

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Área de Química Física
Departamento de Química Física

Dra. Ana Cámara Artigas

DETERMINACIÓN DE LOS INTERVALOS DE SOLUBILIDAD PARA LA CRISTALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS: TSG101-UEV, UBIQUITINA Y VP40

Grado en Química

Memoria de Trabajo Fin de Grado

VÍCTOR MANUEL CUTILLAS JUÁREZ

10 Julio 2014

Determinación de los intervalos de solubilidad para la cristalización de proteínas: TSG101-UEV, Ubiquitina y VP40.

Memoria del Trabajo Fin de Grado presentada por Víctor Manuel Cutillas Juárez

Almería, 10 de Julio de 2014

Fdo: Víctor Manuel Cutillas Juárez

Directora del Trabajo Fin de Grado

Dra. Ana Cámara Artigas

Profesora titular de Química Física en la Universidad de Almería

En primer lugar he de agradecer a la Dra. Ana Cámara Artigas. Ella ha sido quien ha hecho esto posible, aportando los medios necesarios para tener una verdadera experiencia de investigación, guiándome con mucha dedicación y un trato excelente desde el inicio de este proyecto. Un gran ejemplo profesional del cual he tenido la suerte de aprender.

Agradecer a las personas que han estado presentes en el laboratorio aportándome su cariño y su agradable compañerismo que hacía todo más fácil día a día, Emilia Ortiz, Montserrat Andújar y Emilo González.

A Julio Bacarizo Roa por su incansable ayuda de forma totalmente altruista, explicándome y educándome en todo lo que he necesitado, no existe duda que Julio sea incapaz de resolver. Pero sobre todo, gracias por esos buenos momentos que han amenizado todas estas semanas y las han hecho muy llevaderas.

A todos mis compañeros de carrera, en especial a cinco personas que sin ellas este gran paso en mi vida no hubiera sido lo mismo, José, Pepa , Luis, Samira y Ana. Las vivencias que he compartido con ellos desde que empecé son inigualables, ellos son el pilar de apoyo de esta experiencia y han ocupado un lugar importante que no olvidaré.

A mi pareja Marta Calatrava Belmonte, por ser la inspiración de mi vida personal y académica, aportándome su filosofía de que lo único imposible es aquello que no intentas.

Por último, agradecer a mi familia, porque sin mis padres y hermanos no hubiera alcanzado esta meta. Gracias por saber sustituir mis agobios por sonrisas y por enseñarme a que cualquier adversidad se puede superar manteniendo la felicidad.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	5
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
2.1 Proteína TSG101	10
2.2 Dominio UEV de la proteína TSG101	12
2.3 Proteína VP40	14
2.4 Proteína Ubiquitina	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Materiales	19
3.2 Métodos	
3.2.1 Diagrama conceptual del protocolo de purificación de proteínas	21
3.2.2 Clonado, expresión y purificación de las proteínas	22
3.3 Determinación de la concentración y pureza de las proteínas	
3.3.1 Determinación del coeficiente de extinción molar	26
3.3.2 Electroforesis SDS-PAGE	27
3.4. Determinación de la solubilidad y estado de agregación de proteínas	
3.4.1 Fundamentos del DLS	29
3.4.2 Preparación de las muestras para las mediciones de DLS.	32

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Purificación de las proteínas	
4.1.1 TSG101-UEV	35
4.1.2 VP40	36
4.1.3 Ubiquitina	37
4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS	39
4.3 Determinación de los intervalos de solubilidad de las proteínas	41
4.3.1 TSG101-UEV	42
4.3.2 Ubiquitina	44
4.3.3 VP40	45
5. CONCLUSIONES	49

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fin de grado consiste en entender y aplicar las competencias que residen en un laboratorio de investigación del área de Química Física.

Mediante búsqueda bibliográfica se determinará cual es el estado de conocimiento actual sobre el funcionamiento y estructura de varias proteínas que intervienen en el proceso de propagación del virus del Ébola.

Se purificarán las proteínas objeto de estudio, optimizando el rendimiento de la purificación y la pureza.

Se caracterizará la proteína mediante técnicas electroforéticas y espectroscópicas.

Se estudiará el estado de agregación de las proteínas mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), analizando las condiciones óptimas de solubilidad y monodispersidad de la proteína con el pH.

***ANTECEDENTES
BIBLIOGRÁFICOS***

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El principal objetivo de la cristalografía de proteínas es la determinación de la estructura de las macromoléculas a partir del patrón de difracción de monocristales. Al obtener estas estructuras es posible explicar las propiedades y funcionalidad de las proteínas, lo que permite, en el caso de que estas estén implicadas en rutas metabólicas relacionadas con el desarrollo de enfermedades, el desarrollo de nuevos fármacos¹.

Para el presente trabajo fin de grado se han elegido un conjunto de proteínas que son objeto de estudio en el proyecto de investigación “Estudios cristalográficos de los determinantes estructurales de la unión de secuencias ricas en prolina” (BIO2012-39922-C02-02, MECOM, España). En concreto, se ha escogido el dominio de unión de ubiquitina de la proteína TSG101, que a su vez, también une ciertas proteínas virales. Es muy importante estudiar estos procesos de unión ya que a través ellos se facilita la propagación en las células de las infecciones virales².

Antes de cristalizar una proteína es necesario purificarla con un alto nivel de pureza y en condiciones que sea monodispersa (una sola población en disolución)³. Existen diversas técnicas que nos permiten caracterizar la solubilidad de proteínas, pero sin duda una de las más convenientes es la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS a partir de las siglas inglesas)⁴. Esta técnica permite la medida del tamaño de partículas y por tanto, la determinación del estado de agregación en disolución de las proteínas que pretendemos estudiar. Esta información es de gran utilidad no solo para la cristalización de las proteínas que queremos estudiar, si no que refleja también cambios de estado de agregación cuando estas interaccionan entre sí⁵.

A continuación se van a describir las principales características de las proteínas objeto de estudio en esta memoria.

¹ Stahelin, R. V. *Expert opinion on therapeutic targets* **2014**, *18*, 115.

² Votteler, J.; Sundquist, W. I. *Cell host & microbe* **2013**, *14*, 232.

³ McPherson, A.; Gavira, J. A. *Acta Crystallographica Section F* **2014**, *70*, 2.

⁴ Proteau, A.; Shi, R.; Cygler, M. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan* **2010**, *Chapter 17*, Unit 17.10.

⁵ Bacarizo, J.; Camara-Artigas, A. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2013**, *69*, 756.

2.1 TSG101

La proteína TSG101, también denominada Tumour Susceptibility Gene 101, fue identificada por primera vez como la proteína codificada en un gen de ratones que se relacionó con la supresión de ciertos tumores⁶. Cuando la síntesis de esta proteína se desactivaba en los fibroblastos daba lugar a una transformación celular que desembocaba en la formación de tumores metastásicos en ratones atímicos (Figura 2.1)

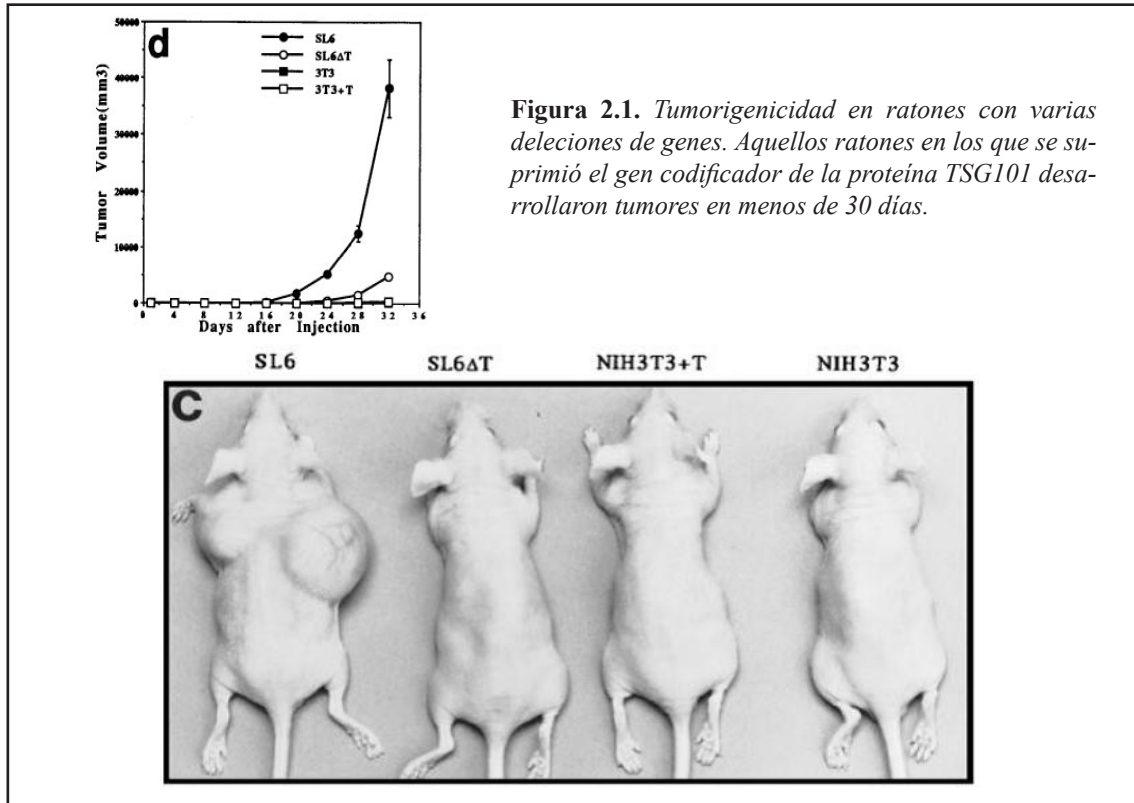


Figura 2.1. Tumorigenicidad en ratones con varias deleciones de genes. Aquellos ratones en los que se suprimió el gen codificador de la proteína TSG101 desarrollaron tumores en menos de 30 días.

El gen que codifica la proteína TSG101 también está presente en humanos en el cromosoma 11p15. El estudio de esta proteína adquirió bastante relevancia cuando se confirmó que dicha proteína se encontraba mutada con bastante frecuencia en pacientes con cáncer de mama⁷. Se hicieron diversos estudios de tejido normal de mama y no se hallaron defectos en la TSG101, por lo tanto, los defectos en estos genes parecen tener un papel en el desarrollo tumoral. La relación que existe entre los tumores y esta proteína, hizo que se denomine como Tumour Susceptibility Gene (TSG101).

Más adelante se descubrió que la TSG101 es miembro de la familia “Vacuolar protein-sorting” (Vps) y como tal, forma parte de los complejos ESCRT (“Endosomal Sorting Complexes Required for Transport”)⁸; este tipo de complejos permiten una remodelación de la membrana celular junto a otras proteínas accesorias. En concreto la TSG101 es una de las proteínas accesorias en el complejo ESCRT-I, donde juega un papel fundamental en la inclusión de proteínas en vesículas vacuolares y en algunos compartimentos del endosoma⁹.

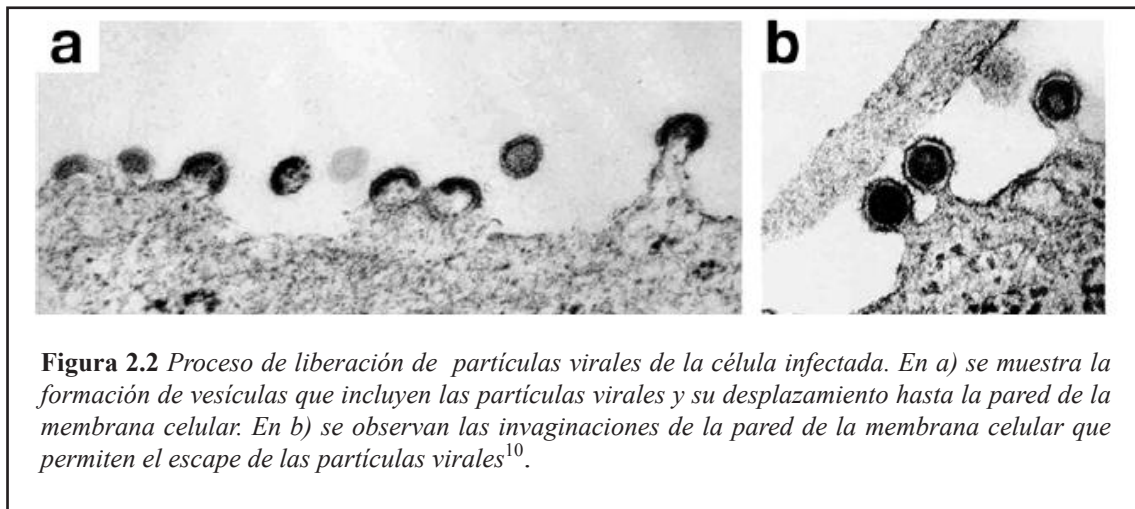
⁶ Li, L.; Cohen, S. N. *Cell* **1996**, *85*, 319.

⁷ Li, L.; Li, X.; Francke, U.; Cohen, S. N., *Cell* **1997**, *88*, 143-54.

