

Cuando la proteína se alberga en el citoplasma, la producción eficiente de proteínas, generalmente conduce a la formación de cuerpos de inclusión, que se forman a través de la acumulación de intermediarios del plegamiento, en lugar de obtenerse proteínas correctamente plegadas (Choi & Lee, 2004). Obtener la proteína diana pura a partir del extracto de proteínas citoplasmáticas, es una tarea difícil porque este compartimento contiene la gran mayoría de las proteínas celulares totales.

Sin embargo, la formación de cuerpos de inclusión tiene algunos aspectos positivos:

1. Los cuerpos de inclusión pueden acumularse en el citoplasma a niveles mucho más altos (por lo general mayor que 25% de las proteínas totales) que las proteínas solubles.
2. Estas estructuras impiden la degradación de la proteína debida a la gran actividad proteasa que tiene lugar dentro del citoplasma.
3. La recuperación de proteínas a partir de cuerpos de inclusión puede darse mediante centrifugación ya que estas estructuras se generan como agregados insolubles (Otzen & Nielsen, 2008).

Para superar las limitaciones inherentes a la expresión de la proteína citoplasmática, se utilizan sistemas de expresión extracelular. La producción secretora de proteínas recombinantes tiene varias ventajas tales como la simplicidad de la purificación pues no se requiere lisis celular, y el plegamiento correcto de la proteína secretada. Además, se evita la degradación de la proteína de interés, mediada por la actividad proteasa (Choi, Keum, & Lee, 2006).

2.4 Producción de proteínas recombinantes mediante inducción con IPTG.

2.4.1 Temperatura de crecimiento e inducción.

La temperatura de crecimiento y la de inducción son los factores de mayor significancia estadística en la producción de proteínas recombinantes, pues la temperatura afecta directamente la velocidad de transcripción y de traducción de proteínas.

Para *E. coli*, la temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la RNA polimerasa T7, aunque no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas recombinantes, pues el uso de temperaturas inferiores a la del crecimiento óptimo, en algunos casos, puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de proteínas foráneas y, como consecuencia, mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés (Quiroga, 2010). Sin embargo, reducir la temperatura también podría disminuir la sobreproducción de proteínas. La temperatura de inducción usada en el presente estudio, es 37°C, con base en los procedimientos de inducción reportados por diversos investigadores (Wang *et al.*, 2010), (Chapman *et al.*, 2002), (Francis & Page, 2010), (Hammer, Schmidt, & Chapman, 2007a)

2.4.2 Densidad celular en el punto de inducción.

La inducción de la expresión de proteína recombinante debe realizarse en un rango de densidad celular apropiado, de modo que las condiciones metabólicas del cultivo permitan alcanzar una máxima productividad.

Los estudios realizados para evaluar el efecto de esta variable, sugieren, en general, realizar la inducción a altas densidades celulares, pero sin alcanzar la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, puesto que en esta etapa existen

condiciones desfavorables como el agotamiento de nutrientes, la fuerte reducción de la actividad metabólica e incluso, la utilización de proteínas celulares no esenciales como fuente de carbono. En cambio, la inducción a una alta velocidad específica de crecimiento (alta densidad celular), proporciona condiciones metabólicas más favorables como el alto contenido de ribosomas, mayor disponibilidad de nutrientes y menos concentración de subproductos tóxicos. Además, al no encontrarse en una etapa de limitación de nutrientes, se puede reducir la respuesta de estrés antes y después de la inducción (Quiroga, 2010).

De acuerdo con esto, el momento adecuado para realizar la inducción, debería ser la mitad de la fase exponencial, en donde la velocidad de crecimiento celular es rápida, hay suficiente disponibilidad de nutrientes y los microorganismos tienen el tiempo suficiente para sobre-expresar la proteína de interés, pero sin alcanzar la fase estacionaria.

2.5 Fibras amiloides funcionales: curli.

En *E. coli*, las fibras amiloides funcionales o fibras curli, median muchas funciones fisiológicas importantes para la célula. Las fibras curli son el principal componente proteico de la matriz extracelular, producida por la bacteria durante su crecimiento en biopelículas.

Para la producción de fibras curli, *E. coli* alberga dentro de su información genética, un tramo de ADN de aproximadamente 754 pb que contiene promotores y elementos regulatorios que controlan la expresión de *csgBAC* y *csgDEFG*, dos operones que se transcriben divergentemente. El operón *csgBAC* codifica los genes estructurales de curli: CsgA, la principal subunidad proteica, y CsgB, la proteína nucleadora (Reshamwala & Noronha, 2013). La función del tercer gen involucrado, CsgC, aún no es completamente entendida, pero estudios recientes sugieren que ésta proteína puede tener actividad oxidorreductasa dentro del

periplasma, regulando la actividad de la proteína de membrana externa, CsgG (Blanco *et al.*, 2012). El segundo operón *csgDEFG*, codifica cuatro proteínas chaperonas requeridas para el ensamble curli sobre la superficie celular. CsgD es un activador transcripcional del operón *csgBAC*; CsgG, una lipoproteína ubicada en la membrana externa, es requerida para la estabilidad y secreción de CsgA y CsgB; CsgE y CsgF son proteínas que actúan en la regulación y el transporte de CsgA y CsgB hacia la superficie celular (Epstein & Chapman, 2008), (Dueholm *et al.*, 2011).

Aunque para la formación de las fibras curli se requiere de esta completa maquinaria, algunos estudios han mostrado que tanto CsgA como CsgG, pueden ser sobre-expresadas en ausencia de las demás proteínas curli (Zhou *et al.*, 2012). Un estudio publicado por Chapman *et al.*, (2002) indica que cuando CsgA es producida y purificada en ausencia de la proteína nucleadora CsgB, adopta una forma no estructurada y es soluble en el medio extracelular, pero luego de incubación prolongada, ésta se ensambla en fibras que son indistinguibles de las fibras curli polimerizadas *in vivo*. (Chapman *et al.*, 2002)

2.6 Proteína recombinante: CsgA.

Según la base de datos ExPASy, la proteína CsgA es una proteína compuesta por 151 aminoácidos, con peso molecular de 15.099 KDa y pI: 5.27. Su secuencia aminoacídica puede dividirse en tres dominios, como se aprecia en la **Figura 1**: una secuencia señal Sec ubicada en el extremo N-terminal (eliminada de la proteína después de atravesar la membrana interna, desde el citoplasma hacia el espacio periplasmático (Choi & Lee, 2004)), 22 residuos N-terminal involucrados en la secreción a través de la membrana externa y cinco unidades repetitivas imperfectas (R1, R2, R3, R4 y R5) que conforman el esqueleto amiloide resistente a la actividad proteasa (Wang & Chapman, 2008a). Cada unidad forma,

individualmente, una estructura hebra β -bucle-hebra β , que al interactuar con los demás unidades R, se apilan, tomando una estructura secundaria cruz- β (Wang, *et al.*, 2007). Ésta estructura se forma porque las hebras β se apilan perpendiculares al eje longitudinal de las fibras. El núcleo amiloide de CsgA está definido por los aminoácidos Ser, Gln y Asn que se repiten regularmente en cada unidad repetitiva, espaciados por 4 o 5 aminoácidos (Wang & Chapman, 2008b). Morfológicamente, las fibras amiloides pueden variar en longitud desde decenas de nanómetros a micrómetros y tienen un diámetro en el rango de 3 a 10 nm, aunque la asociación lateral puede producir diámetros aparentes mucho más grandes (Shewmaker *et al.*, 2009).

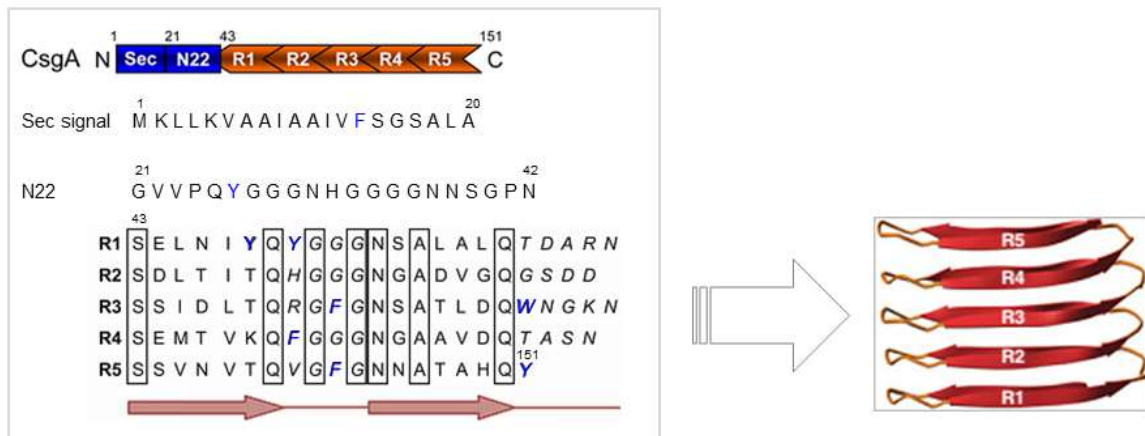


Figura 1. Esquema de CsgA (Loferer, Hammar, & Normark, 1997). Se indican sus tres dominios: Secuencia señal, 22 residuos N-terminal y las cinco unidades repetitivas, que forman estructuras hebra β -bucle-hebra β . Los aminoácidos que conforman la hebra β se encuentran sobre la flecha roja, y en letra cursiva se indican los aminoácidos que conforman el bucle, ubicados sobre la línea roja. En azul se indican los aminoácidos aromáticos, y encerrados se encuentran los aminoácidos conservados en cada unidad R.

Fuente: Tomado y modificado de Hammer *et al.*, (2007).

2.7 Análisis de proteínas.

2.7.1 Cuantificación de proteínas.

El ensayo de Bradford es un método simple y rápido que permite cuantificar proteínas en muestras líquidas. Se utiliza el colorante azul de Coomassie R-250 que se acompleja rápidamente mediante interacciones electrostáticas entre sus grupos ácido sulfónico y los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas (Bradford, 1976). Inicialmente el colorante está en su forma neutra y su coloración es verde, pero cuando se mezcla con las proteínas, el colorante cambia a su forma desprotonada, adquiriendo una coloración azul.