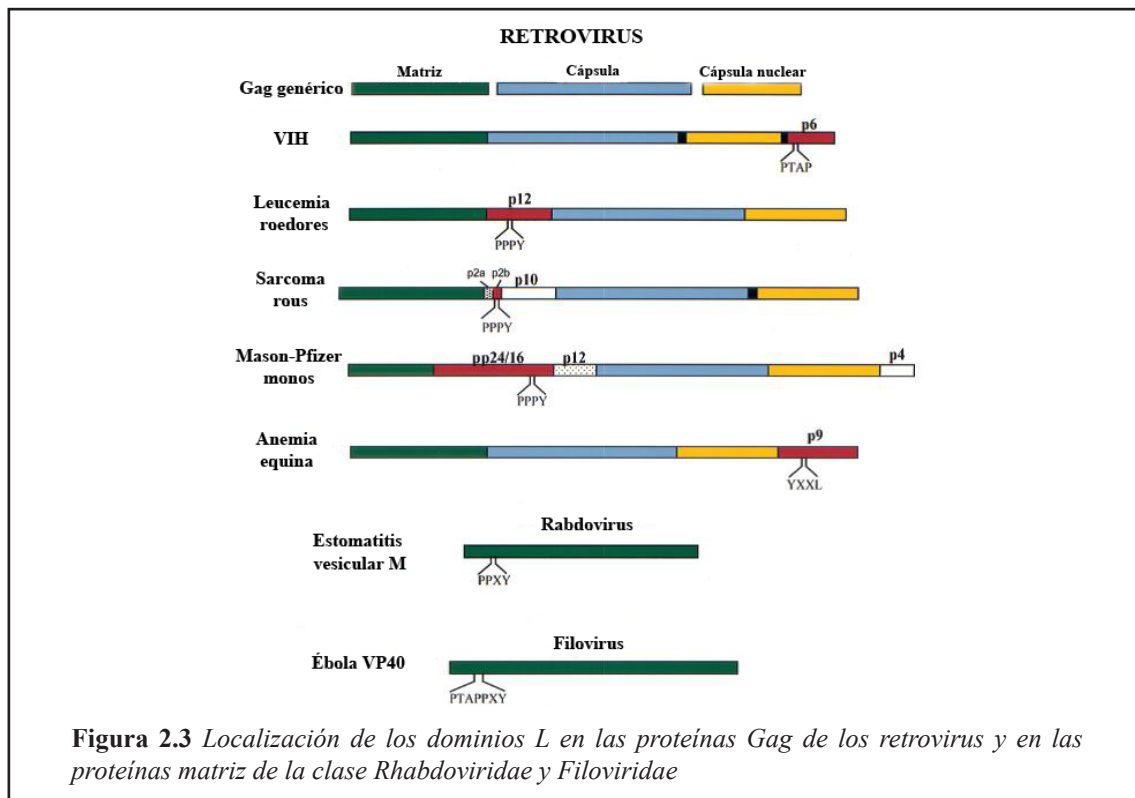
⁸ Li, Y.; Kane, T.; Tipper, C.; Spatrick, P.; Jenness, D. D. *Molecular and Cellular Biology* **1999**, *19*, 3588.

⁹ Katzmann, D. J.; Babst, M.; Emr, S. D. *Cell* **2001**, *106*, 145-155.

Algunos virus como el VIH o el Ébola infectan a las células y una vez en ellas emplean la maquinaria de los complejos ESCRT para su gemación. Con este proceso el virus replicado en la célula puede abandonarla y acceder a otras células para progresar en el proceso infeccioso (Figura 2.2)



La TSG101 desempeña un papel importante en dicho proceso participando en la gemación de estos retrovirus a través de la unión de ciertas secuencias ricas en el aminoácido prolina presentes en las proteínas Gag de los retrovirus (por ejemplo el virus de inmunodeficiencia humana, VIH), o en las proteínas matriz de los Rabdovirus y Filovirus (Figura 2.3). Estas secuencias son denominadas dominios L (del inglés late domains), y el nombre refleja su papel final en la gemación de las partículas de los virus.



¹⁰ Demirov, D. G.; Freed, E. O. *Virus research* 2004, 106, 87-102.

2.2 TSG101-UEV

La TSG101 es una proteína de 381 aminoácidos con una masa molecular de 43108 Da. En la secuencia podemos distinguir un dominio UEV (ubiquitina E2 variant) en el extremo amino terminal.

Esta proteína se puede definir como multidominio (Figura 2.4). Los dominios son aquellas unidades compactas de la proteína que poseen una estructura tridimensional característica y surgen al plegarse la cadena polipeptídica. Estos dominios suelen desempeñar funciones específicas, por lo que son fundamentales en el papel que desempeña cada proteína (unidades modulares) o en su estructura (componente estable). En ocasiones desempeñan papeles en el reconocimiento y unión de otras proteínas que intervienen en la función ejercida por la proteína que contiene el dominio.

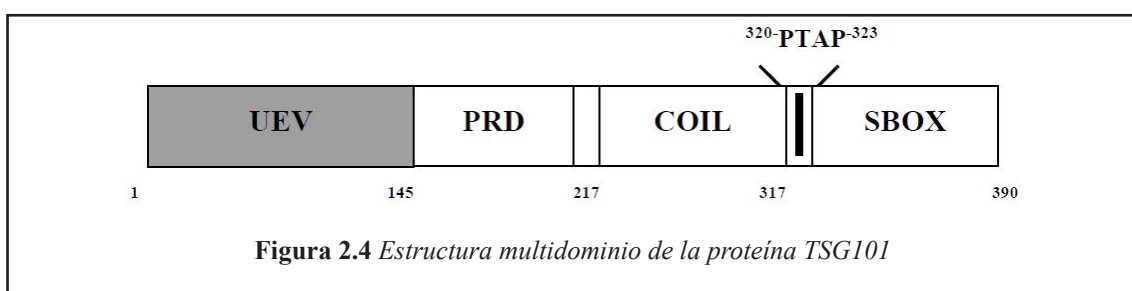


Figura 2.4 Estructura multidominio de la proteína TSG101

Analizando la TSG101 desde un punto estructural, además de poseer el dominio UEV en el amino-terminal, consta de un dominio Coiled-coil (en el cual se entrelazan las hélices α) y un dominio carboxilo-terminal denominado SBOX. Estos dos últimos intervienen en las interacciones del complejo ESCRT-I además de ayudar a mantener la integridad de la propia proteína⁹.

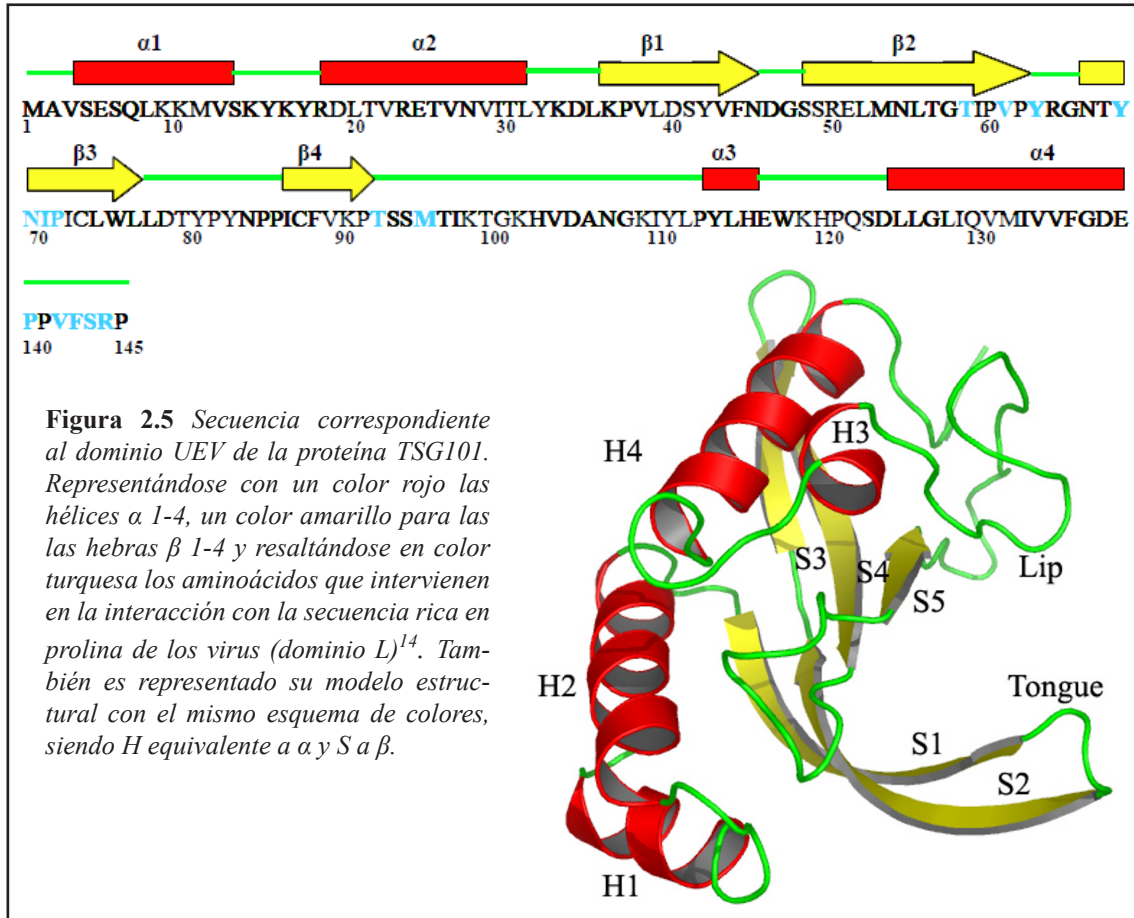
La propia TSG101 presenta una secuencia rica en prolina (PTAP) entre el dominio Coiled-coil y el SBOX, por lo que se intuye que la proteína está preparada para unirse a sí misma a través de esta secuencia, organizándose de tal forma que se autoinhibe de una manera similar a como lo hace, por ejemplo, la Src-tirosina quinasa¹².

El papel del dominio UEV en la TSG101 es la interacción de forma directa con la ubiquitina. Esta unión se produce sin la formación de enlaces covalentes porque carece de actividad ligasa características de otros dominios de unión de ubiquitina. Esto es debido a la ausencia de la cisteína del centro activo que participa en el enlace covalente, que está sustituida por un residuo de tirosina en la secuencia de TSG101¹². El dominio UEV es mucho menos abundante que otros dominios, lo que puede indicar su función más especializada.

¹¹ Williams, J. C.; Wierenga, R. K.; Saraste, M. *Trends in biochemical sciences* **1998**, *23*, 179.

¹² Garrus, J. E.; von Schwedler, U. K.; Pornillos, O. W.; Morham, S. G.; Zavitz, K. H.; Wang, H. E.; Wetts-
tein, D. A.; Stray, K. M.; Cote, M.; Rich, R. L.; Myszka, D. G.; Sundquist, W. I. *Cell* **2001**, *107*, 55-65.

La estructura tridimensional del dominio TSG101-UEV está constituida por cuatro hélices alfa y una lámina beta antiparalela formada por cuatro hebras¹³ (Figura 2.5). El sitio de unión para la ubiquitina se encuentra formado por la lengua beta (un lazo que conecta $\beta 1$ y $\beta 2$), la hélice $\alpha 3$ y la hebra $\beta 4$. Las dos hélices del extremo carboxilo terminal, $\alpha 3$ y $\alpha 4$, constituyen una hendidura donde se une los motivos ricos en prolina de los dominios-L virales con la secuencia canónica PTAP, donde P representa el aminoácido prolina, T treonina y A alanina. Este tipo de unión es muy importante para la liberación de las partículas virales, pues se ha demostrado que pequeñas mutaciones en el dominio inhiben por completo este proceso de liberación.



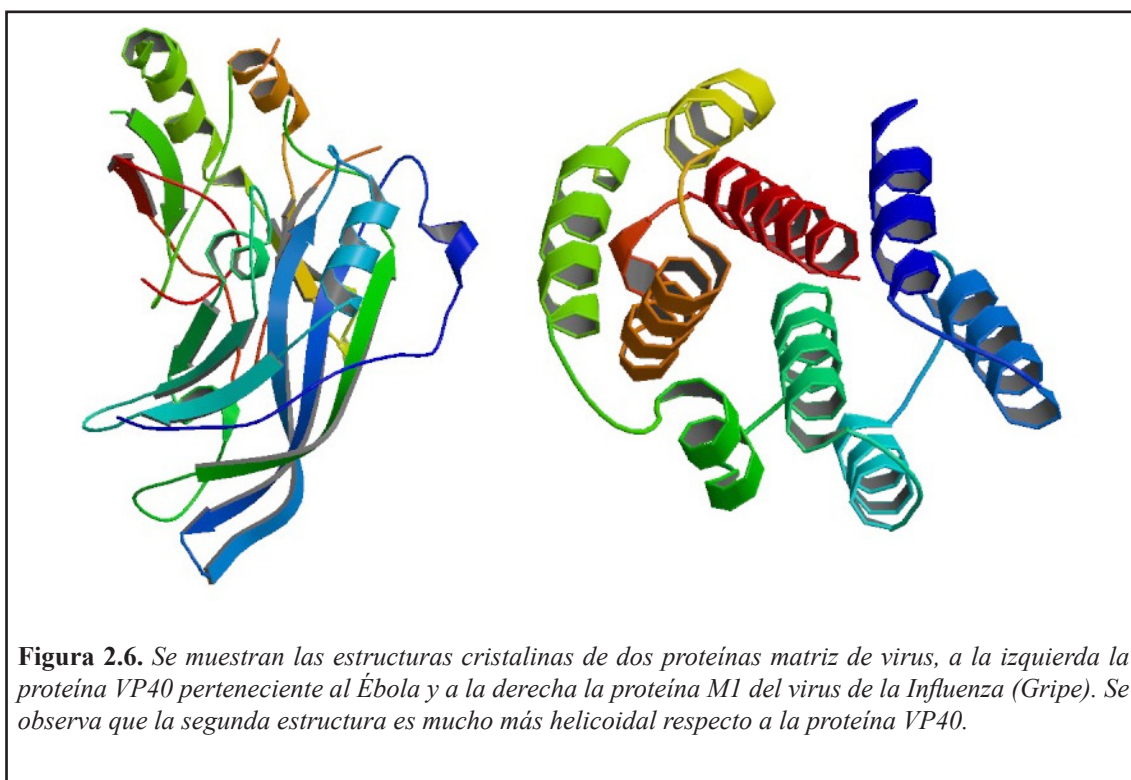
¹³ Palencia, A.; Martinez, J. C.; Mateo, P. L.; Luque, I.; Camara-Artigas, A. *Acta Crystallographica Section D* **2006**, 62, 458.

¹⁴ Pornillos, O.; Alam, S. L.; Rich, R. L.; Myszka, D. G.; Davis, D. R.; Sundquist, W. I. *The EMBO Journal* **2002**, 21, 2397-2406.

2.3 Vp40:

En 1976 se desató una epidemia en las riveras del río Ébola, en la República Democrática del Congo, que transcurría con fuertes hemorragias y fiebres, dando lugar a una muy alta tasa de mortalidad. Dicha enfermedad se determinó que estaba causada por un virus de la familia Filoviridae y se le dio el nombre de virus del Ébola¹⁵. Este virus está constituido por su genoma (un ARN lineal de cadena única y sentido negativo) y por siete proteínas, entre las cuales, se encuentra la proteína matriz VP40. Esta desempeña un papel crítico en el ensamblaje del virus, uniendo la envoltura viral con el núcleo del virus. Estas proteínas matriz “secuestran” proteínas celulares (entre las que se encuentra la TSG101-UEV) para realizar la tarea de ensamblaje del virus.

La proteína VP40 se caracteriza por presentar varios estados de agregación y estar compuesta por dos dominios, un dominio N-terminal y otro C-terminal¹⁶. Sin embargo, pese a realizar una función similar, la proteína matriz del Ébola VP40 no muestra ninguna similitud de secuencia con cualquiera de las estructuras de proteínas de matriz virales conocidas (Figura 2.6). Esto sugirió que este nuevo tipo de proteína matriz podría ser empleada por el Ébola, y en general los filovirus, para otras funciones^{17,18}.



¹⁵ Feldmann, H.; Klenk, H. D. *Advances in virus research* **1996**, *47*, 1-52.

¹⁶ Bornholdt, Z. A.; Noda, T.; Abelson, D. M.; Halfmann, P.; Wood, M. R.; Kawaoka, Y.; Saphire, E. O. *Cell* **2013**, *154*, 763.

¹⁷ Hoenen, T.; Biedenkopf, N.; Zielecki, F.; Jung, S.; Groseth, A.; Feldmann, H.; Becker, S. *Journal of virology* **2010**, *84*, 7053.

¹⁸ Hill, C. P.; Worthylake, D.; Bancroft, D. P.; Christensen, A. M.; Sundquist, W. I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 3099-3104.

2.4 Ubiquitina:

La ubiquitina (Ub) es una pequeña proteína globular de tan solo 76 aminoácidos que está presente en la gran mayoría de organismos eucariotas con una secuencia de aminoácidos altamente conservada. Precisamente de su ubicuidad procede su nombre y ello hace que sea una proteína altamente estudiada¹⁹.

Esta proteína realiza una modificación covalente en proteínas diana, por medio de monoubiquitinación o poliubiquitinación, que puede dar a lugar a muchísimas funciones biológicas en la célula, entre las cuales destacan: el control de la progresión del ciclo celular²⁰; la transducción de señales²¹; el tráfico de proteínas²²; la degradación transcripcional²³; la endocitosis²⁴; etc. Debido al gran número de procesos en los que interviene, no sorprende que la ubiquitina sea capaz de ser reconocida por una gran variedad de proteínas y dominios²⁵.

Pero la función que más destaca de las mencionadas anteriormente es la de reciclaje. La ubiquitina es capaz de asociarse a otras proteínas y marcarlas para su posterior eliminación. Es precisamente esta función la que es “secuestrada” por virus como VIH y Ébola para facilitar su proceso de gemación y abandonar la célula para infectar otras células sanas²⁶. En el virus del Ébola, es la proteína matriz VP40 la que se adhiere a la proteína TSG101-UEV, usufructuando las funciones de la ubiquitina a través de esta (Figura 2.7).

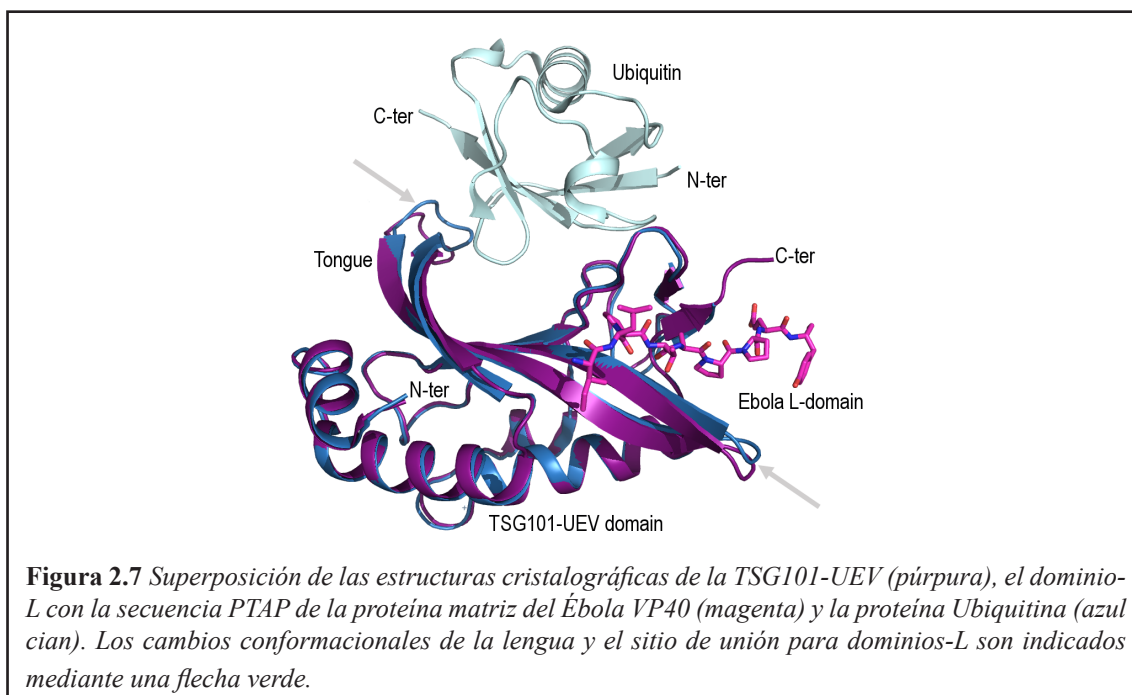


Figura 2.7 Superposición de las estructuras cristalográficas de la TSG101-UEV (púrpura), el dominio-L con la secuencia PTAP de la proteína matriz del Ébola VP40 (magenta) y la proteína Ubiquitina (azul cian). Los cambios conformacionales de la lengua y el sitio de unión para dominios-L son indicados mediante una flecha verde.

¹⁹ Shields, S. B.; Piper, R. C. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **2011**, 12, 1306.

²⁰ King, R. W.; Deshaies, R.J.; Peters, J.M.; Kirschner, M.W. *Science* **1996**, 274, 1652–1659.

²¹ Di Fiore, P. P.; Polo, S.; Hofmann, K. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2003**, 4, 491.

²² Kostova, Z.; Wolf, D.H. *The EMBO Journal* **2003**, 22, 2309–2317.

²³ Hershko, A.; Ciechanover, A. *Biochem* **1998**, 67, 425–479.

²⁴ Hicke, L.; Dunn, R. *Annual review of cell and developmental biology* **2003**, 19, 141.

²⁵ Buchberger, A. *Trends in cell biology* **2002**, 12, 216.

²⁶ Pornillos, O.; Garrus, J. E.; Sundquist, W. I. *Trends in cell biology* **2002**, 12, 569.

***MATERIALES
Y MÉTODOS***

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 INSTRUMENTACIÓN:

Para la preparación de disoluciones se empleó un agitador orbital Agimatic-S (J.P. Selecta).

Durante el proceso de transformación de las células se empleó un baño termostatzado Julabo 12B TECTRON S473-100.

Se usó un pack de micropipetas RAININ de volúmenes 20 μ L, 100 μ L y 1000 μ L.

Se utilizó una cabina de flujo laminar vertical FLOW-LAN Serie V IDL-48V.

La incubación de las placas se realizó en la estufa bacteriológica INCUDIGIT serie 2000 (J.P Selecta). La incubación de los matraces se empleó un armario incubador ME-DILOW-LG (J.P. Selecta).

En el proceso de purificación de las proteínas se emplearon la centrífuga Hettich centrifuge-Zentrifugen Rotanda 460 R, con un rotor 5645 y la ultracentrifugación se realizó con una Beckman XL-90 Ultracentrifuge, rotor TYPE 45TI.

El proceso de lisis celular se realizó con un sonicador Grepüttfe Sicherheit dr.hielscher (GmbH)-UP 200S Ultraschallprozessor.

La proteínas se concentraron mediante filtración tangencial empleando filtros Ultra-Milipore (Amicon) de 3kDa ó 10kDa de masa molecular de corte, dependiendo del tamaño de la proteína.

Para las medidas de absorbancia se empleó el espectrofotómetro de ultravioleta visible Lambda 25 (Perkin Elmer), utilizando cubetas de cuarzo con 1cm de paso de luz.

Las electroforesis se llevaron a cabo utilizando el equipo Mini-PROTEIN Tetra Cell (Bio-Rad)

Para las medidas de dispersión dinámica de la luz se empleó un DLS Zetasizer Nano Range ZS (Malvern).

Las muestras empleadas en las medidas de DLS se centrifugaron en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Scientifi).

La membrana de diálisis que se utilizó fue una 3Spectra/Por MWCO: 3,500Da (Spectrum).

3.1.2 REACTIVOS:

Los plásmidos con los genes clonados de las proteínas que posteriormente se purificaron fueron proporcionados por la profesora Irene Luque del departamento de Química-Física de la universidad de Granada.

Las células de *E.Coli* empleadas en la transformación (BL21-CODON+ y BL21-DE3) fueron adquiridas en Novagen.

Para el crecimiento de las bacterias se empleó un medio de cultivo LB. Consiste en un medio nutricionalmente rico que está compuesto por 10g/L de Triptona, 5g/L de extracto de levadura y 5g/L de cloruro sódico. La triptona proporciona nitrógeno y carbono, el extracto de levadura las vitaminas y el cloruro sódico los iones que regulan el balance osmótico. Se completa el volumen con agua destilada y se ajusta a $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ con hidróxido sódico 1M. El medio de cultivo debe autoclavarse (121°C) para que esté correctamente esterilizado antes de su uso.(Los antibióticos se añaden después para evitar la descomposición de los mismos al someterlos a altas temperaturas).

Para la preparación de las placas Petri se añade 1g de Agar a 50mL de medio LB. Tras preparar el volumen de medio LB con agar debemos autoclavarlo para su esterilización (al igual que en el medio LB el antibiótico se añadirá posteriormente, una vez enfriado el medio). Cada placa Petri contiene aproximadamente 5mL de esta disolución con agar (hay que verter la disolución en la placa Petri cuando aún se encuentra en caliente para que gelifique en la misma una vez se enfríe)

La cromatografía de afinidad se realizó con una columna Ni-NTA Agarose (Quiagen).

Disoluciones empleadas en la obtención del gel de electroforesis. Todas las disoluciones deben almacenarse en cámara fría, excepto el SDS 10% y el tampón de desarrollo:

Disolución A: Acrilamida al 29.2% (p/v) y Bis-acrilamida al 0.8%.

Disolución B: Tampón del gel separador. Tris 1.5M ajustado a pH 8.8 con HCl

Disolución C: Tampón del gel apilador. Tris 0.5M ajustado a pH 6.8 con HCl.

Disolución D: SDS 10%.

Disolución E: Persulfato amónico al 10% (p/v). Debe prepararse en el preciso momento de su utilización.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina. Actúa como catalizador para permitir que gelifique con rapidez.

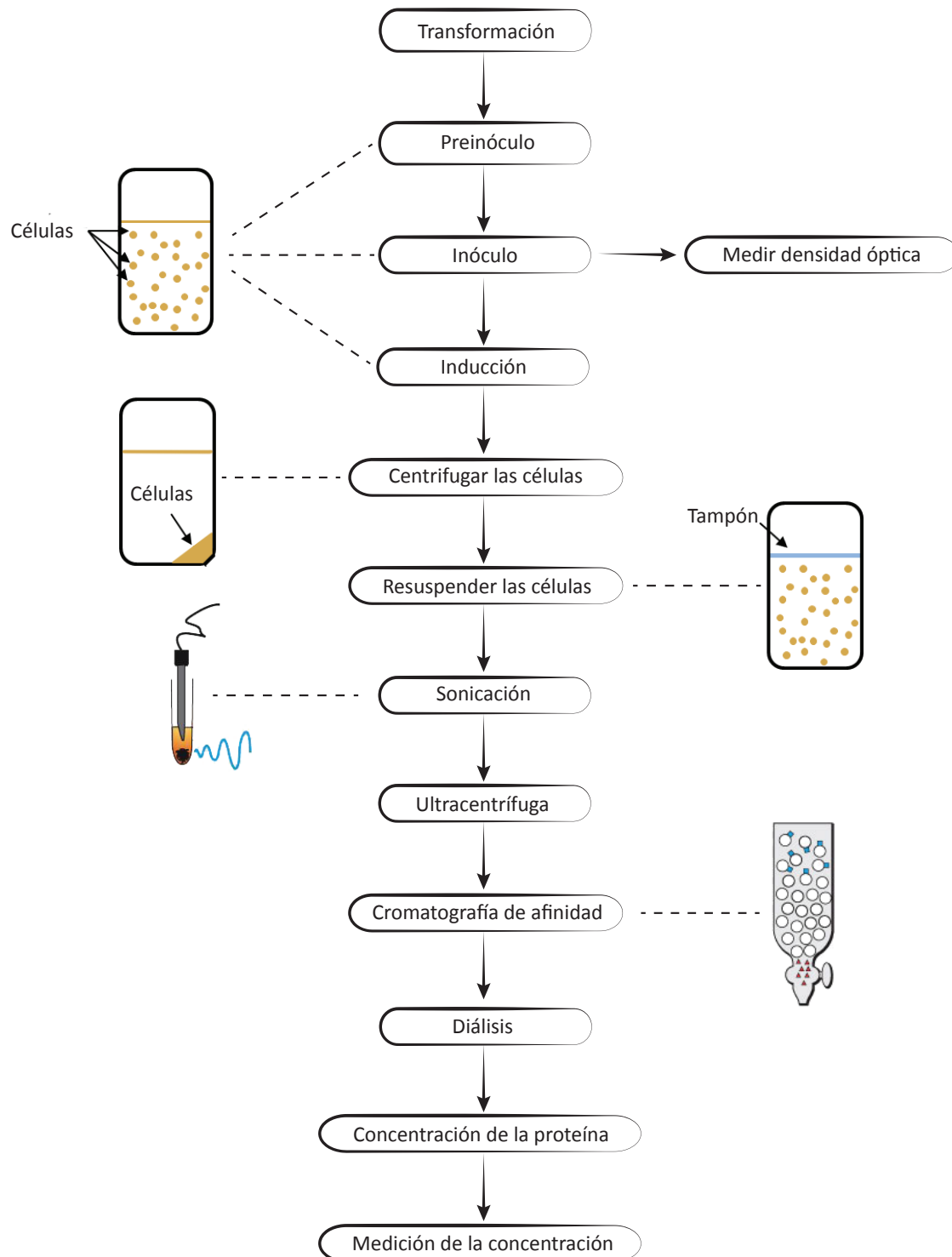
Disolución F: Tampón de disolución de la muestra. Se compone de 1mL de disolución C, 0.8mL de glicerol, 1.6 mL de disolución D, 0.4mL de 2-mercapto etanol, 0.2mL de azul de bromofenol al 0.05% (p/v) que nos permitirá observar el desplazamiento por la matriz porosa. Completamos con agua destilada hasta 8mL.