2.7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La electroforesis en gel es una técnica en la que moléculas cargadas, tales como proteínas o ADN, se separan de acuerdo a su peso molecular, movidas a través de un gel por una corriente eléctrica. Las proteínas se separan habitualmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para caracterizar las proteínas individuales en una muestra compleja o para examinar múltiples proteínas dentro de una única muestra. En la SDS-PAGE, la muestra es tratada previamente con el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS), que desnaturaliza las proteínas y se une fuertemente a sus estructuras abiertas, de tal forma que una molécula de SDS se une aproximadamente a dos residuos aminoacídicos, enmascarando la carga superficial de la proteína nativa, y creando una carga neta negativa debida a sus grupos sulfato (ScientificThermo).

La acrilamida es el material que permite la separación de proteínas por su peso. Esta se mezcla con bis-acrilamida formando una red polimérica reticulada. La polimerización está catalizada por un sistema de generación de radicales libres, compuesto de persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED). El TEMED cataliza la descomposición del persulfato de amonio para producir

especies radicalarias de SO_4^- , que activan el monómero de acrilamida. Este monómero activado reacciona con uno desactivado, dando paso a la elongación de la cadena de polímero, generando circuitos cerrados que resultan en un complejo polímero reticulado con porosidad característica (Ahmed, 2005).

El tamaño de los poros creados en el gel es inversamente proporcional a la cantidad de acrilamida usada. Por ejemplo, un gel de poliacrilamida al 7% tendrá poros más grandes en el gel que un gel de poliacrilamida al 12% (ScientificThermo).

2.8 Cromatografía de afinidad con ion metálico inmovilizado (IMAC).

La cromatografía de afinidad es una poderosa herramienta para la purificación de proteínas. El principio de esta técnica está basado en el hecho de que algunas proteínas tienen una alta afinidad por ciertos grupos químicos especiales o ligandos. Estos ligandos están inmovilizados a través de enlaces de coordinación a un agente quelante (EDTA, IDA, NTA, etc.), que a su vez, está unido covalentemente a una matriz insoluble (agarosa, sefarosa, etc.). Luego de pasar la muestra a través de la columna, las proteínas de interés son eluidas bajo condiciones que reduzcan las interacciones proteína-ligando (Hage, 2006).

Este método de purificación ha sido ampliamente usado para la purificación de proteínas recombinantes que residuos de polihistidina unidos a sus extremos N- o C- terminales, de modo que la accesibilidad de los residuos de histidina es favorable para la unión efectiva entre su anillo imidazólico y el metal quelante (Hatti-kaul & Mattiasson, 2003). Ni-NTA agarosa es la resina de preferencia para la purificación de este tipo de proteínas.

La resina Ni-NTA está compuesta por ácido nitrilotriacético (NTA), un ligando quelante tetradentado, unido a una matriz altamente reticulada de agarosa al 6%. El ion metálico es Ni^{2+} , y está unido a NTA mediante cuatro enlaces de coordinación. La **Figura 2** muestra el esquema particular de la resina Ni-NTA.

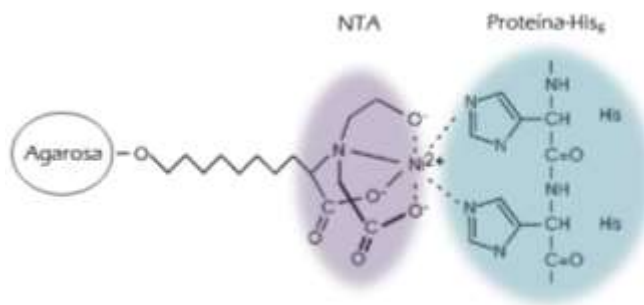


Figura 2. Organización estructural de la resina Ni-NTA y su unión a proteínas marcadas con residuos de histidina. Fuente: Autora.

Para purificar la proteína CsgA-His₆, se utilizó la resina *HisPur Ni-NTA* de *Thermo Scientific*, cuyo manual de instrucciones reporta que su capacidad de enlace es ≤ 60 mg de proteína por mililitro de resina y la proteína se obtiene con más del 75% de pureza.

2.9 Espectroscopia de Fluorescencia con Tioflavina T.

Una de las técnicas más comunes para identificar la presencia de fibras amiloides es la fluorescencia de Tioflavina T (ThT) (Nilsson, 2004), un colorante que se ha reportado como un potente marcador fluorescente en histología amiloide, al unirse selectivamente a los depósitos amiloides, aumentando la intensidad de fluorescencia del colorante. Dicha selectividad ha generado que se recomiende el uso de ThT para verificar la formación de amiloides, por encima de otros

colorantes como el rojo Congo o metilo de violeta, usados regularmente en el estudio de fibras amiloides. Las aplicaciones del ThT han ido más allá de la histología amiloide y hoy en día se usa también para caracterización *in vitro* de amiloides.

Naiki *et al.*, (Naiki *et al.*, 1989) fueron algunos de los primeros investigadores en caracterizar completamente el espectro de fluorescencia y las propiedades de unión de ThT. Ellos demostraron que, una vez se da la unión entre el colorante y las fibras amiloides, se origina aumento de la intensidad de fluorescencia, específicamente, a partir de la unión ThT-fibras amiloides. Esta característica y los varios órdenes de magnitud del aumento en la intensidad de fluorescencia, hacen que ThT sea un indicador altamente sensible y eficiente para el reconocimiento de estructuras amiloides, y que además, permita hacer seguimiento de la fibrilación en tiempo real.

Naiki *et al.* también indican que la unión del colorante se da por interacciones hidrofóbicas con los grupos aromáticos de la secuencia aminoacídica que conforma la proteína CsgA. Estas interacciones le otorgan al ThT, afinidad por la estructura cruz- β , formada por el plegamiento de las hojas *beta*, característico de la agregación de proteínas amiloides, cuyas cadenas corren perpendicularmente a lo largo del eje de las fibras, como se aprecia en la **Figura 3a**.

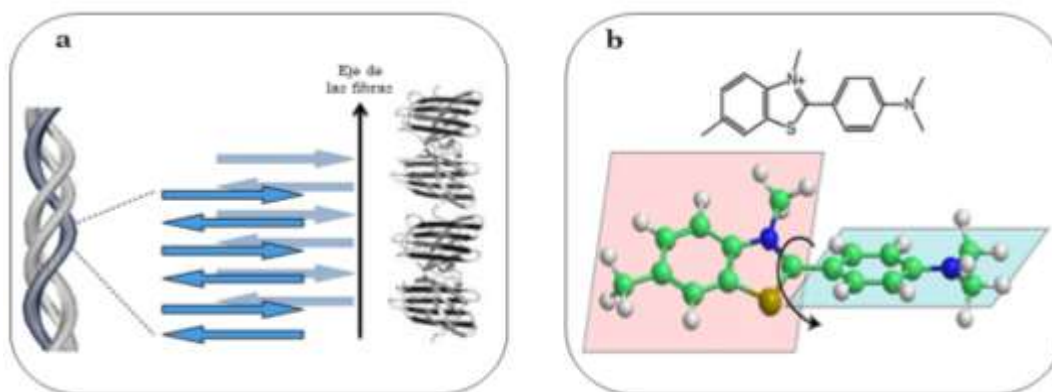


Figura 3. a. Estructura cruz β de fibras amiloides, formadas a partir de las capas de láminas β . **b.** Arriba: Estructura de ThT. Abajo: Rotación de sus grupos aromáticos en torno al enlace común C- C. Fuente: Biancalana & Koide, 2010.

El aumento de la fluorescencia se atribuye a los siguientes hechos: cuando una solución de ThT es irradiada con un haz de luz, los anillos de bencilamina y benzotiazol del ThT (planos azul y rosado, respectivamente), giran libremente sobre su enlace común C-C (Véase **Figura 3b**). Esta rotación satisface los estados de excitación generados por la excitación de fotones, causando una baja emisión de fluorescencia. Por el contrario, cuando ThT interacciona con las fibras, el ambiente estérico impide que los grupos aromáticos del colorante roten en torno a su enlace común, preservando así, el estado excitado y aumentando drásticamente la fluorescencia.

2.10 Microscopia de barrido – SEM

En el análisis por microscopia electrónica de barrido SEM (*Scanning Electron Microscopy*), se hace incidir un haz de electrones sobre la superficie de la muestra, el cual es dirigido por medio de una serie de lentes electromagnéticas. Posteriormente, los electrones chocan con la muestra y dan lugar a un conjunto de

sucesos entre los que se destacan la emisión de electrones (electrones secundarios) y fotones por parte de los átomos que componen la superficie de la muestra. La señal de los electrones secundarios proporciona información de la morfología superficial de la muestra. La imagen SEM es el resultado de la intensidad de los electrones secundarios emitidos para cada punto (x, y) de la superficie de la muestra.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos utilizados.

Las cepas utilizadas en este estudio, hacen parte de la colección del *Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander*.

Los microorganismos que se emplearon, fueron:

Escherichia coli NEB C2566, y *Escherichia coli* NEB C2566-pNH11 para producir la cepa recombinante *Escherichia coli* NEB C2566-pNH11.

Escherichia coli LSR12-pMC1 y *Escherichia coli* MC1061-pMC3 para producir la cepa recombinante *Escherichia coli* LSR12-pMC1/pMC3.

3.1.1 NEB C2566-pNH11.

NEB C2566 es la denominación dada a una *E. coli* competente de alta eficiencia que alberga el promotor T7. Allí se encuentra el plásmido pNH11 que contiene el vector pET11d, dentro del cual se clonó la proteína CsgA sin la secuencia señal de secreción (residuos 1-20). Como consecuencia de ello, la proteína diana se produce de forma intracelular. Adicionalmente, esta proteína fue marcada con 6 residuos de histidina en su extremo C- terminal. A lo largo del presente escrito, se nombrará esta proteína como CsgA*-His₆. Las propiedades del vector de clonación, permiten que la expresión de dicha proteína sea inducible por el IPTG, y que la cepa sea resistente a la ampicilina.

3.1.2 LSR12-pMC1/pMC3.

LSR12 es la denominación dada a una *E. coli* a la que se le han eliminado todos los genes *csg*. Para la producción extracelular de la proteína CsgA, se le han introducido dos plásmidos: pMC1 y pMC3. El plásmido pMC1 codifica la proteína CsgG, que media la secreción de la proteína diana CsgA, hacia el medio extracelular. El plásmido pMC3 codifica la proteína CsgA, marcada con 6 residuos de histidina en su extremo C- terminal. Esta proteína recombinante será nombrada como CsgA-His₆.