Disolución G: Tampón de desarrollo. Se compone de Tris 0.125M, Glicina 1M y SDS al 0,5% a pH 8.3. Para cada electroforesis se diluyen 1 volumen de esta disolución en 4 volúmenes de agua destilada.

Disoluciones para el revelado del gel: Consisten en una disolución de fijación compuesta de metanol al 40% y ácido acético al 7%.La disolución de tinción se obtiene a partir de la disolución fijadora, disolviendo en la misma el colorante Comassie Brilliant Blue R-250 al 0.1% . Para el secado de los geles se utilizó una disolución al 10 % de ácido acético y 5 % de glicerol.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 DIAGRAMA CONCEPTUAL DEL PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CO-EXPRESADAS CON UNA ETIQUETA DE AFINIDAD



3.2.2 CLONADO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

A continuación se describe el protocolo general para la clonación, expresión y purificación de las proteínas. Los detalles específicos y resultados de cada una de las proteínas se describen en la sección de resultados y discusión.

(a). Transformación de las células:

- Tomamos del congelador el plásmido que contiene el gen de nuestra proteína y las células *E.Coli* específicas para la expresión de dicho plásmido.
- En una cabina de flujo laminar, que asegura la esterilización del proceso, se introduce 1µL plásmido en 5µL de células *E.Coli* en un tubo Eppendorf.
- Depositamos el tubo Eppendorf donde se ha añadido el plásmido en un bloque térmico (0°C) durante 5 minutos. A continuación lo introducimos en un baño termostatzado a 42°C durante 40 segundos y finalizado este tiempo, volvemos a situar el tubo Eppendorf en el bloque térmico a 0°C durante 2 minutos.
- Añadimos 400µL de medio LB.
- Incubamos el tubo Eppendorf en estufa a 37°C durante 1 hora.
- Realizamos el sembrado sobre una placa Petri que contiene medio LB con el antibiótico al cual es resistente nuestra célula, de esta forma, las colonias que crecen en nuestra placa corresponden solo a las que contienen nuestro plásmido.
- Se incuba la placa Petri en estufa a 37°C durante toda la noche (“overnight”) para el crecimiento de las células.
- A la mañana siguiente las colonias se muestran en la placa. (Figura 3.1)



Figura 3.1 Placa Petri en la cual se realizó el sembrado para la transformación de las células con el plásmido de la proteína matriz VP40. Se observan las colonias ya crecidas de nuestro plásmido tras incubación en la estufa durante toda la noche.

(b). Expresión de la proteína:

(I) Preparación del preinóculo:

- En un matraz con 100mL de medio LB añadimos el antibiótico.
- Se inocula con una colonia recogida de la placa Petri con un asa esterilizada, esta operación debe realizarse próxima a un mechero Bunsen con una llama potente para asegurar la esterilización del proceso.
- Depositamos el matraz en el armario incubador (37°C) equipado con un agitador orbital que permite airear el cultivo durante toda la noche.

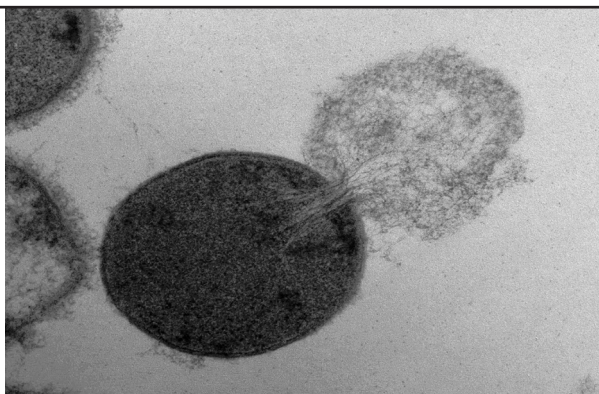
(II) Cultivo:

- Preparamos 6 litros de medio de cultivo LB y se reparten en 8 matraces de 2L de capacidad (solo añadimos 800mL de medio de cultivo por matraz para asegurar la agitación del medio). Añadimos 1mL de antibiótico para asegurar que solo crecerán las bacterias que contienen el plásmido de nuestra proteína. Por último, se adicionan 10mL de preinóculo obtenido en el paso (I).
- Se depositan los matraces en un armario incubador (37°C) agitándose a una velocidad moderada pero suficiente para asegurar la aireación del medio de cultivo.
- Cuando la absorbancia del medio de cultivo a la longitud de onda de 600nm sea 0.8, se procede a la inducción de la proteína.
- Se añade 1mL del agente inductor Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)
- Las células se incuban durante varias horas a la temperatura específica para la expresión de cada proteína.

(c) Recolección de las células y extracción de las proteínas intracelulares:

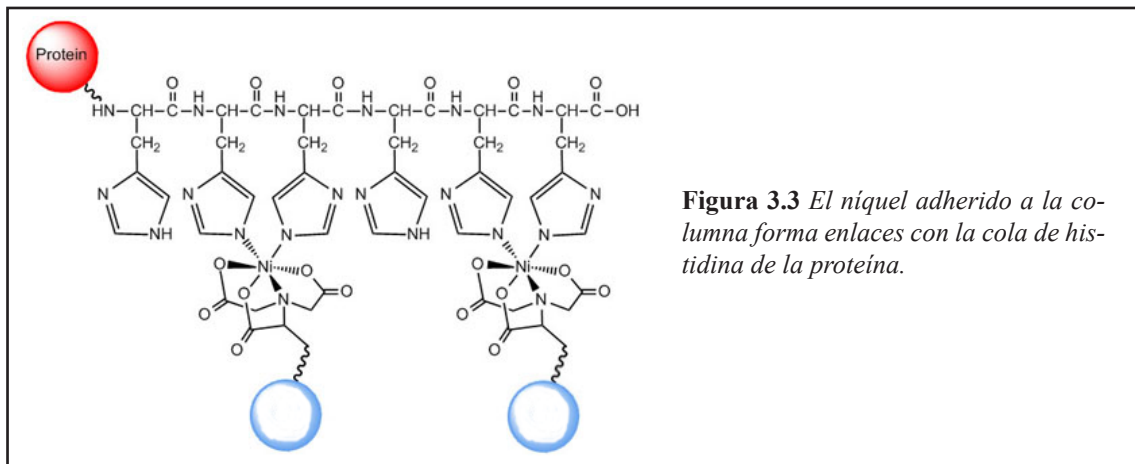
- Las células E.Coli del medio de cultivo se recogieron mediante centrifugación. Para ello se repartió el medio de cultivo en seis botes de centrifuga (un litro cada tres botes) y se pesaron para que cada tubo se enfrentara a otro del mismo peso permitiendo el correcto funcionamiento de la centrifuga. Deben situarse de forma simétrica en caso de que queden espacios libres en la centrifuga.
- Centrifugamos a 4500 r.p.m con una temperatura de 4°C y durante 15 minutos.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células del precipitado en un volumen de tampón acorde con la cantidad de medio de cultivo centrifugado (aproximadamente 6mL por litro centrifugado).
- Las células se rompieron empleando una sonda de sonicar. De esta forma se consigue una ruptura de la membrana celular que libera el contenido intracelular (Figura 3.2). El proceso consiste en 40 segundos de sonicado (Amp: 60% Ciclo: 0,5s) y 40 segundos de reposo. Se repite varias veces hasta que se observe un cambio en la densidad y el color de la disolución. Se debe tener especial precaución con la subida de temperatura de la disolución, por ello, se emplea un soporte con hielo para contrarrestar el aumento de temperatura.
- Introducimos la disolución en tubos de ultracentrífuga, equilibrándolos. Depositamos los tubos del mismo peso enfrentados en el rotor. Se utiliza la ultracentrífuga a 13000 r.p.m con una temperatura de 4°C durante 40 minutos.
- Se introduce el sobrenadante en un tubo Falcon de 50mL y se descarta el precipitado.

Figura 3.2 Fotografía tomada por un microscopio electrónico donde se muestra el proceso de lisis celular.



(d) Cromatografía de afinidad: Para obtener nuestra proteína pura aprovechamos que está clonada con una etiqueta de histidinas y las separamos del resto de las proteínas mediante una cromatografía de afinidad Ni-NTA. Este soporte cromatográfico consta de una resina de agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético (NTA) que actúa como quelante de los iones de níquel divalente (Ni^{2+}), de esta forma, estos iones quedan adheridos a la columna a través de cuatro enlaces, dificultando su desprendimiento. Mediante los dos enlaces restantes se une la proteína a través de la cola de histidinas (Figura 3.3). La cola de histidinas se nombra comúnmente por su denominación inglesa “His-tag”, consta de una secuencia de aminoácidos de 6 histidinas que se unen al N- o C- terminal de la proteína. El protocolo de la cromatografía de afinidad se describe a continuación:

- Empaquetamos el soporte cromatográfico en una columna de plástico de 10-15 mL de volumen. Para una purificación estándar se suelen utilizar de 5 a 10 mL de soporte.
- Equilibramos el soporte cromatográfico con 50 mL de tampón: fosfato sódico 50mM, cloruro sódico 300mM pH 8.0.
- Se introduce en la columna la disolución que contiene la proteína.
- La elución de la proteína se llevó a cabo con un gradiente escalonado de imidazol con el mismo tampón de equilibrado. La proteína se eluye, de forma general, a una concentración de imidazol de 500mM. Se recogen las fracciones de las eluciones a las diferentes concentraciones de imidazol en tubos de ensayo correctamente etiquetados.



(e) Diálisis: Las fracciones que contienen la proteína se dializaron para eliminar el imidazol con una membrana de masa molecular de corte específico para la proteína. La proteína no puede atravesar la membrana con ese tamaño de poro y queda retenida en su interior. El protocolo que se siguió para llevar a cabo de la diálisis fue el siguiente:

- Hidratamos la membrana introduciéndola en un vaso con agua destilada.
- Con ayuda de una pipeta, se deposita en el interior de la membrana las eluciones que contengan proteína.
- Introducimos la membrana en 2L de tampón y se deja agitando a una temperatura de 4°C.
- Durante 24 horas debemos renovar el tampón 3 ó 4 veces, facilitando la eliminación del imidazol.

- Una vez dializada la proteína, la concentramos para usarla en los experimentos o bien para almacenarla congelada hasta su uso. Para ello introducimos la disolución de proteína en un filtro de concentración Millipore con un corte de masa molecular correspondiente a nuestra proteína y se facilita el paso de la disolución a través de la membrana por centrifugación. De esta forma reducimos el volumen de tampón aumentando la concentración de proteína, ya que la proteína queda retenida por la membrana.

(f) Medida de la concentración: La concentración de una proteína se obtiene midiendo mediante espectroscopía ultravioleta visible una disolución de la misma (comúnmente 1:100 para evitar pérdida en exceso de proteína) y aplicando la ley de Lambert-Beer con la absorbancia medida a 280nm (correspondiente a los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina), esta absorción se encuentra directamente relacionada con la concentración de la especie absorbente. Para poder realizar el cálculo de la concentración empleando la ley de Lambert-Beer es necesario conocer el coeficiente de extinción molar, así como el peso molecular de la proteína.

3.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE LAS PROTEÍNAS

3.3.1 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR

Para determinar el coeficiente de extinción utilizamos la secuencia de aminoácidos de la proteína con el dominio correspondiente en formato FASTA. Empleando la herramienta online proporcionada por ExpASy denominada Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>), se introduce la secuencia de la proteína y proporcionará un informe completo de los aminoácidos, incluyendo el cálculo de su composición atómica que nos proporcionará el peso molecular así como el coeficiente de extinción molar (Figura 3.4)

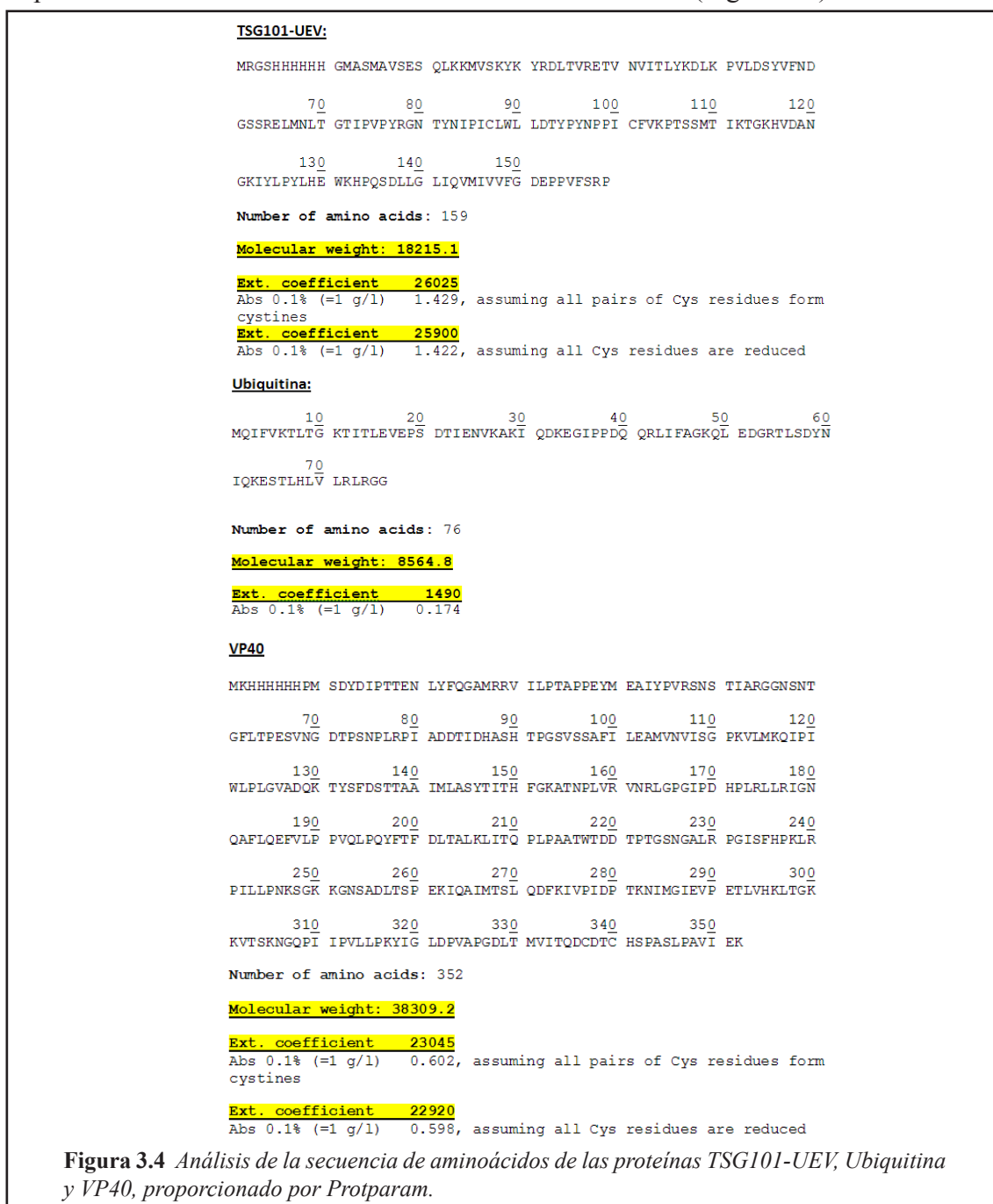


Figura 3.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas TSG101-UEV, Ubiquitina y VP40, proporcionado por Protparam.

3.3.2 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La técnica de electroforesis consiste en la separación de moléculas acorde con la movilidad de estas en un campo eléctrico. Según la superficie, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y su masa. Existen diferentes superficies para realizar esta técnica, pero la más común en el estudio de proteínas es una matriz porosa, llamada electroforesis en gel.

Dentro de las electroforesis en gel, la más empleada para el análisis de proteínas es el SDS-PAGE (“Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”), el uso de SDS provoca que las proteínas se desnaturalicen perdiendo su conformación tridimensional, de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS. Este detergente proporciona carga negativa y de una forma homogénea, ya que por cada gramo de proteína se unen 1.4 gramos de SDS. De esta forma se obtiene una relación carga/masa que no depende de la proteína y el fraccionamiento en el gel obedece solo a la diferencia de masa y a la longitud de la cadena (tamaño) de la proteína.

A la hora de realizar un gel, en nuestro caso Acrilamida/Bis-Acrilamida, hay que determinar el tamaño de la matriz porosa, siendo el tamaño de poro inferior conforme aumenta el porcentaje de disolución A con respecto al total (Tabla 3.1)

%Acrilamida	8%	10%	12.5%	15%
Disol. A	6.85	8.5	10.3	12.75
Disol. B	6.25	6.25	6.25	6.25
Disol. D	0.25	0.25	0.25	0.25
H ₂ O	11.65	10	8.2	5.75
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01
APS 10%	0.125	0.125	0.125	0.125

Tabla 3.1 Volúmenes en mL de las disoluciones necesarias para hacer un gel separador según el porcentaje de acrilamida que se necesite. El porcentaje de acrilamida se selecciona según el tamaño de las proteínas a separar.

Una vez hecha la mezcla, se colocan las dos placas enfrentadas en el soporte y se rellena el espacio entre las placas hasta aproximadamente 3/4 de su altura. Se cubre cuidadosamente el espacio restante de agua destilada con la intención de generar un frente firme del gel y no se forme un menisco. Una vez polimerizado el gel separador se retirará el agua de la superficie con ayuda de papel de filtro.

Para preparar 10mL de gel apilador, es necesario mezclar 1.3mL de disolución A, 2.5mL de disolución C, 0.1mL de disolución D, 6.1mL de agua destilada, 50µL de APS al 10% y 1µL de TEMED. Se vierte la disolución encima del gel separador y se deposita el peine con el número de calles de nuestro interés.

Se deposita el gel en la cubeta de electroforesis y la muestra de proteína se diluye en disolución F. Se calienta a 100°C durante 3 minutos y se introduce la dilución en el pocillo de la calle que se quiera utilizar del gel.

Se rellena la cubeta con tampón de desarrollo diluido (disolución G) y se establece una intensidad de corriente de 16mA por gel, aumentando el amperaje a 30mA por gel cuando el frente de azul bromofenol que comienza a descender alcance el gel separador.

Al conectar la cubeta a una fuente de corriente continua comenzará a producirse el fenómeno de movilidad electroforética que consiste en la velocidad de desplazamiento por unidad de campo eléctrico. En las condiciones establecidas se dará una diferente movilidad de cada molécula, que definirá su comportamiento y separación en el espacio del gel. Cuando el frente (visible gracias al azul de bromofenol) llegue al extremo inferior del gel, se detiene la corriente continua.

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas de las proteínas separadas se fijan con una disolución de metanol al 40% y ácido acético al 7% durante 30 minutos y se visualizan aplicando una disolución de tñir (Comassie Brilliant Blue) con una leve agitación durante otros 30 minutos. Por último, para la destinción empleamos la misma disolución que para fijar los geles, es aconsejable agitación para que estos procesos sean más rápidos. Finalizado este proceso, se obtiene el gel completamente revelado, donde se puede observar las bandas del colorante que se ha unido a la proteína.



Figura 3.5 Material de electroforesis empleado en el procedimiento descrito.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD Y ESTADO DE AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE DLS

3.4.1. FUNDAMENTOS DEL DLS

La dispersión dinámica de la luz (también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión cuasi-elástica de luz) comúnmente se nombra por sus siglas en inglés DLS (“Dynamic light Scattering”). El principio básico de esta técnica consiste en la emisión de un rayo láser a través de la muestra, las fluctuaciones emitidas por la muestra son detectadas en un ángulo específico conocido como ángulo θ (173° en el caso de la instrumentación utilizada en esta memoria).

Esta técnica es muy eficiente a la hora de determinar la distribución del tamaño de proteínas en disolución. Mide las fluctuaciones en la intensidad de dispersión con el tiempo, determina el coeficiente de difusión translacional (D), y posteriormente el diámetro hidrodinámico. La velocidad de estas fluctuaciones es proporcional al tamaño de la partícula o molécula (Figura 3.6), son resultado del movimiento browniano, que es el movimiento aleatorio que se observa en algunas partículas microscópicas que se hallan en un medio fluido.

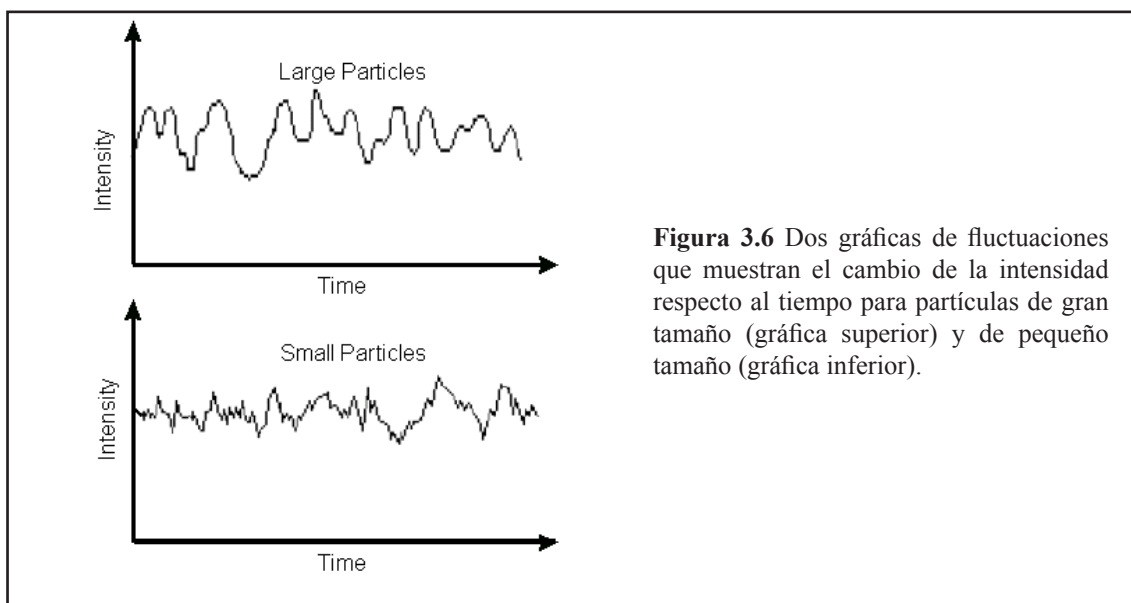


Figura 3.6 Dos gráficas de fluctuaciones que muestran el cambio de la intensidad respecto al tiempo para partículas de gran tamaño (gráfica superior) y de pequeño tamaño (gráfica inferior).

El diámetro medido en DLS es un valor que se refiere a cómo la partícula se difunde dentro de un fluido. Hay que tener en cuenta que el diámetro medido por esta técnica es considerado de una esfera rígida hipotética cuya velocidad de difusión es la misma que la media de las velocidades de difusión de sus diferentes orientaciones espaciales. Por lo tanto, el coeficiente de difusión de traslación no dependerá solo del tamaño de la partícula, también hay que tener en cuenta factores como la estructura de la superficie así como la concentración y el tipo de iones en el medio, ya que estos factores aumentan o reducen la velocidad de difusión y en consecuencia alteran el valor del diámetro hidrodinámico.

Detectando el patrón de luz dispersada por las moléculas en movimiento, el diámetro hidrodinámico se calcula a través de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1).

Ecuación 1: $d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$. D corresponde a la velocidad de difusión, k es la constante de Boltzmann, T hace referencia a la temperatura absoluta, η representa la viscosidad de la disolución y $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico de las moléculas en disolución. Por lo tanto, se puede obtener el tamaño a través de la velocidad de difusión, siempre que conozcamos las condiciones de temperatura del experimento y la viscosidad de la muestra.

El DLS aporta un correlograma que proporciona mucha información sobre la muestra, el momento en que la correlación comienza a descender significativamente es indicativo del tamaño medio de la muestra (Figura 3.7).

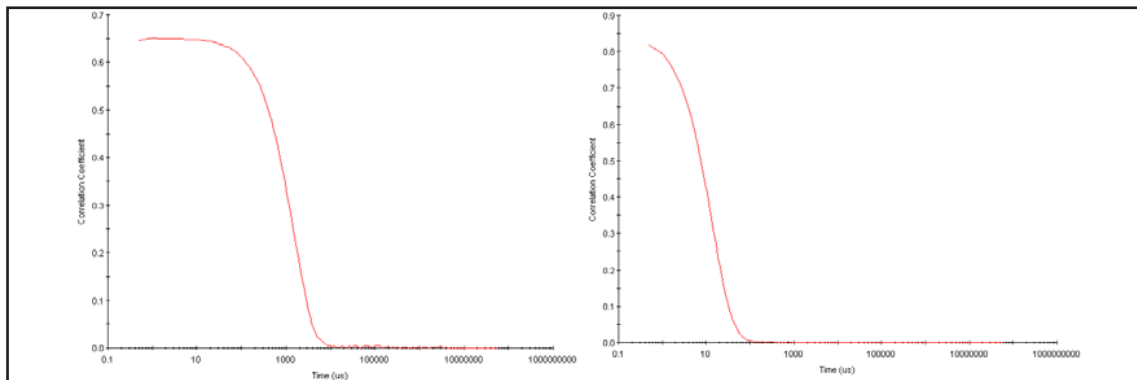


Figura 3.7 Correlograma para una partícula de gran tamaño (izquierda) donde la correlación de las señales tarda bastante en decaer y para una partícula de pequeño tamaño (derecha) donde la correlación de señales desciende rápidamente.

Además, cuando el DLS realiza una medida muestra dos tipos de distribución, por intensidad y por volumen. Si tenemos dos partículas a distintos tamaños pero en igual cantidad (1:1), y observamos la distribución en volumen, se verá el pico de la partícula más grande a una relación de 1:1000 y si convertimos la distribución a intensidad se observará una relación de 1:1000000 debido a que las ecuaciones son exponenciales y un ligero cambio de tamaño de partícula provoca una notoria diferencia en la proporción de los picos en la gráfica (Figura 3.8).