3.2 Crecimiento celular en medio líquido e inducción de la expresión de proteínas recombinantes.

Para todos los ensayos, el medio de cultivo líquido fue preparado con Luria Bertani (25 g/L) y glucosa (15 g/L), más el/los antibióticos de selección requeridos para cada cepa.

Se preparó un pre-inóculo que correspondía al 10 % del inóculo total deseado. Cada pre-inóculo se preparó adicionando una o dos colonias tomadas del cultivo sólido y se dejó crecer durante toda la noche con agitación constante en Shaker a 130 rpm de agitación orbital a 37 °C.

Posteriormente, el pre-inóculo se adicionó al cultivo a gran escala (que corresponde al 90% restante del inóculo total deseado) y se dejó crecer a 37 °C con agitación constante, hasta alcanzar un OD₆₀₀ ~1, para posteriormente, agregar el inductor.

3.2.1 Inducción de la expresión de CsgA*-His₆.

El cultivo de 500 mL se indujo con IPTG 0.50 mM y se dejó crecer durante una hora con agitación constante en Shaker a 130 rpm y 37 °C. Finalmente, las células

fueron decantadas por centrifugación a 5000xg, 20 minutos y se eliminó el sobrenadante, obteniéndose un pellet que corresponde a la biomasa total del cultivo bacteriano.

3.2.2 Inducción de la expresión de CsgA-His₆.

El cultivo de 500 mL se indujo con IPTG 0.25 mM y se dejó crecer durante una hora con agitación constante en Shaker a 130 rpm y 37 °C.

3.3 Células recombinantes.

3.3.1 Obtención de células competentes.

Previamente se realizó un inóculo de 30 mL de las cepas LSR12/pMC1 y NEBC2566, y se dejó en crecimiento toda la noche. A continuación, se enfrió el cultivo usando hielo durante aproximadamente 20 minutos. En adelante todo el procedimiento se realizó en frío. El cultivo se centrifugó a 4000xg, 4 °C durante 15 minutos y cuidadosamente se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado tres veces adicionando una solución de glicerol frío al 10% (v/v) y centrifugando a 4000xg luego de cada adición. Se usaron 30, 15 y 1.2 mL de glicerol, para el primer, segundo y tercer lavado, respectivamente. Finalmente el pellet se resuspendió en 120 µL de glicerol.

3.3.2 Extracción del ADN plasmídico.

Los plásmidos fueron extraídos de las cepas NEBC2566-pNH11, MC1061-pMC3, crecidas en placas de agar con medio de cultivo LB, suplementado con los antibióticos de selección: Ampicilina (100 µg/mL) y Cloranfenicol (25 µg/mL), respectivamente. Se usó el kit de extracción de plásmido *UltraClean® 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit*, siguiendo el protocolo indicado.

3.3.3 Electroporación.

Los plásmidos extraídos, pNH11 y pMC3, se introdujeron en células competentes de *E. coli*, NEBC2566 y LSR12-pMC1, respectivamente, mediante electroporación. Se mezclaron 100 μ L de célula competentes, con 5 μ L de ADN plasmídico en una cubeta de 0,2 cm (Bio-Rad), enfriada en hielo. Las células fueron electroporadas usando el *MicroPulserTM Electroporation Apparatus*, aplicando un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5ms, e inmediatamente después, estas células transformadas se adicionaron a 1 mL de medio LB sin antibiótico y se dejaron crecer por 1h a 37°C en Shaker a 225 rpm.

3.3.4 Siembra del cultivo celular recombinante.

El inóculo de 1 mL se centrifugó a 14000xg por 2 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 80 μ L de caldo LB, del cual se tomó 1 μ L para la siembra en placa de agar, suplementadas con los antibióticos de selección.

3.4 Análisis de proteínas.

3.4.1 Cuantificación de proteínas.

Las fracciones eluidas se cuantificaron por el método de Bradford. Para esto se preparó una curva de calibración utilizando soluciones patrón de albúmina de suero bovino (BSA), disueltas en *Buffer* KPi 50 mM, pH 7.2 a concentraciones entre 0.1 y 1 mg/mL (Ver **ANEXO A**). Se tomaron 20 μ L de muestra y se agregó 1 mL de Bradford. Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro UV-vis convencional a 595 nm.

3.4.2 Selección de clones mediante SDS-PAGE.

La evaluación de la expresión de proteínas se realizó usando geles de poliacrilamida 15%. Las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con buffer de

carga desnaturizante. El marcador usado fue *PageRuler™ Unstained Protein Lader* (Thermo Scientific), del cual se adicionaron 4 µL en cada análisis. La electroforesis se realizó en una cámara vertical *MiniProtean II* de Bio-Rad, y una fuente de poder *Power Pac HC* de Bio-Rad (Véase **Figura 4**), bajo voltaje constante de 150 V, con 1 L de *Buffer* de corrida.



Figura 4. Montaje empleado para los procedimientos electroforéticos. Fuente: Autora.

3.4.2.1 Tinción.

Al finalizar la electroforesis, se realizó la tinción de los geles con solución de *Coomassie* coloidal R-250. Cada gel se dejó en contacto con 50 mL de esta solución durante 30 minutos, con agitación en Shaker a 40 rpm, luego, se dejó en contacto con solución decolorante fuerte durante 15 minutos, bajo las mismas condiciones de agitación. Finalmente, se adicionaron 50 mL de solución decolorante débil y se dejó en contacto con el gel durante toda la noche hasta revelar las bandas de proteína.

3.5 Obtención del extracto total de proteínas.

3.5.1 Lisis celular por precipitación de proteínas con MeOH/Cloroformo Este procedimiento se realizó con la cepa NEB C2566-pNH11, ya que esta alberga la proteína diana dentro del citoplasma celular. Se siguió el protocolo descrito por Wessel & Flügge, 1984.

3.5.2 Al pellet celular obtenido a partir del crecimiento en caldo de cultivo, se agregaron 300 mL de cloroformo y 100 mL de metanol. La mezcla se homogenizó usando vórtex. Posteriormente se adicionaron 300 mL de agua tipo I, mezclando con vórtex y luego la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 10 000xg. Se evidenciaron 3 fases: una fase sólida intermedia entre dos fases acuosas. Cuidadosamente se eliminaron las fases acuosas pues estas sólo contenían lípidos y demás componentes celulares, mientras que las proteínas quedaron precipitadas en la fase sólida. Se adicionaron, posteriormente, 300 mL de metanol y de nuevo se aplicó vórtex para homogenizar la mezcla y luego se centrifugó durante 5 min, 10 000xg. Se retiró el sobrenadante y las trazas que pudieron quedar se eliminaron por sequedad al aire libre. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 mL de urea 8 M.

3.5.3 Obtención por centrifugación.

Ya que la cepa LSR12-pMC1/pMC3 secreta la proteína al medio extracelular, el cultivo celular líquido se centrifugó a 10 000xg, 4 °C durante 15 minutos, para decantar toda la biomasa celular y obtener el sobrenadante libre de microorganismos. El sobrenadante contenía el total de proteínas secretadas y para obtener una mayor concentración de proteínas, se centrifugó en filtros *Amicon® Ultra-15* de 10 KDa, a 5000 rpm, 4 °C durante 15 minutos.

3.6 Purificación proteica mediante IMAC.

3.6.1 Acondicionamiento de la resina Ni-NTA.

En un tubo Falcon de 15 mL se dispusieron 3 mL de mezcla de resina-metanol 1:1, que fue centrifugado durante 2 minutos a 700xg. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo un volumen final de resina de 1.5 mL. Para su acondicionamiento, se lavó y centrifugó durante 2 minutos a 700xg, con 5 mL de buffer Kpi 50 mM, pH 7.2. Este procedimiento se realizó 3 veces, eliminando el sobrenadante cada vez.

3.6.2 Purificación de *CsgA-His₆*.

La purificación de esta proteína se realizó utilizando una columna, equipada con bomba peristáltica para mantener constante el flujo del paso de la muestra. Como fase estacionaria se usaron 2 mL de resina Ni-NTA. La muestra de proteínas se cargó a través de la columna cromatográfica a razón de 4mL/min. Posteriormente, la resina se lavó con 20 mL de *Buffer* fosfato de potasio (Kpi) 50 mM, pH 7.2 a razón de 4mL/min. Finalmente, la proteína fue eluída con 4 mL de solución de imidazol 0.5 M en *Buffer* Kpi, a razón de 0.1 mL/min. Todo el procedimiento de purificación se llevó a cabo a 4 °C.

3.6.3 Purificación de *CsgA^{*}-His₆* en un método por lotes.

La resina acondicionada y el pellet de proteínas se pusieron en contacto durante 30 minutos, a 4 °C, con agitación constante. Posteriormente se centrifugó la mezcla por 2 minutos a 700xg y el sobrenadante fue descartado. Para eliminar uniones no covalentes, se lavó la resina con 5 mL de *Buffer* Kpi 50 mM, pH 7.2, y se centrifugó por 2 minutos a 700xg. Este procedimiento se realizó tres veces y el sobrenadante fue eliminado cada vez. Para la elución de la proteína se adicionaron a la resina 2 mL de solución de imidazol 0.5 M en *Buffer* Kpi 50 mM, pH 7.2, y se centrifugó por 2 minutos a 700xg; el sobrenadante fue removido cuidadosamente y almacenado a 4 °C. El procedimiento se repitió tres veces, por lo que se obtuvo un volumen total de proteína eluída de 6 mL.

3.7 Espectroscopia de fluorescencia.

Previamente se preparó solución *stock* de ThT adicionando 2 mg de colorante a 2 mL de Buffer fosfato 50 mM, pH 7.2, para obtener una concentración final de 1 mg/mL.

Se prepararon soluciones de proteína de concentraciones 2, 4, 8 y 12 μM , y se mezclaron con solución *stock* de ThT, de modo que su concentración final fuera de 20 μM . La adición de ThT a la muestra se realizó justo antes de realizar la medida. Los espectros se tomaron en el espectrofluorímetro modular *PTI Quantamaster QM-40* (Véase **Figura 5**), equipado con una lámpara de Xenón como fuente de radiación y el *Photomultiplier 814* como detector. Los espectros fueron tomados en un rango espectral de 420 a 600 nm, a longitudes de onda de excitación y emisión de 412 y 420 nm, respectivamente.