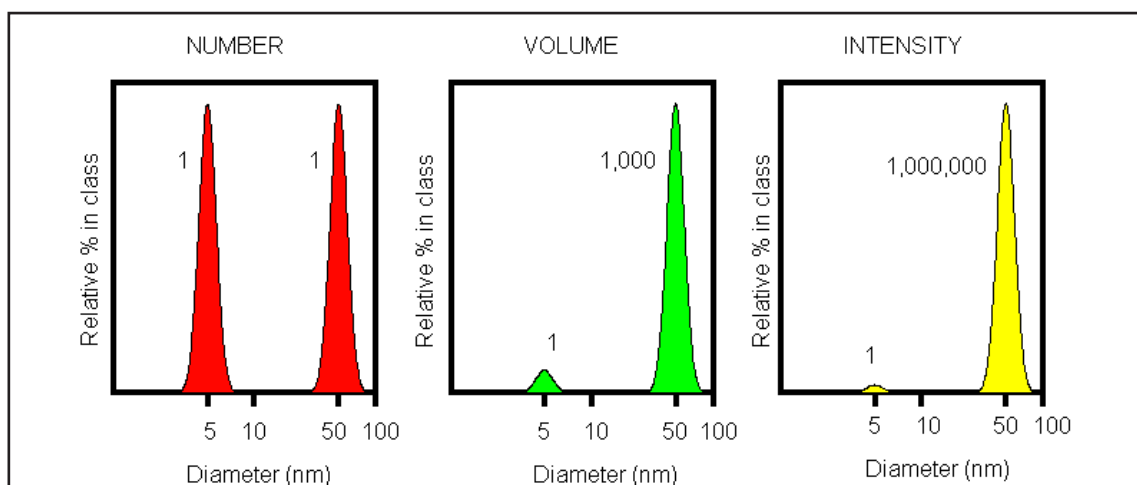
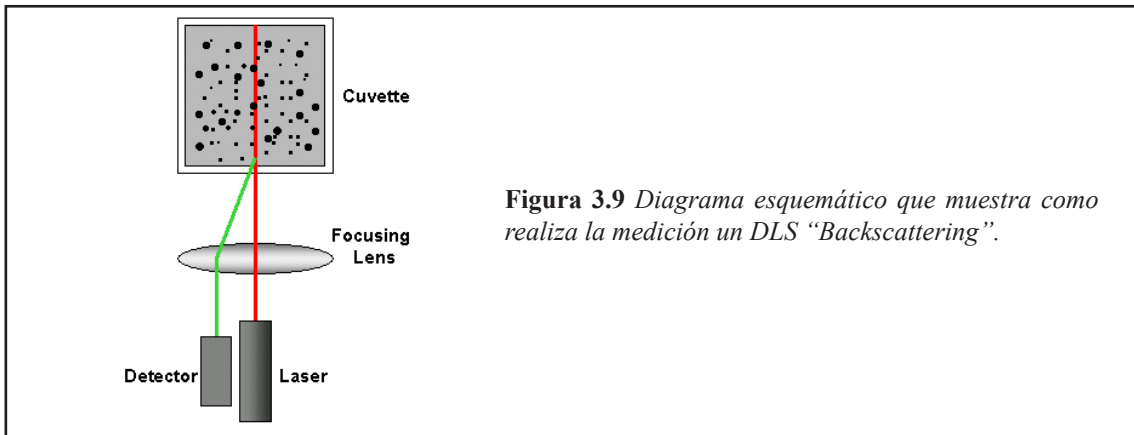


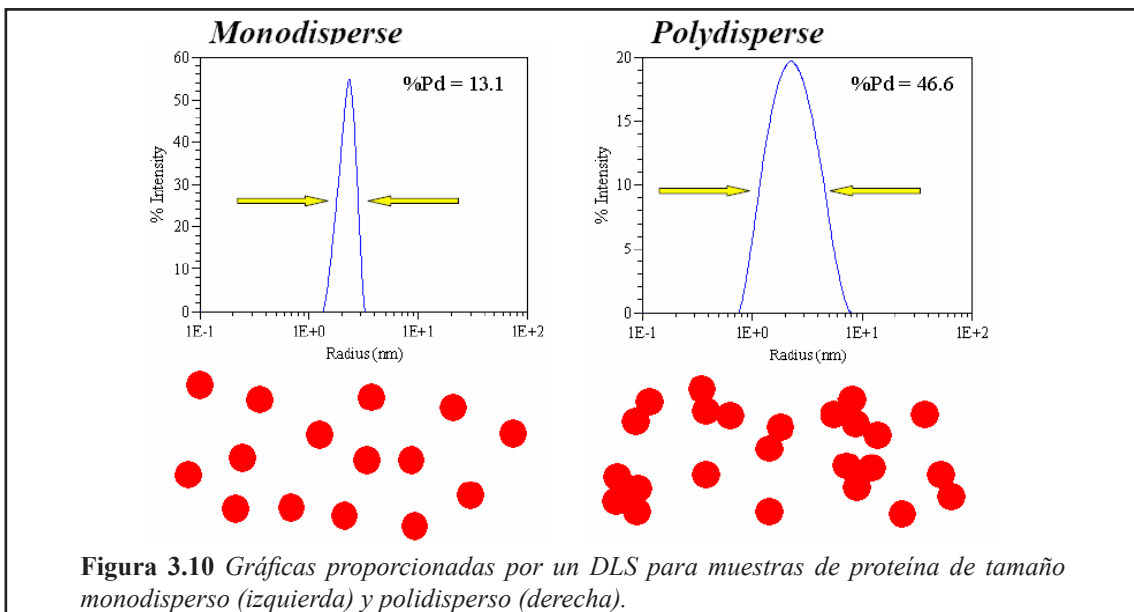
Figura 3.8 Distribución en número, volumen y tamaño para una mezcla que contiene igual número de partículas de tamaño 5 nm y 50 nm.

Teniendo en cuenta las diferentes distribuciones, el parámetro correcto y el que se ha empleado para tomar los datos en el experimento ha sido el radio hidrodinámico medido mediante intensidad, puesto que los datos recogidos por el DLS se basan en esta distribución. En ocasiones, se recurre a la distribución en volumen para observar que la especie mayoritaria en la disolución es la correspondiente a nuestra proteína y no tenemos otra partícula contaminante en el medio.

En concreto, el DLS empleado permite la modalidad “Back-scattering”, una técnica de retrodispersión no invasiva que muestra múltiples ventajas (Figura 3.12). Por ejemplo, el láser no tiene que viajar a través de toda la muestra, reduciendo el efecto de múltiple dispersión, fenómeno en el cual la dispersión de la luz de una partícula puede ser dispersada por otra partícula. Además, las partículas contaminantes como el polvo suelen ser de mayor tamaño que la muestra e interfieren mucho en la medida, el láser al no atravesar toda la muestra reduce la probabilidad de toparse con una partícula ajena. En definitiva, con la retrodispersión la influencia de contaminantes se ve reducida en gran medida.



El DLS también mide el ancho de pico, el cual puede ser representativo de la polidispersidad de la muestra. Varias estructuras pueden quedar reflejadas como un único pico, interpretando el ancho de pico se puede determinar si la muestra se encuentra de forma monodispersa y uniforme en disolución, o si por el contrario, se halla de forma polidispersa (Figura 3.10).



3.4.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LAS MEDIDAS DE DLS.

Es importante elegir una concentración correcta, si la concentración de la muestra es demasiado baja puede que no haya suficiente luz dispersa para realizar una medición. Por otro lado, si la muestra está demasiado concentrada, se producirá el fenómeno de dispersión múltiple. Este criterio se aplicará teniendo en cuenta la proteína que estemos midiendo ya que aquellas de menor tamaño dispersan menos la luz.

Partimos de alícuotas de proteína en tampón Tris-HCl pH8 10mM. Este tampón se utiliza para facilitar el cambio de pH de la muestra cuando se añade otro tampón más concentrado. En tubos Eppendorf preparamos la disolución con la cantidad de proteína necesaria para alcanzar la concentración de la medida que vayamos a realizar en 100 μ L, completamos este volumen con una concentración de tampón de 50mM (al pH que necesitemos).

Las muestras se centrifugan antes de cada medida a 14.000rpm a una temperatura de 4°C y durante 15 minutos. Una vez centrifugadas, con la micropipeta se toma un volumen de 60 μ L de la disolución y se introducen en la cubeta de cuarzo, evitando rozar las paredes de la misma y sin apoyar la punta sobre el fondo. A continuación se introduce la cubeta en el sonicador durante 20 segundos. La sonicación es necesaria para retirar burbujas de aire que alteran la dispersión de la luz.

Finalmente se introduce la cubeta en el DLS y se esperan 5 minutos para que se equilibre a la temperatura de 25°C. Una vez transcurrido este tiempo, ya se puede realizar la medición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

A continuación se indican los pasos específicos de cada purificación que se han optimizado para el máximo rendimiento de la proteína objeto de estudio junto con los resultados obtenidos.

4.1.1 TSG101-UEV

El gen del dominio TSG101-UEV se expresó en células *E. Coli* BL21-CODON+. El plásmido empleado para expresar esta proteína proporciona resistencia a los antibióticos ampicilina y cloranfenicol. Por lo tanto, la placa Petri donde se realizó el cultivo contenía el medio LB con estos antibióticos a una concentración final de 50µg/mL de ampicilina y 50µg/mL de cloranfenicol. En los cultivos en medio LB se utilizó una concentración de ampicilina de 50mg/mL en el preinóculo y en el cultivo (Concentración final de 50µg/mL para el preinóculo y de 62µg/mL para el posterior cultivo). De esta forma, solo crecerán aquellas bacterias *E. Coli* que presentan resistencia a los antibióticos.

Las bacterias BL21-CODON+ requieren la presencia de glucosa en el medio para poder crecer correctamente. Además, durante este proceso, el metabolismo de las células hace que el pH de la disolución se acidifique. Si esto no se controla puede provocar la muerte de las células y, por tanto, no daría lugar a la producción de la proteína durante el proceso de inducción. Por ello, en el caso de la purificación del dominio TSG101-UEV se adicionaron 4 mL glucosa a una concentración de 400mg/mL (concentración final en el medio de 2mg/mL) por cada matraz de cultivo con medio LB.

Los matraces fueron incubados durante toda la noche a 37 °C y se mantuvo la disolución bien aireada mediante un agitador orbital (la bacteria *E. Coli* necesita oxígeno para crecer). Durante este tiempo se alcanza la densidad óptica de 0.8 necesaria para proceder a la inducción de la proteína.

Tras dejar crecer el cultivo durante toda la noche (unas 12 horas) y comprobar que la densidad óptica era óptima, se añadió el agente inductor de la expresión, IPTG. Debido a lo crítico que resulta en este paso el consumo de glucosa y la acidificación de la disolución, se midió cada media hora el nivel de glucosa con la tiras reactivas Combur test (Roche) y se comprobó que este se encontrara comprendido entre 150-500 mg/dL. Si el nivel era más bajo se realizaba una adición de glucosa para restaurar los niveles iniciales de la disolución (2mg/mL). Igualmente, en el caso de que se observara acidificación del medio, se neutralizó añadiendo hidróxido sódico 1M. El pH del medio de cultivo debe mantenerse siempre neutro.

Una vez recogidas las células por centrifugación se resuspendieron en el tampón fosfato sódico 50mM, cloruro sódico 300mM y 2-mercaptoetanol 5mM a pH 8.0. Este tampón se utilizó a lo largo de toda la purificación; la adición de 2-mercaptoetanol es necesaria para esta proteína porque presenta 2 cisteínas expuestas que presentan cierta reactividad. Si no se mantiene la proteína en un medio reductor estas cisteínas pueden oxidarse y generar puentes disulfuro entre ellas (cistinas). Comúnmente este proceso provoca la agregación de la proteína, que en muchos casos es irreversible produciéndose su pérdida. Esto no solo supone un rendimiento menor de la proteína sino que además puede dificultar la purificación de la misma en una forma soluble.

En el caso de esta proteína, todos los períodos de incubación de la *E.Coli* se realizaron a 37 °C y no fue necesario reducir la temperatura durante el proceso de inducción, ya que no se observó la formación de cuerpos de inclusión. El rendimiento de la purificación fue alto y se obtuvieron 5mL de proteína a una concentración final de 12mg/mL, lo que supone una producción de 10mg de proteína por litro de cultivo.

La proteína se dializó finalmente en Tris-HCl 10 mM a pH 8.0. Se prepararon alícuotas de 200µL que se congelaron empleando nitrógeno líquido y se conservaron en el congelador a -80 °C hasta su uso. En estas condiciones la proteína es estable durante años.

4.1.2 VP40

El gen de la proteína VP40 se expresó en células *E.Coli* BL21-DE3. El plásmido empleado en este caso era resistente al antibiótico Kanamicina. Por tanto, la placa Petri donde crecieron las colonias contenía Kanamicina a una concentración final de 50µg/mL. En el proceso de expresión de la proteína en los medios de cultivo LB se añadieron 100µL de kanamicina 50mg/mL a un matraz de 100mL en el caso del preinóculo (concentración final de 50µg/mL) y 1mL a cada uno de los matraces del posterior cultivo (concentración final de 62µg/mL).

Tras añadir el agente inductor de expresión IPTG a una concentración final de 0.21mM se redujo la temperatura de incubación a 25°C. A esta temperatura se reduce la cantidad de proteína que se traslada a cuerpos de inclusión y que, por tanto, aparecería en el precipitado de los cuerpos celulares de la centrifugación que se realiza tras la sonicación de las células. Si esto ocurre, se hace más difícil la recuperación de la proteína ya que requiere el tratamiento con agentes desnaturizantes del tipo urea. Además, estos agentes deben evitarse por todos los medios si el fin último del uso de la proteína es cristalizarla.

En este caso, para resuspender las células y a lo largo de la purificación se empleó el tampón fosfato sódico 50mM, cloruro sódico 300mM a pH 8.0. No fue necesario el uso de 2-mercaptoetanol ya que en este caso las cisteínas no son tan reactivas y no generan procesos de agregación. Debido a que la masa molecular de la proteína era 38kDa, se concentró empleando filtros de 10kDa de corte de masa molecular.

El rendimiento de la purificación para VP40 es bueno ya que se obtuvieron 10 mg de proteína por litro de cultivo. Dado que la proteína se expresaba por primera vez, se corroboró su composición mediante una tripsinólisis seguida de un MALDI-TOF-TOF.

El análisis se llevó a cabo en los servicios técnicos del CIB. Los resultados obtenidos indican que la muestra presenta una serie de masas que corresponden con los péptidos trípticos característicos de la proteína VP40 (Figura 4.1)

Mass	Score	Description
34805	379	ORF
35287	379	matrix protein [Zaire ebolavirus]
35302	379	membrane-associated protein [Zaire ebolavirus]
35302	379	VP40 [Zaire ebolavirus]
35275	379	VP40 gene product [Ebola virus - Mayinga, Zaire, 1976]
35301	359	RecName: Full=Matrix protein VP40; AltName: Full=Membrane-associated protein VP40
35241	359	VP40 [Zaire ebolavirus]
31924	161	Chain A, Crystal Structure Of The Matrix Protein Of Ebola Virus
32299	161	Chain A, Crystal Structure Of Ebola Virus Vp40 Dimer
32324	145	Chain A, Low Resolution Structure Of Ebola Virus M241r Mutant

Figura 4.1 Informe del análisis empleando MALDI-TOF-TOF. Se observa que al enfrentar los datos experimentales de masas con la base de datos nos confirma que la muestra contiene la proteína matriz Vp40 del virus Ébola.

Observamos que la proteína tenía una gran tendencia a agregar y que prácticamente precipitaba en su totalidad al cabo de un par de días. Esta propensión a agregar es en parte esperada dada la función de la proteína en el virus, pero es muy importante encontrar condiciones en las que la proteína se mantenga estable en disolución para poder proceder a su estudio.

Mediante la adición de 10% de glicerol a las muestras de la proteína se evitaba la agregación y permitía, además, su congelación. Al igual que las muestras del dominio TSG-UEV, se prepararon varias alícuotas de 200µL que se congelaron empleando nitrógeno líquido y se conservaron en un arcón frigorífico a -80° C hasta su uso. En estas condiciones la proteína se conservaba de forma estable durante años.

4.1.2 UBIQUITINA

El gen de la Ubiquitina se expresó, al igual que la VP40, en células *E. Coli* BL21-DE3. El plásmido utilizado en este caso era resistente al antibiótico ampicilina, por lo tanto, a la placa Petri donde se realizó el sembrado se le aplicó este antibiótico a una concentración de 50mg/mL. Además, en el proceso de expresión de la proteína se añadieron 100µL de ampicilina a 100mL de preinóculo y 1mL a cada matraz con 800mL de medio LB para el cultivo, de forma que la concentración final de ampicilina en estos medios fue de 50µg/mL para el preinóculo y de 62µg/mL para cada matraz.

En este caso los cultivos se dejaron crecer durante el día hasta alcanzar la densidad óptica de 0.8, momento en el cual se procedió a la inducción mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.21mM. Los cultivos se dejaron en la incubadora a 37 °C durante al menos 2 horas antes de proceder a recoger las células.

En este caso, tanto para resuspender las células precipitadas como a lo largo del proceso de purificación se empleó el tampón de fosfato sódico 50 mM y cloruro sódico 300 mM a pH 8. Como la ubiquitina tiene una masa molecular próxima a los 10 kDa, tanto para la diálisis como para su concentración se utilizaron las membranas con un corte de masa molecular de solo 3kDa. De esta manera garantizábamos que la proteína era retenida por la membrana.

La Ubiquitina es una proteína que interviene en innumerables procesos y se caracteriza por ser muy estable. Ello ayuda a que en la purificación se obtenga un alto rendimiento. En concreto, se obtuvieron 20 mL a una concentración de 11 mg/mL, lo que supone una producción de casi 40mg por litro de cultivo.

Al igual que con las proteínas anteriores, se prepararon alícuotas de 200 μ L de disolución de proteína, se etiquetaron, se congelaron empleando nitrógeno líquido y se conservaron en un arcón frigorífico a -80 °C. En estas condiciones la proteína es estable durante años.

4.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

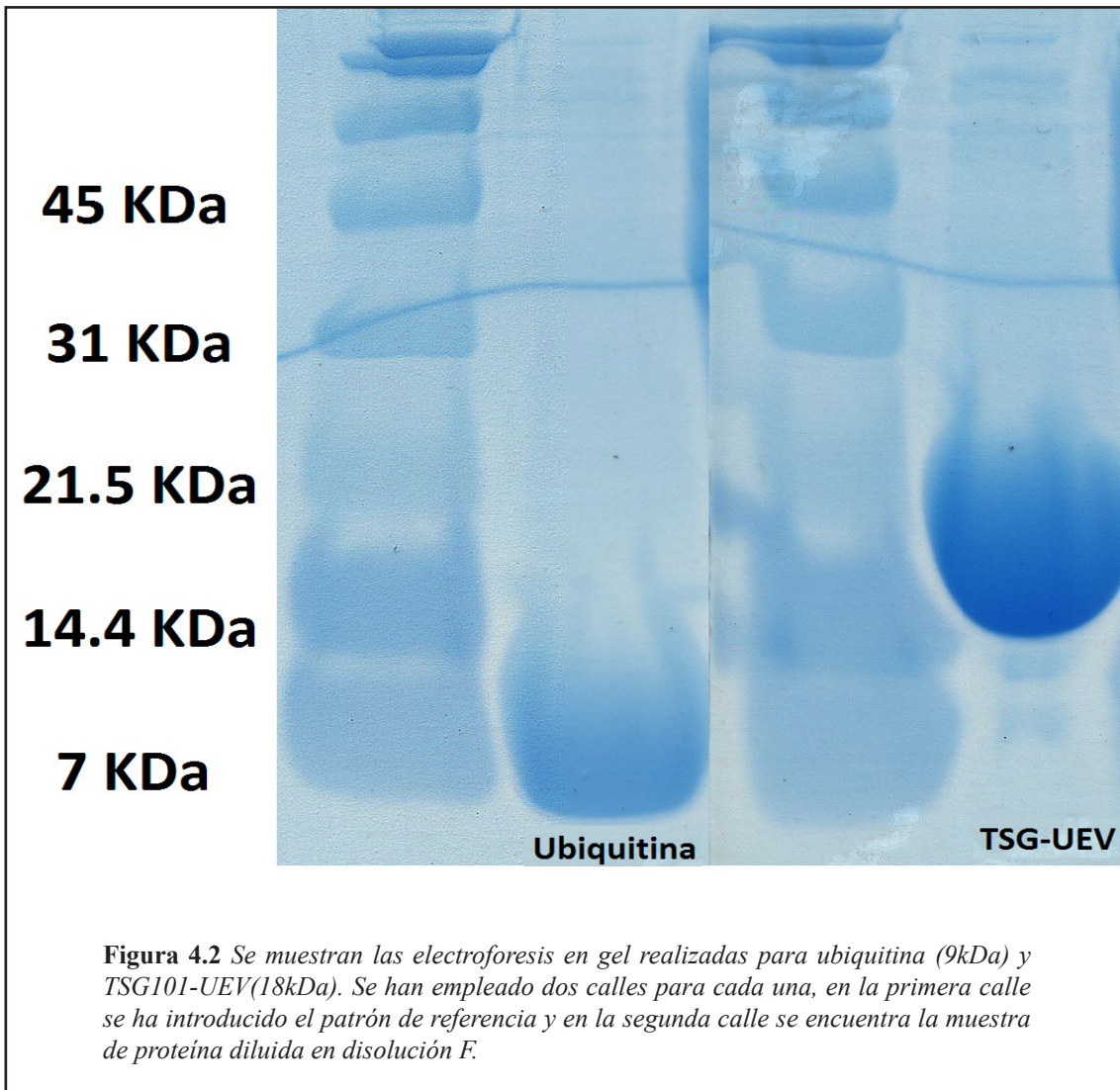
A lo largo de la purificación, para comprobar que las proteínas se expresaban y se obtenían en cada paso donde era de esperar, se probaba su presencia mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Esta técnica nos permite determinar el peso molecular de las proteínas mediante la localización de una banda con la masa molecular correspondiente a la proteína objeto de estudio, de esta forma podemos corroborar su presencia. Por ello, se recogieron alícuotas de 100µL en la expresión de la proteína (en el medio de cultivo antes y después de inducir con IPTG) y en cada paso de la purificación.

La banda correspondiente a la proteína clonada solo debe aparecer en los medios de cultivo una vez se ha añadido el IPTG. Si una vez sonicadas y centrifugadas las células, la proteína aparecía en el precipitado, ello era indicativo de que se están formando cuerpos de inclusión. Este era el caso de la proteína VP40 y por ello se procedió a bajar la temperatura durante el proceso de inducción.

Al final de la purificación se realizó una electroforesis empleando muestras de la proteína purificada con el fin de corroborar que la proteína obtenida se corresponde con la que pretendemos purificar y también para comprobar el nivel de pureza de la muestra. En todos los casos los niveles de pureza fueron superiores al 90%. Para preparar las muestras de electroforesis se utilizaron 10µL de la muestra final y 10µL de tampón de carga (Disolución F) de forma que la concentración final de la proteína estuviera comprendida entre 1 y 5 mg/mL.

En todos los casos se cargó en la primera calle de los geles (y a veces también en la última y alguna calle intermedia) una muestra con proteínas patrón para corroborar la masa molecular de las proteínas cargadas en las otras calles. Una vez sometido el gel al campo eléctrico, se produjo la migración de las proteínas.

La corriente eléctrica se paró cuando se comprobó que la banda del marcador (azul de bromofenol) alcanzaba el fin del gel. Para identificar las proteínas, se tiñó el gel con el colorante Comassie Brilliant Blue que se une específicamente a las proteínas y permite revelar su posición en el gel. En la Figura 4.2 se muestra el gel que se obtuvo con las muestras purificadas de Ubiquitina y TSG101-UEV. Las masas moleculares se corresponden con 9kDa para la Ubiquitina y 18k Da para el dominio UEV de la TSG101 (se corroboró la presencia y masa molecular de la proteína VP40 a través de un MALDI-TOF-TOF, debido a que era la primera vez que se expresaba dicha proteína, véase resultados y discusión de la purificación de VP40).



4.2 DETERMINACIÓN DE LOS INTERVALOS DE SOLUBILIDAD DE LAS PROTEÍNAS

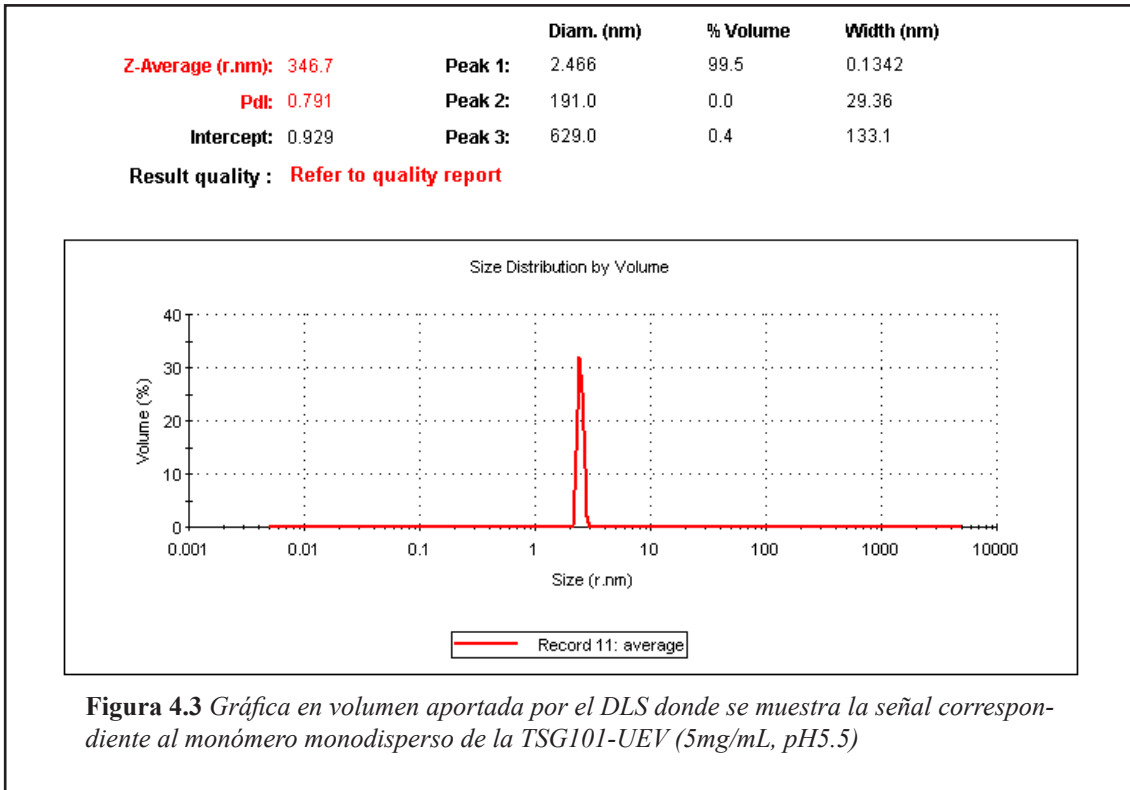
El objeto último de estudio en este trabajo fin de grado era determinar el intervalo de solubilidad de las proteínas purificadas para realizar experimentos con los complejos de las mismas y cristalizarlas. Este intervalo se determinó mediante medidas del radio hidrodinámico de las proteínas, lo que nos permite determinar no solo si la proteína es soluble y monodispersa, sino además si se produce algún proceso de agregación.

Para ello, se comenzó preparando las proteínas a concentraciones de 1 mg/mL en un intervalo amplio de pHs (4.0-8.0). En el caso de la Ubiquitina, debido a su menor tamaño molecular, fue necesario partir de concentraciones más altas, ya que el número de cuentas acumuladas en cada medida eran insuficientes (<100) para obtener una medida fiable. Conforme comprobábamos que intervalo de pHs era el más óptimo, se acotaban las medidas a ese intervalo. Es importante tener en cuenta que las proteínas solo mantienen su plegamiento nativo en determinado intervalo de pHs que es característico de cada una de ellas y que depende tanto de su composición o secuencia (estructura primaria) como de su plegamiento (estructura terciaria y cuaternaria). Por ello en aquellos pHs donde se comprobó que la proteína no era estable, no se continuó con las medidas. Se fue aumentando la concentración de la proteína hasta alcanzar concentraciones de 10 mg/mL (concentración habitualmente utilizada en la cristalización de las mismas).