Figura 5. Espectrofluorímetro *Photon Technology International, Quantamaster QM-40*.
Fuente: Autora.

3.8 Microscopia de barrido – SEM.

Las microscopías electrónicas de barrido (SEM) se tomaron usando un equipo *QUANTA FEG 650 (FEI)* con detector LFD (*Large Field Detector*) (Véase **Figura 6, Der.**). La preparación de la muestra consistió en incubar la muestra a temperatura

ambiente, y luego adicionar 2 μ L sobre la superficie de una mica de muscovita (Véase **Figura 6, Izq.**) y dejarla secar al aire para permitir que el solvente se evaporara. La proteína CsgA*-His₆ se incubó durante 72 horas, mientras que la proteína CsgA-His₆ se incubó durante 1 hora. En ambos casos, la muestra ya inmovilizada sobre la mica, se recubrió con una delgada capa de carbono para conferirle propiedades conductoras.



Figura 6. Der.: Inmovilización de la muestra sobre una mica de muscovita. **Izq.:** Microscopio electrónico QUANTA FEG 650. Fuente: Autora.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento de cepas recombinantes y verificación de la adquisición plasmídica.

La verificación de la adquisición plasmídica, y por ende, la eficaz obtención de las cepas recombinantes, se confirmó al observar crecimiento de colonias en las cajas Petri suplementadas con los antibióticos de selección.


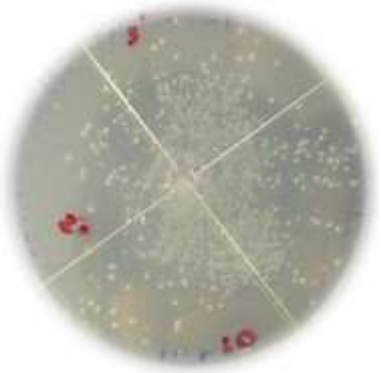

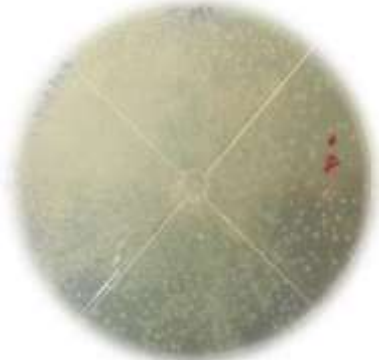
Las células transformadas se adicionaron sobre el agar en cantidades de 1 μL , 5 μL y 10 μL , y fueron dispersadas en modo de siembra por extensión, usando un asa de vidrio.




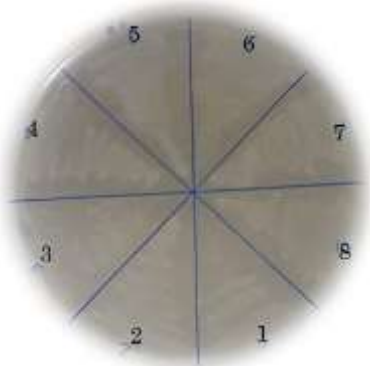


La cepa NEBC2566-pNH11 contenía un gen que le confería resistencia a la ampicilina, mientras que la cepa LSR12-pMC1/pMC3 contenía un gen que le confería resistencia a los antibióticos ampicilina y cloranfenicol. Como se muestra en la tabla 1, la transformación para ambas cepas fue eficiente, ya que para la mínima cantidad sembrada, 1 μL , creció un gran número de colonias aisladas, y en las cajas Petri en las que se adicionaron 10 μL de células transformadas, el crecimiento fue tan masivo, que no fue posible seleccionar colonias aisladas para el posterior procedimiento de selección del mejor clon productor de proteína recombinante. Este método de verificación de la eficiencia de la transformación es infalible, pues las células que no adquirieron el plásmido durante la electroporación, simplemente no crecen sobre el agar suplementado con el/los antibióticos de selección.

De cada cepa, se seleccionaron ocho clones para analizar por SDS-PAGE y determinar cuál de estos presentaba mayor producción de proteínas.

Como control de la función de selección de los antibióticos, se adicionaron 10 μL de células recién transformadas de cada cepa, sobre agar-LB. El resultado fue el esperado: como no había un mecanismo que permitiera que solo crecieran las células que adquirieron el ADN foráneo, hubo crecimiento celular uniforme sobre toda la superficie del agar, como se observa en la **Tabla 1**. Esto permitió verificar la actividad selectiva de los antibióticos sobre las células transformadas.

Tabla 1. Verificación de la transformación celular.

Cantidad sembrada	Cepa recombinante	
	NEB C2566-pNH11	LSR12-pMC1/pMC3
1 μL		
5 μL		

10 μ L		
Selección de clones		
Control 10 μ L		

4.2 Selección del clon con mayor expresión de proteína recombinante, mediante análisis SDS-PAGE.

Las imágenes digitales de los geles fueron analizadas mediante el software *Quantity One 4.6.3* de Bio-Rad, usando la opción de cálculo “cantidad relativa”.

Esta herramienta de análisis suma la intensidad de todas las bandas definidas para cada carril, y lo iguala al 100%, por lo que la intensidad de cada banda será reportada como una fracción de dicha suma.

Como criterio de selección del mejor clon productor de la proteína de interés, la comparación de los porcentajes relativos de intensidad de banda se realizó solo entre aquellas detectadas en pesos moleculares alrededor de 17.5 y 35 KDa, que corresponderían al peso de la proteína CsgA-His₆ en forma monomérica y dimérica, respectivamente (Chapman *et al.*, 2002).

La **Figura 7** muestra el gel obtenido para los clones de la cepa NEB C2566-pNH11. Un chequeo a simple vista permite descartar los clones 2 y 4 debido a que presentan una menor expresión de proteínas totales, en relación con los demás clones. En la gráfica se resaltan las bandas escogidas como criterio para la selección del clon.

Teniendo en cuenta que en la cepa NEB C2566-pNH11, la proteína CsgA*-His₆ se produce del citoplasma y se obtiene mediante lisis celular, se esperaba obtener gran cantidad de bandas, correspondientes al contenido proteico celular, tal como se evidencia en la imagen.

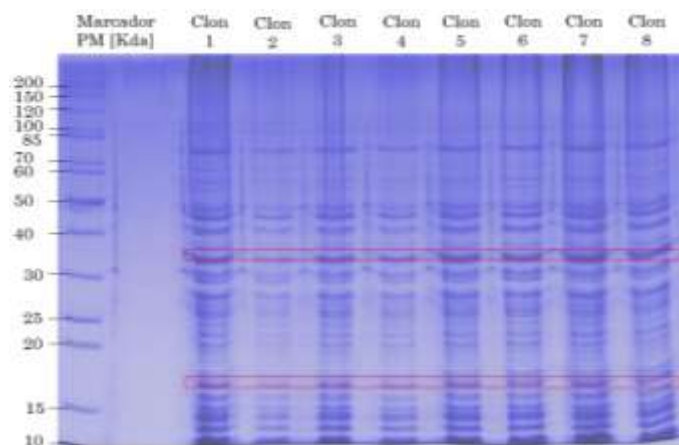


Figura 7. SDS-PAGE para los clones obtenidos a partir de la cepa recombinante NEB C2566-pNH11. Se resaltan las bandas alrededor de 17 y 35 KDa.

En la **Tabla 2** se resumen las cantidades relativas de la intensidad de las bandas de interés, obtenidas para la cepa NEB C2566-pNH11. De acuerdo con los resultados, el clon seleccionado para producir y purificar la proteína recombinante a mayor escala, fue el clon 8.

Tabla 2. Comparación de las cantidades relativas de las bandas de interés, obtenidas a partir de la cepa NEB C2566-pNH11.

Peso Molecular [KDa]	% Intensidad de banda							
	Clon							
	1	2	3	4	5	6	7	8
~ 35	2.8	2.1	2.5	2.3	2.9	3.0	3.8	4.0
~ 17	2.2	1.4	2.0	1.6	2.4	2.1	2.0	2.0

Por otra parte, el perfil proteico obtenido para la cepa LSR12-pMC1/pMC3 fue considerablemente diferente al anterior. Teniendo en cuenta que esta cepa secreta la proteína al medio extracelular, la obtención de la proteína requirió centrifugar el sobrenadante en filtros Amicon de 30 KDa, con el fin de eliminar medio de cultivo, para obtener un menor volumen en el que la proteína estuviese más concentrada. A pesar de este proceso, se obtuvo un gel de electroforesis en el que, para todos los clones, el perfil proteico fue muy desfavorable para realizar la elección del mejor clon productor de proteína recombinante. Por lo tanto, se decidió escoger cuatro de los ocho clones seleccionados inicialmente, con los que se repitió el proceso de concentración en Amicon. Con este proceso, se obtuvo un gel de electroforésis en el que las bandas fueron muy tenues pero suficientes para elegir uno de estos clones, como se aprecia en la **Figura 8**. Teniendo en cuenta el peso molecular reportado por Chapman *et al.* (2002) quienes realizaron sus investigaciones extrayendo proteína CsgA a partir de una cepa con características similares a la del presente estudio, las bandas elegidas como criterio de selección fueron aquellas cuyos pesos moleculares estuvieron alrededor de 17 KDa.

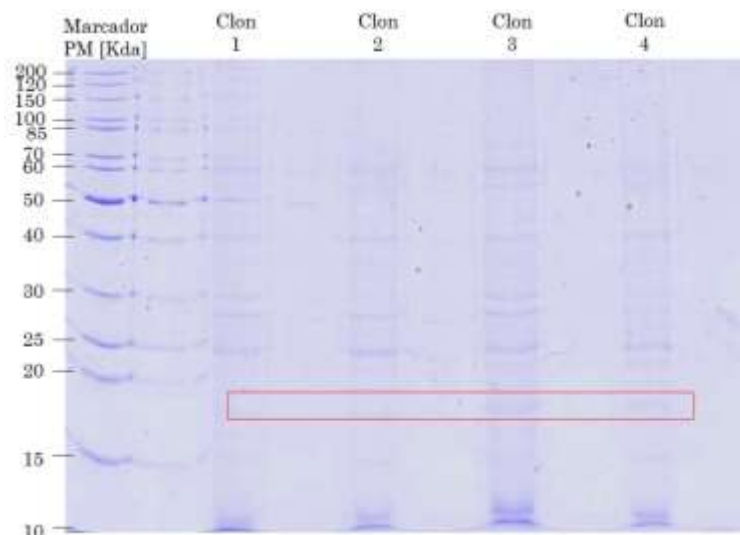


Figura 8. SDS-PAGE para los clones obtenidos a partir de la cepa recombinante LSR12-pMC1/pMC3. Se resaltan las bandas alrededor de 17 KDa.

La dificultad para obtener mayor cantidad de proteína y por ende, mayor intensidad de bandas, está soportado en las diversas investigaciones realizadas en cuanto a los bajos rendimientos de proteína recombinante, obtenidos cuando ésta es secretada al medio extracelular, (J H Choi & Lee, 2004) (Jong Hyun Choi et al., 2006) como es el caso de la proteína CsgA-His₆. Además, debe tenerse en cuenta que para este análisis, el cultivo era de tan solo 30 mL, una cantidad que corresponde a cultivo en pequeña escala, lo que disminuye aún más, las posibilidades de obtener mayores rendimientos de proteína.

La **Tabla 3** contiene las cantidades relativas de la intensidad de las bandas correspondientes a pesos moleculares ~17 KDa. En este caso no se detectaron bandas alrededor de 35 KDa, y es posible que se deba al hecho de que la proteína CsgA-His₆ es secretada de la célula, como una proteína soluble y no polimerizada (Hammer, Schmidt, & Chapman, 2007b). De acuerdo con estos resultados, el clon elegido fue el número 3.

Tabla 3. Comparación de las cantidades relativas de las bandas de interés, obtenidas a partir de la cepa LSR12-pMC1/pMC3.

Peso Molecular [KDa]	% Intensidad de banda			
	Clon			
	1	2	3	4
~ 17	3.3	4.1	5.3	4.5

Finalmente, dos los clones seleccionados fueron sembrados en modo estriado sobre medios sólidos LB-amp y LB-amp/clor, según correspondiera, para continuar con los procesos de obtención y purificación de la proteína recombinante.

4.3 Crecimiento celular en medio líquido e inducción con IPTG.

Cuando un medio líquido es inoculado con un pequeño cúmulo de células, estas inician una la fase de adaptación o fase *lag* en el que las células se adaptan a su nuevo entorno e incrementa la expresión de los genes importantes para el crecimiento. Luego, entre los 80 y 120 minutos, inician su ciclo de división celular en una fase denominada fase de crecimiento exponencial o logarítmica. Eventualmente la densidad celular aumenta a tal punto en que los nutrientes y el oxígeno del medio se agotan, generando una disminución en la velocidad de síntesis de macromoléculas, Esta fase es denominada como fase de transición. Finalmente, las células entran a la fase estacionaria, en la que los nutrientes se agotan y se detiene el crecimiento celular.

Las **Figuras 9 y 10** muestran la cinética de crecimiento obtenida para las cepas de estudio. Las absorbancias se midieron a 600 nm. Para ambos casos, se identifican claramente las cuatro fases características del crecimiento de la bacteria *E. coli*: fase de adaptación, o fase “*lag*”, indicada como **A**; fase logarítmica o exponencial, **B**; fase de transición, **C**; y fase estacionaria, **D**. Como se mencionó en el numeral

2.4.2. el momento adecuado para adicionar el inductor IPTG al cultivo bacteriano, debería ser la mitad de la fase exponencial, en donde la velocidad de crecimiento celular es rápida pues los microorganismos se encuentran en la etapa de división celular y la disponibilidad de nutrientes favorece la efectividad del proceso.

Por lo tanto y de acuerdo con la cinética de crecimiento mostrada por cada cepa, el momento indicado para realizar la inducción es cuando la densidad óptica medida a 600 nm (OD_{600}) es de aproximadamente 1. Este resultado concuerda con la mayoría de los procedimientos reportados por diferentes autores, en los que se indica que la inducción de CsgA debe realizarse cuando el OD_{600} del cultivo celular, esté entre 0.9 y 1 (Wang *et al.*, 2010), (Francis & Page, 2010), (Zhou *et al.*, 2012).

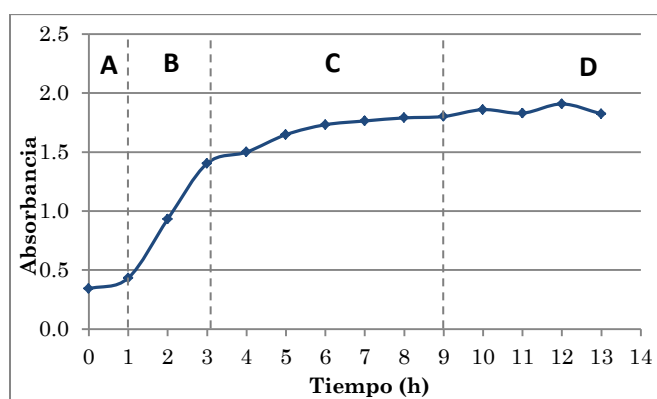


Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* NEB C2566-pNH11.

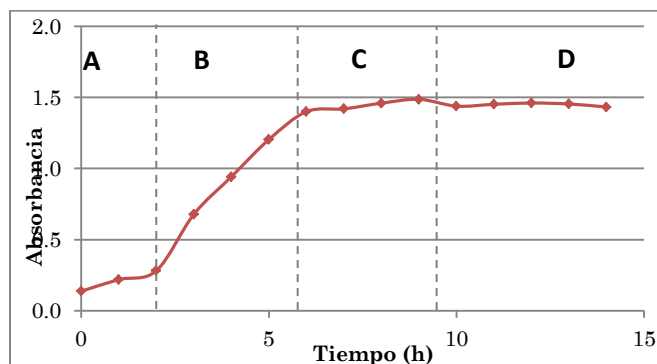


Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* LSR12-pMC1/pMC3.

Por otra parte, para determinar el tiempo ideal de crecimiento luego de la inducción, se realizó un ensayo en el que se tomaron muestras de cultivo celular líquido a diferentes tiempos luego de haber adicionado el IPTG. El procedimiento de obtención del crudo proteico se realizó siguiendo la metodología descrita en el numeral **3.5.1**. Las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford. La mayor concentración de proteína total se obtuvo cuando se dejó crecer el cultivo inducido durante 1 hora. La tabla 4 resume las concentraciones de proteína total obtenidas a partir de la cepa NEB C2566-pNH11, para los diferentes tiempos de inducción evaluados.

Tabla 4. Concentración del cultivo celular a diferentes tiempos de inducción.

Tiempo después de la inducción [h]	Concentración [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
0	2.37
0.5	1.70
1	5.69
1.5	2.48
2.0	2.46
2.5	1.97
3.0	2.46

Los resultados evidenciaron que el tiempo ideal de inducción es una hora, pues este ensayo presentó la mayor concentración de proteína total ($5.69 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), respecto a los demás ensayos ($\sim 2.00 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Del mismo modo, se determinó que el tiempo de inducción ideal para la cepa LSR12-pMC1/pMC3, también fue una hora.

4.4 Purificación, cuantificación y análisis SDS-PAGE de las proteínas recombinantes CsgA-His₆ y CsgA*-His₆.

Se purificó la proteína CsgA-His₆ a partir del sobrenadante del cultivo celular de la cepa LSR12-pMC1/pMC3, y la proteína CsgA*-His₆ a partir de extracto obtenido mediante lisis celular de la cepa NEB C2566-pNH11. La purificación se llevó a cabo utilizando dos métodos diferentes: purificación por lotes, también denominado *batch method* y purificación por flujo en columna, de acuerdo con la ubicación intra o extracelular de proteína de interés. En ambos casos, el proceso se realizó usando IMAC, con resina Ni-NTA, altamente específica para purificar proteínas marcadas con residuos de histidina.

En la fase de elución de las proteínas, se recogieron fracciones de 1 mL para monitorear el proceso de purificación. Cada fracción fue cuantificada por el método de Bradford.

Finalmente, las fracciones que presentaron mayor concentración de proteína, fueron mezcladas y filtradas en Amicon de 10 KDa, con el fin de obtener un extracto de proteína purificada más concentrado. En la tabla 5 se indican las concentraciones finales de cada extracto de proteína, con las que se realizaron las posteriores pruebas de electroforesis, espectroscopia de fluorescencia y microscopia.

Tabla 5. Concentración de las proteínas purificadas.

Proteína recombinante	Concentración [mg/mL]
CsgA-His ₆ (Cepa LSR12-pMC1/pMC3)	0.206
CsgA*-His ₆ (Cepa NEB C2566-pNH11)	0.387

Con el fin de determinar la presencia y pureza de las proteínas, los eluidos fueron sometidos a separación electroforética en geles de SDS-PAGE al 15 % (**Figura 11**). En ambos casos, se observaron bandas proteicas de pesos moleculares alrededor de 15 KDa, correspondientes a la forma monomérica de las proteínas, y bandas correspondientes a su forma dimérica, en pesos moleculares cercanos a 35 KDa.

Esta observación es consistente con los resultados obtenidos por Chapman *et al.*, (Chapman *et al.*, 2002), en los que indican que la proteína CsgA no solo se polimeriza a temperatura ambiente, sino que también lo hace a 4°C. Esto sugiere que durante el proceso de purificación realizado en el presente estudio, la proteína se polimerizó, pero con una baja velocidad de agregación.

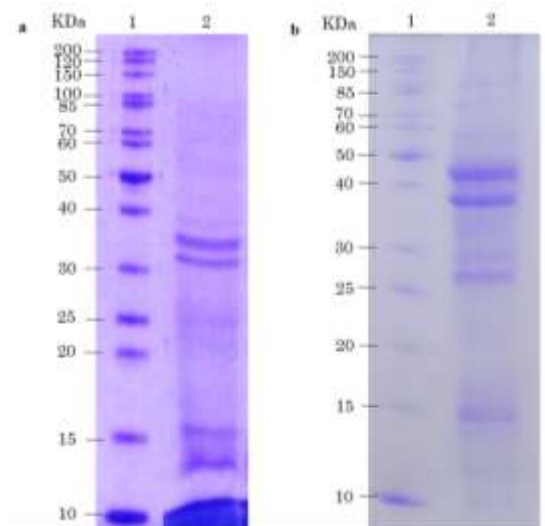


Figura 11. Imágenes SDS-PAGE de la purificación de las proteínas recombinantes: **a.** CsgA-His6. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: 25 μ L de muestra (5 μ g de proteína). **b.** CsgA*-His6. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: 15 μ L de muestra (5 μ g de proteína).

A pesar de que las concentraciones de proteína son bajas, los resultados de espectroscopia de fluorescencia y SEM permitieron identificar la formación de las fibras amiloides.

4.5 Espectroscopia de fluorescencia.

La verificación de la formación de fibras amiloides se realizó mediante espectroscopia de fluorescencia. Para ello, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de CsgA-His₆ y CsgA*-His₆ y se mezclaron con solución de ThT 20 μ M. Los espectros fueron normalizados a 100 con el fin de estandarizar la medida de tal forma que se minimizara la variabilidad de los datos, debido a diferencias en la escala.

En las **Figuras 12 y 13** se observan los espectros de emisión de las diferentes concentraciones de CsgA-His₆ y CsgA*-His₆, respectivamente, que fueron tomados en el tiempo cero, momento en que se agregó el ThT.

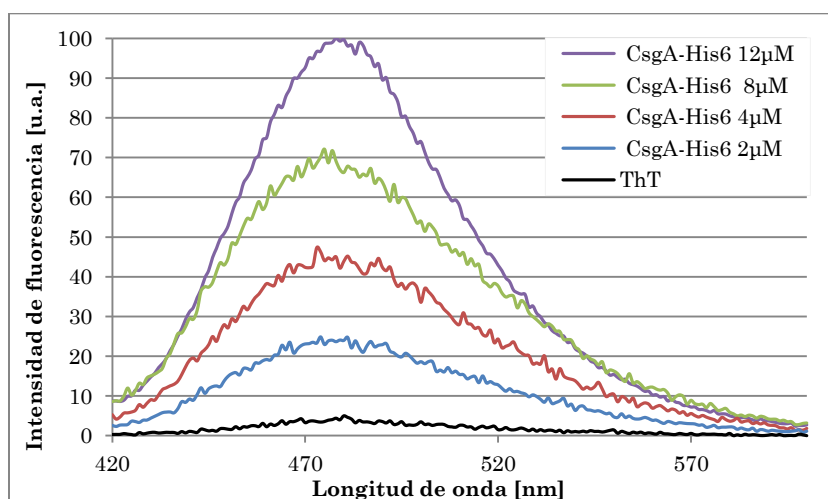


Figura 12. Espectros de fluorescencia obtenidos para diferentes concentraciones de CsgA-His6 purificada a partir de la cepa LSR12-pMC1/pMC3.

El aumento de la intensidad de fluorescencia del ThT cuando se mezcla con la muestra purificada, es un indicador clave que evidencia la formación de fibras amiloides debida a la polimerización de las proteínas CsgA-His₆ y CsgA*-His₆. Además, se puede afirmar que las proteínas han adoptado una estructura secundaria en forma de hoja β , pues ThT reconoce e interactúa inequívocamente con estas estructuras (Dueholm et al., 2011), (Biancalana & Koide, 2010) .

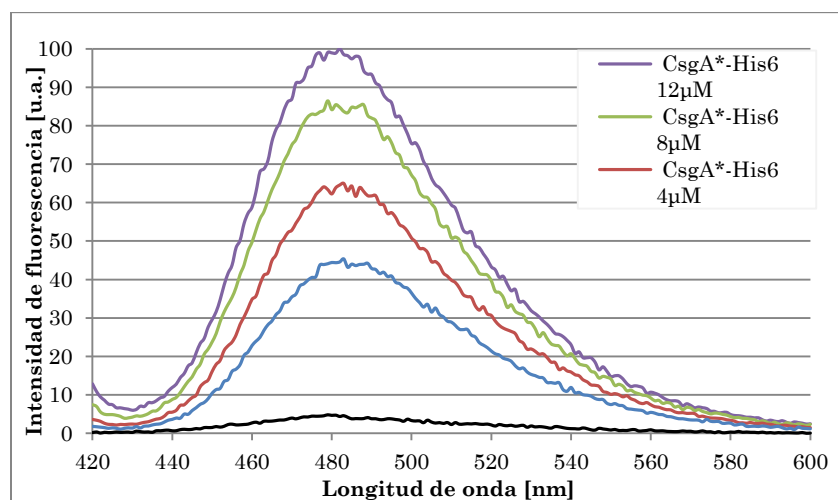


Figura 13. Espectros de fluorescencia obtenidos para CsgA*-His6 purificada a partir de la cepa NEB C2566-pNH11, medidos a diferentes concentraciones de proteína.

Como se observa en los espectros, hay una relación proporcional entre la concentración de proteína y la intensidad de fluorescencia. La **Figura 14** ilustra con mayor claridad esta relación.

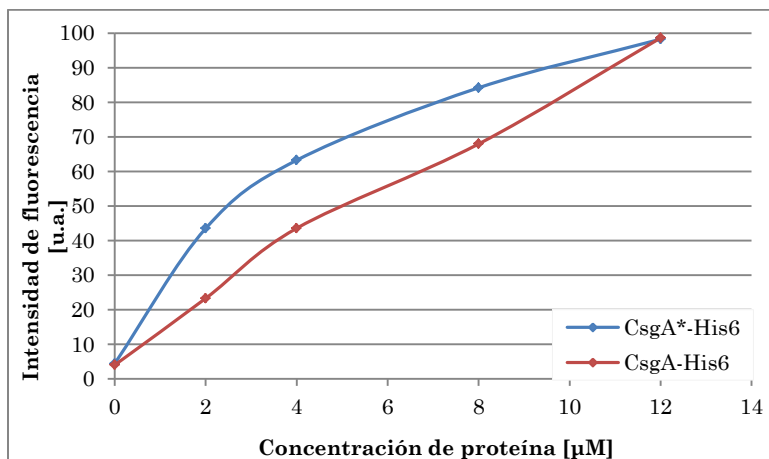


Figura 14. Relación entre la concentración de proteína y la intensidad de fluorescencia.

También se observa que la proteína CsgA*-His₆ alcanza mayores intensidades que la proteína CsgA-His₆. La explicación a este comportamiento se evidenció posteriormente con los análisis SEM de las proteínas. La muestra correspondiente a la proteína CsgA*-His₆, mostró mayoritariamente, una base de estructuras con diferentes morfologías, que en primera medida corresponderían a los denominados cuerpos de inclusión que, como se mencionó anteriormente, se presentan en gran cantidad cuando la proteína diana se alberga dentro del citoplasma. En contraste, la proteína CsgA-His₆ generó un entramado fibrilar muy similar a las biopelículas formadas por la producción y expresión de proteínas curli en sistemas bacterianos de *E. coli*.

Por otra parte, se pretendía observar el proceso de fibrilación a través del tiempo. Para ello, cada muestra fue monitoreada espectroscópicamente a intervalos de tiempo de 1 hora. Sin embargo, con ninguna muestra fue posible observar esta variación, ya que siempre se obtenían espectros con la misma intensidad que en el tiempo cero. Este hecho se atribuye a factores térmicos asociados con las condiciones de polimerización de la proteína CsgA (El término CsgA se refiere, en forma general, a la principal subunidad proteica de las fibras amiloides,

independientemente de si ésta se obtuvo a partir del sobrenadante bacteriano o mediante lisis celular, e independiente de la cola de poli-histidina, pues esta no interfiere con los procesos de polimerización).

4.6 Microscopia electrónica de barrido – SEM

Las micrografías SEM permitieron observar la morfología de las fibras amiloides formadas a partir del plegamiento de las proteínas CsgA-His₆ y CsgA*-His₆.

De acuerdo con estudios sobre la morfología de especies amiloidogénicas, la agregación de proteínas amiloides está precedida por la formación de una serie de especies no fibrilares que van desde perlas esféricas hasta micelas o agregados oligoméricos globulares amorfos (Chiti & Dobson, 2006), especialmente cuando las proteínas amiloides se albergan en el citoplasma celular, como es el caso de la proteína CsgA*-His₆. Todos estos agregados, han sido denominados protofibrillas. La formación de protofibrillas se da por la agregación de dos o más estructuras amorfas, y la subsecuente elongación tras la agregación de más unidades (Blackley *et al.*, 2000).

La **Figura 15** corresponde a las micrografías tomadas a la proteína CsgA*-His₆. Las imágenes revelan la formación de protofibrillas oligoméricas de diferentes tamaños (señaladas con flechas verdes) y de agregados oligoméricos circulares (encerrados en círculos azules). Adicionalmente se observa un fondo constituido por un sin número de posibles cuerpos de inclusión, generados por la alta concentración de proteína recombinante dentro del citoplasma.

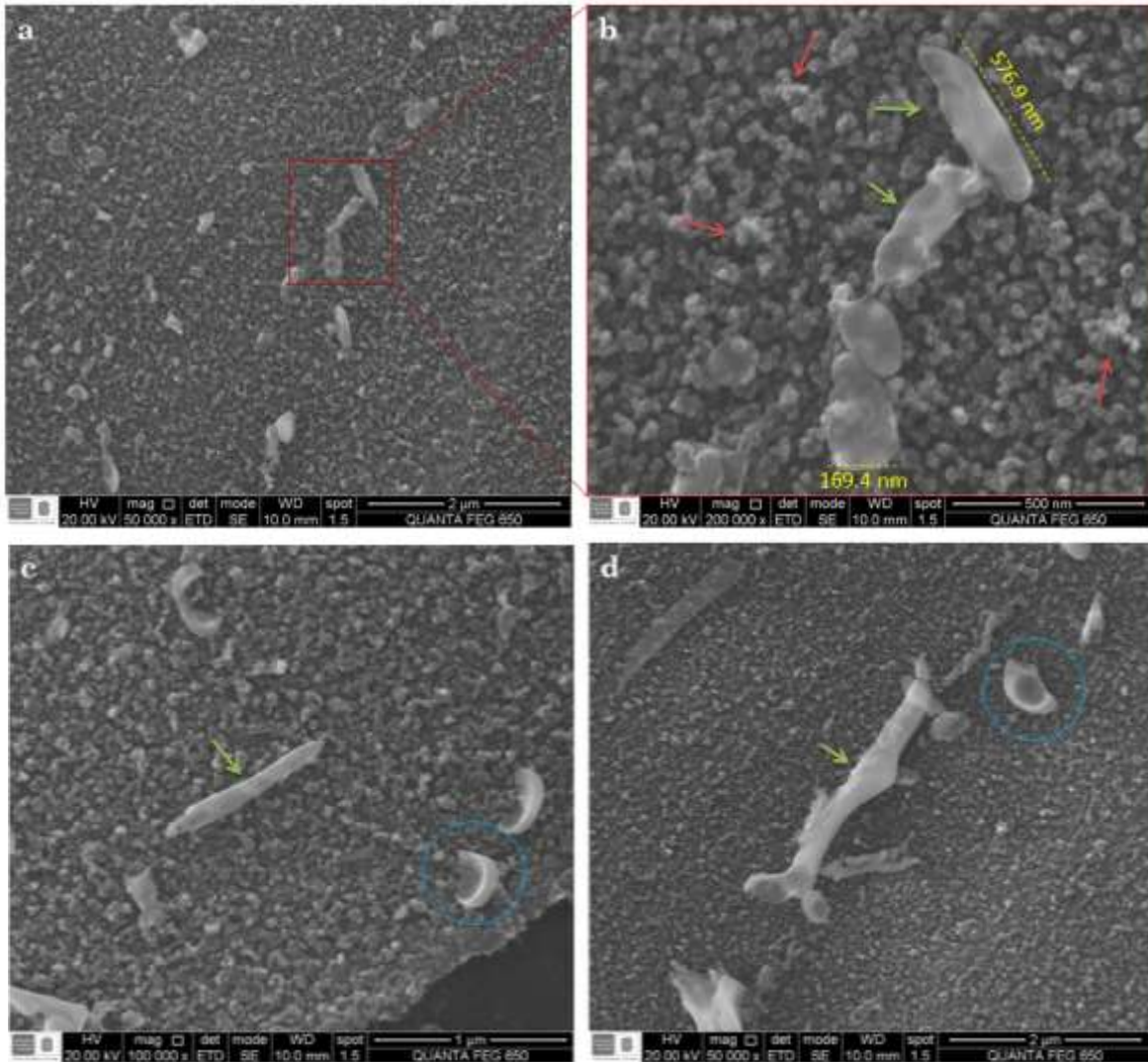


Figura 15. Micrografías de la proteína CsgA*-His6 que evidencian la formación de agregados oligoméricos causados por la autopolimerización de la proteína recombinante.

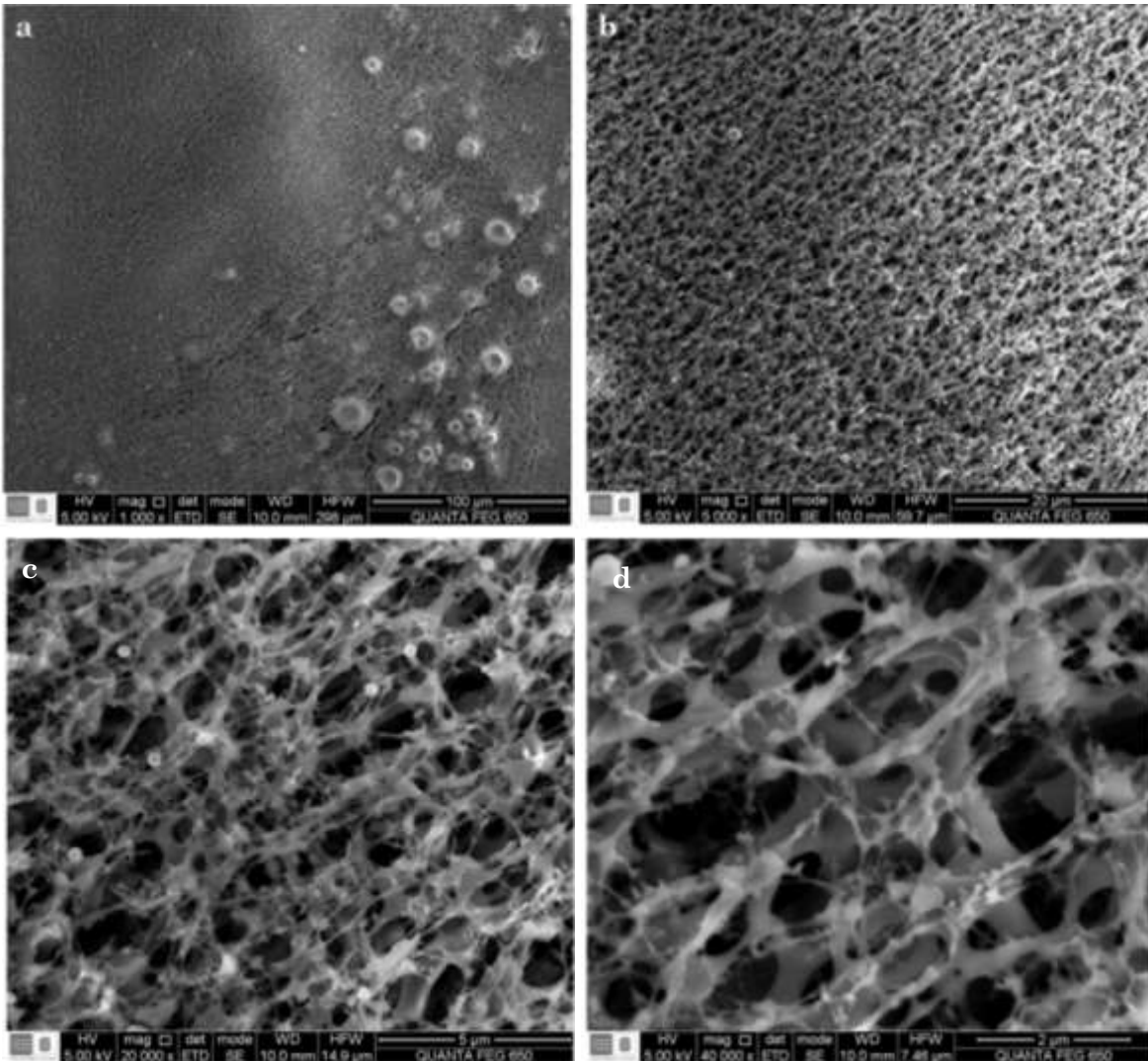


Figura 16. Micrografías de la proteína CsgA-His₆ que evidencian la formación de un entramado fibrilar causado por la polimerización eficiente y ordenada de la proteína recombinante.

Las imágenes SEM tomadas para la proteína CsgA-His₆ (Véase **Figura 16**) revelan un panorama ampliamente diferente al anterior, pues se observa un entramado fibrilar con características muy similares al entramado fibrilar formado *in vivo* por bacterias *E. coli* nativas. Estas imágenes son una clara evidencia de que, *in vitro*, CsgA-His₆ puede catalizar su propia polimerización, como lo indican

Wang *et al.*, (2006), y que además, es un proceso que ocurre rápidamente pues el tiempo de incubación para esta proteína fue de tan solo 1 hora.

La velocidad de polimerización se atribuye al hecho de que las condiciones de purificación y almacenamiento de la muestra, favorecieron la formación de muchas pero pequeñas estructuras oligoméricas que sirvieron como semilla para saltar la fase de nucleación y formar rápidamente el entramado fibrilar. Además, debido a que la proteína es secretada en forma soluble al medio extracelular, no se da la formación de cuerpos de inclusión, sino por el contrario, se favorece el plegamiento ordenado de todos los monómeros de proteína CsgA-His₆.

Aunque en sistemas *in vivo*, la formación de fibras amiloides funcionales o fibras curli implica el funcionamiento coordinado de un conjunto de proteínas codificadas por el gen *csg*, los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la polimerización *in vitro* del principal componente proteico de las fibras curli, CsgA, puede darse no solo en ausencia de la proteína nucleadora CsgB, sino también en ausencia de las demás proteínas involucradas en la amiloidogénesis bacteriana, como es el caso de la proteína CsgA*-His₆.

Adicionalmente, se logró demostrar que la proteína secretora CsgG es suficiente para conducir la proteína CsgA-His₆ hacia el medio extracelular.

No obstante, es necesario mejorar la producción y purificación de la proteína CsgA bajo diferentes sistemas de expresión, de modo que se puedan observar en tiempo real, los procesos de plegamiento y agregación.

Por otra parte, el análisis de estas micrografías junto con los resultados de la relación concentración de proteína-intensidad de fluorescencia (**Figura 14**), permite plantear una hipótesis para explicar la mayor intensidad de fluorescencia de CsgA*-His₆, a pesar de que su polimerización no fue completamente eficiente.

La hipótesis planteada es la siguiente: En solución, la proteína CsgA^{*}-His₆ permanece en forma de cuerpos de inclusión y debido a su alta concentración (según lo observado en las micrografías SEM) se generan altas intensidades de fluorescencia debidas a sus múltiples interacciones con el ThT. Sin embargo, cuando la proteína se inmoviliza sobre una superficie y se elimina el solvente, los cuerpos de inclusión permanecen, y se van agregando, formando estructuras oligoméricas como se aprecia en la **Figura 15**. Caso contrario ocurre para la proteína CsgA-His₆. En solución, esta proteína se encuentra en forma soluble y muy poco polimerizada (dímeros observados en el análisis SDS-PAGE), pero cuando es inmovilizada sobre una superficie, inicia su rápido proceso de polimerización, con la ayuda de aquellos agregados diméricos, pero sin la presencia de cuerpos de inclusión que interfieran en el proceso de fibrilación.

5. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró obtener células transformadas de transformar las células de *E. coli* LSR12-pMC1/pMC3 y NEB C2566-pNH11 mediante electroporación.
- ✓ Se purificaron parcialmente las proteínas CsgA-His₆ y CsgA*-His₆ utilizando cromatografía IMAC.
- ✓ *In vitro*, CsgA-His₆ se autopolimerizó mediante sus propios agregados preformados, aún en ausencia de la proteína nucleadora CsgB.
- ✓ Bajo las condiciones de estudio, no fue posible observar en tiempo real el proceso de fibrilación de la proteína CsgA-His₆, debido a su rápida polimerización.
- ✓ Cuando la proteína CsgA es producida y albergada dentro del interior de la célula (CsgA*-His₆), su plegamiento no fue ordenado sino que se generaron agregados amorfos e insolubles que impidieron la formación de fibras curli.
- ✓ Se verificó que la cepa LSR12-pMC1/pMC3 produjo y secretó la proteína CsgA-His₆, formando entramados fibrilares morfológicamente similares al entramado que forma las biopelículas bacterianas *in vivo*. El proceso fue tan ordenado y eficiente que se requirió poco tiempo para poder ser observado.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda hacer un estudio experimental, es decir, no a partir de bibliografía como se hizo en el presente trabajo, de los factores temperatura de crecimiento, temperatura de inducción y concentración de inductor; que presenten diferencias significativas en la expresión de las proteínas recombinantes al ser estudiados en forma independiente.
- ✓ Para mejorar la polimerización de proteína CsgA*-His₆, se recomienda realizar su inducción a menor temperatura (P. ej., 18 °C), de modo que los procesos de transcripción y traducción de proteínas sean más lentos y se evite la formación de cuerpos de inclusión.
- ✓ Estandarizar la cuantificación proteínas por métodos alternativos al método de Bradford, para evitar falsos negativos en la cuantificación.
- ✓ Realizar análisis por Dicroísmo Circular para corroborar la estructura de hojas β de las fibras formadas por la proteína CsgA-His₆.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, H. Electrophoretic Analyses of Protein. *In: Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*. CRC Press, 71–131 (2005).
- Ausubel, F. M. *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. CRC Press, 101–110 (2003).
- Balbás, P. & Lorence, A. *Recombinant Gene Expression*. Human Press, **267**, 3–69 (2004).
- Barnhart, M. M. & Chapman, M. R. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 131–47 (2006).
- Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1405–12 (2010).
- Blackley, H. K. *et al.* In-situ atomic force microscopy study of beta-amyloid fibrillization. *J. Mol. Biol.* **298**, 833–40 (2000).
- Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P. & Chapman, M. R. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol.* **20**, 66–73 (2012).
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54 (1976).
- Chapman, M. R. *et al.* Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**, 851–5 (2002).
- Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–66 (2006).
- Choi, J. H. & Lee, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 625–35 (2004).

- Choi, J. H., Keum, K. C. & Lee, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 876–885 (2006).
- Collection, S. E. Bacterial Transformation : Electroporation. *J. Vis. Exp.* 1–2 (2013).
- Dueholm, M. S. *et al.* Fibrillation of the Major Curli Subunit CsgA under a Wide Range of Conditions Implies a Robust Design of Aggregation. *Biochemistry* **50**, 8281–8290 (2011).
- Epstein, E. A. & Chapman, M. R. Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell. Microbiol.* **10**, 1413–20 (2008).
- Francis, D. M. & Page, R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 5**, Unit 5.24.1–29 (2010).
- Hage, D. S. in *Handb. Affin. Chromatogr.* **54**, 183–201 (2006).
- Hammer, N. D., Schmidt, J. C. & Chapman, M. R. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12494–9 (2007).
- Hatti-kaul, R. & Mattiasson, B. Isolation and Purification of Proteins. In: *Isolation and Purification of Proteins*. Marcel Dek, 115–149 (2003).
- Hochfeld, W. *Producing Biomolecular Substances with Fermenters , Bioreactors , and Biomolecular Synthesizers Producing Biomolecular Substances with Fermenters , Bioreactors , and Biomolecular Synthesizers*. Taylor & Francis Group, 39-61 (2006).
- Lara, Á. Recombinant Protein Production in Escherichia coli. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **10**, 209–223 (2011).
- Loferer, H., Hammar, M. & Normark, S. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol. Microbiol.* **26**, 11–23 (1997).
- Mo Bio Laboratories. Inc. *UltraClean 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit. Instruction Manual.* 1–20 (2010).

- Naiki, H., Higuchi, K., Masanori, H. & Toshio, T. Fluorometric Determination of Amyloid Fibrils in Vitro Using the Fluorescent Dye , Thioflavine T. *Anal. Biochem.* **246249**, 244–249 (1989).
- Nilsson, M. R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* **34**, 151–60 (2004).
- Otzen, D. & Nielsen, P. H. We find them here, we find them there: Functional bacterial amyloid. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 910–927 (2008).
- Peti, W. & Page, R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr. Purif.* **51**, 1–10 (2007).
- Quiroga, A. L. Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes. *Univ. Chile* (2010).
- Reshamwala, S. M. S. & Noronha, S. B. Co-production of two recombinant proteins in *Escherichia coli* using the promoter region of the divergently expressed curli genes. *J. Biotechnol.* **164**, 121–2 (2013).
- ScientificThermo. Thermo Scientific Pierce Electrophoresis Technical Handbook Version 2.
- Shewmaker, F. *et al.* The functional curli amyloid is not based on in-register parallel beta-sheet structure. *J. Biol. Chem.* **284**, 25065–76 (2009).
- Studier, F. W. & Moffatt, B. a. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30 (1986).
- Wang, X. & Chapman, M. R. Curli provide the template for understanding controlled amyloid propagation. *Prion* **2**, 57–60 (2008).
- Wang, X. & Chapman, M. R. Sequence determinants of bacterial amyloid formation. *J. Mol. Biol.* **380**, 570–80 (2008).
- Wang, X., Smith, D. R., Jones, J. W. & Chapman, M. R. In vitro polymerization of a functional *Escherichia coli* amyloid protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 3713–9 (2007).

- Wang, X., Zhou, Y., Ren, J.-J., Hammer, N. D. & Chapman, M. R. Gatekeeper residues in the major curlin subunit modulate bacterial amyloid fiber biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 163–8 (2010).
- Weiss-Muszkat, M. *et al.* Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1545–54 (2010).
- Wessel, D. & Flügge, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141–3 (1984).
- Wu, William, Welsh, Michael J., Kaufman, Peter B., and Zhang, H. H. in *Gene Biotechnol.* (2004).
- Zhou, Y., Blanco, L. P., Smith, D. R. & Chapman, M. R. in (Sigurdsson, E. M., Calero, M. & Gasset, M.) **849**, 303–320 (Humana Press, 2012).

ANEXOS

ANEXO A

Cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford.

Se preparó un patrón concentrado de BSA de 1 mg/mL a partir del cual se realizaron diluciones para obtener las diferentes concentraciones, desde 0.01 mg/mL hasta 1 mg/mL, con las que se elaboró la curva de calibración.

De cada patrón se tomaron 20 μ L que fueron diluidos en 1 mL de reactivo de Bradford. Posteriormente, se midieron las absorbancias a 595 nm y se obtuvo la ecuación para la curva de calibración presentada en la figura 1.

$$C = \frac{0.0032 - A}{0.8139}$$

A = Absorbancia de la muestra; C = Concentración de proteína [mg/mL].

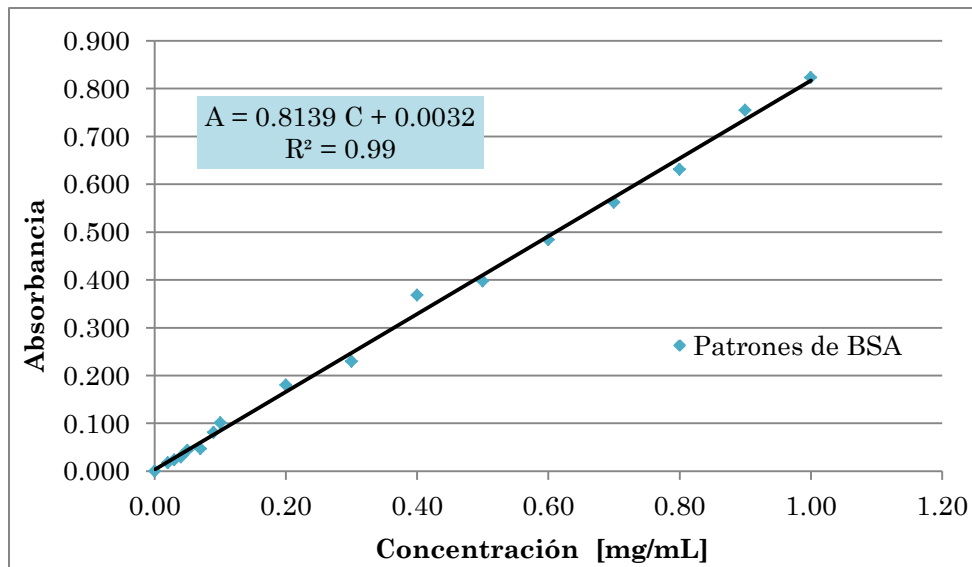


Figura 1. Curva de calibración de patrones de BSA, usando el método de Bradford.

ANEXO B

Soluciones utilizadas para el análisis de SDS-PAGE de las proteínas.

Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada.

1. SDS-PAGE.

- ✓ Preparación del gel de *stacking*.

Componente	Cantidad [μ L]
Agua desionizada	930
Acrilamida/bis acrilamida 30 %	230
Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8	375
SDS 10%	15
Persulfato de amonio 10 %	30
TEMED	7.5

- ✓ Preparación del gel de separación al 15 %.

Componente	Cantidad
Agua desionizada	1.4 mL
Acrilamida/bis acrilamida 30 %	2.4 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	1.3 mL
SDS 10 %	50 μ L
Persulfato de amonio 10 %	25 μ L
TEMED	10 μ L

- ✓ Solución *Buffer* de carga desnaturizante.

Componente	Concentración final [%]
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	25
Glicerol	20
SDS 10 %	40
2-mercaptoetanol	10
Azul de Bromofenol	Para dar coloración

- ✓ Solución *Buffer* de corrida.

Componente	Concentración [% p/v]
Glicina	1.44
Tris base	0.20
SDS	0.10

- ✓ Solución de tinción Coomassie R-250.

Componente	Concentración
Azul de Coomassie R-250	0.25 % p/v
Metanol	50 % v/v
Ácido acético	10 % v/v

- ✓ Solución decolorante fuerte.

Componente	Concentración [% v/v]
Metanol	50
Ácido acético	10

- ✓ Solución decolorante débil.

Componente	Concentración [% v/v]
Metanol	5
Ácido acético	10