En cada medida, el valor del radio hidrodinámico nos permitió determinar si la proteína era soluble o sufría procesos de agregación, bien específicos o inespecíficos. En algunos casos, las proteínas presentan procesos de agregación específicos que dan lugar a la formación de dímeros, tetrámeros, hexámeros, etc...de la proteína. A menudo, estos procesos de agregación están relacionados con la función de la proteína. Lo importante a la hora de cristalizar no es el estado de agregación, sino que la muestra sea monodispersa, es decir, que solo estén presentes monómeros, o dímeros o hexámeros, etc...(Figura 4.3). Si la disolución de proteína no es monodispersa, es heterogénea, y están presentes poblaciones de la proteína con diferentes estados de agregación, dificulta en extremo la correcta cristalización de la proteína.

En el proceso de cristalización se empaquetan de una forma tridimensional las unidades elementales de cada proteína. Si la disolución contiene más de una proteína o diferentes estados de agregación de la misma, se dificulta el empaquetamiento compacto de la misma y por tanto afectará a la calidad del cristal, o incluso imposibilitará su crecimiento.

A continuación, se analizan los resultados obtenidos con las proteínas TSG101-UEV y Ubiquitina. La proteína VP40 presentó una serie de dificultades que ha impedido la medida del intervalo de solubilidad dentro de la realización de este trabajo fin de grado, debido a las limitaciones de tiempo (120 horas que se deben distribuir entre las diferentes etapas del mismo). En cualquier caso, al final se consiguió obtenerla en condiciones estables, motivo por el cual se ha incluido al menos este resultado parcial en la memoria de este trabajo fin de grado.



4.2.1 TSG101-UEV

En primer lugar, se estudió el dominio UEV de la TSG101 y se comprobó que a la concentración de 1mg/mL las medidas resultaban en un correlograma correcto (sin desviaciones del eje, ni ruido en la recta) y el número de cuentas estaba por encima de 100. Por lo tanto, se decidió comenzar a trabajar a esta concentración.

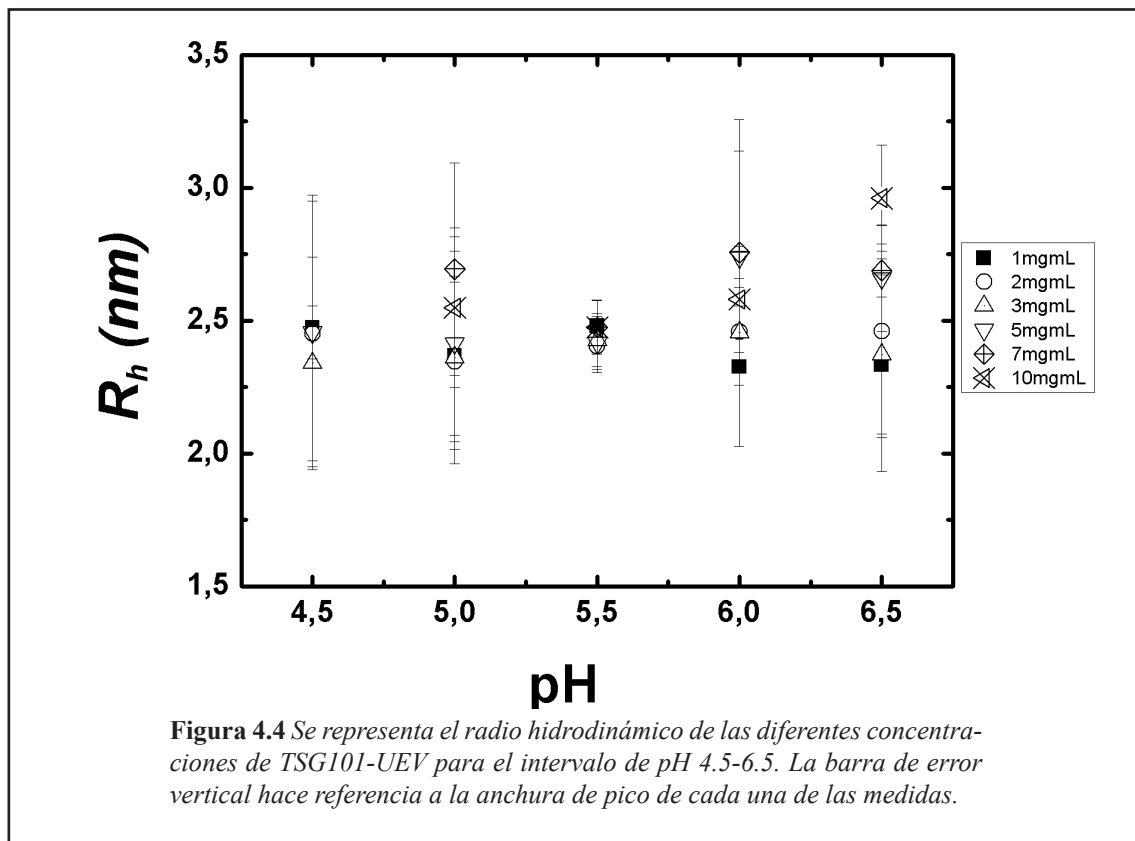
Se prepararon muestras desde pH 4.0 a 8.0 y observamos que en el intervalo de pH 4.5-6.5 el radio hidrodinámico promedio que se obtenía de las medidas de las disoluciones de la proteína era 2.5 nm. Este radio hidrodinámico es el que cabe esperar de una muestra con una masa molecular de unos 18 kDa, lo que indicaba que a esos pHs la proteína se encontraba como monómero en disolución. A pH 4.0 las medidas del DLS muestran radios hidrodinámicos mayores, lo que es indicativo de que a este pH la proteína comienza a agregar. La agregación no es favorable si se pretende utilizar la proteína para cristalizar, por lo tanto se descarta este pH y procedemos a estudiar los radios hidrodinámicos de las disoluciones más concentradas en el intervalo de pH de 4.5-8.0.

A pH 4.5 y 1 mg/mL la proteína se muestra como monómero, pero al aumentar la concentración se observa una cierta tendencia a agregar. En todo equilibrio, entre la forma monomérica y la forma oligomérica, la concentración favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la forma agregada. Conforme se medían muestras de la proteína más concentradas (7 mg/mL y 10 mg/mL), se observaba la formación de gran cantidad de agregados (aparecen picos en el DLS con radios hidrodinámicos superiores a 100 nm).

A pH 7.0 y 8.0 se observa que la señal del monómero desaparece y se incrementan aquellos picos que corresponden a agregados. Esto se puede interpretar como que, si bien hay una pequeña población del monómero, son mucho más comunes los agregados. Por ello, se descartaron también estos pHs para estudiar las condiciones óptimas de cristalización.

En la Figura 4.4 se resumen los resultados obtenidos de las medidas de DLS. Se han representado los radios hidrodinámicos a varias concentraciones y en los intervalos de pH estudiados. Cada uno de los datos representados en la gráfica es la media de diez medidas independientes realizadas de cada muestra para cada pH a las diversas concentraciones ensayadas. De esta forma, se asegura la reproducibilidad de los datos obtenidos.

También se ha representado con una barra de error la anchura del pico. La anchura de pico es un dato muy significativo, ya que es indicativo de la presencia de posibles equilibrios con otras formas estructurales. Por lo tanto, cuanto mayor sea la anchura más se alejará del estado monodisperso, ya que puede provocar que haya más de una especie en disolución. Estas diferentes formas estructurales pueden corresponder a diferentes formas oligoméricas o incluso diferentes conformómeros de la proteína. En cualquier caso, no son las condiciones óptimas que buscamos para la cristalización de la proteína.

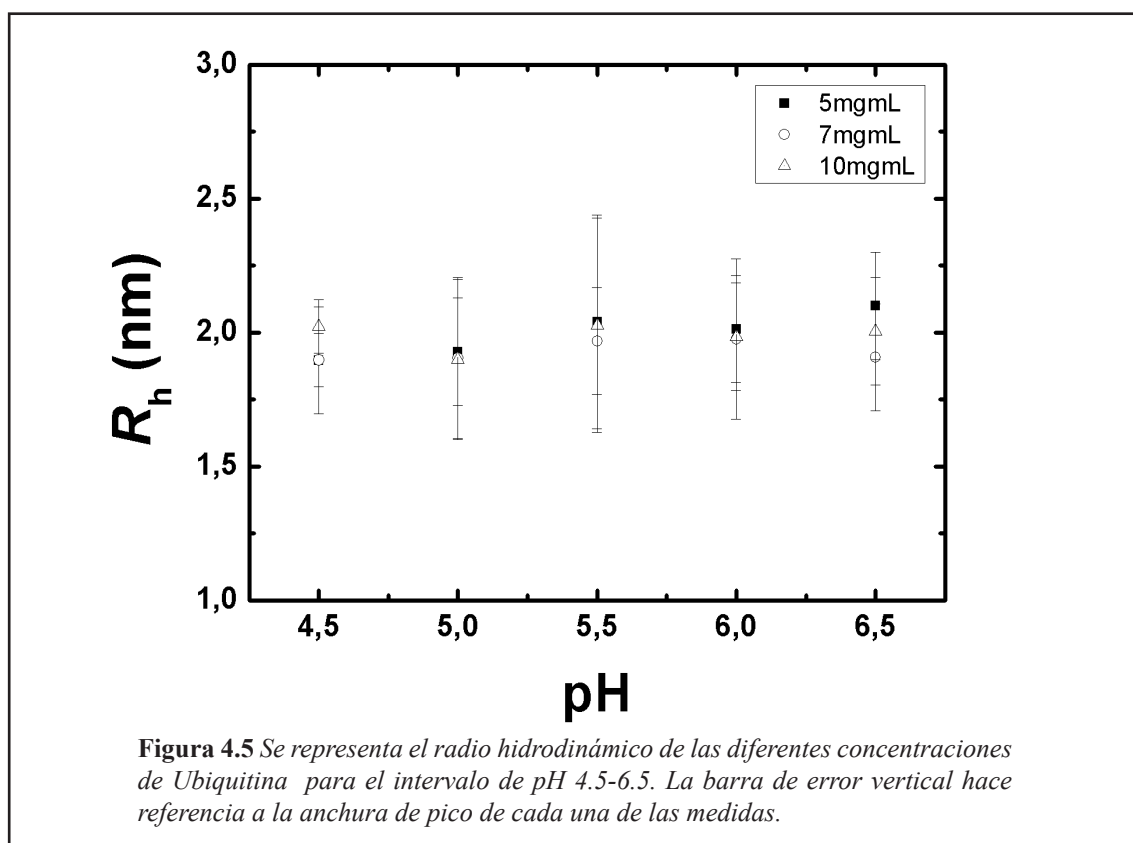


Como se observa en la gráfica de la Figura 4.4, el pH óptimo para esta proteína es 5.5, ya que las medidas de DLS nos indican que la disolución es monodispersa con un radio hidrodinámico para la proteína presente de 2.5 nm, lo que indica que esta proteína en estas condiciones se encuentra como monómero.

4.2.2 UBIQUITINA

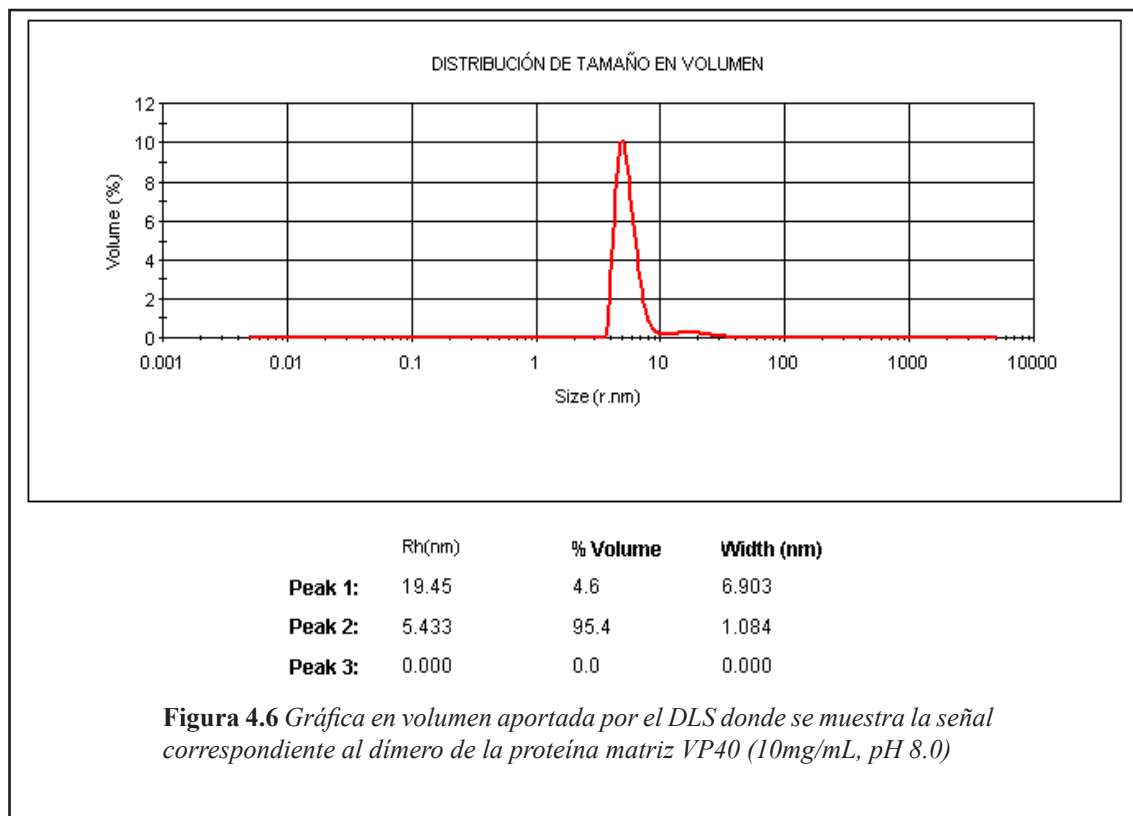
Se realizaron el mismo tipo de medidas con la Ubiquitina y como lo que se pretende es determinar en qué intervalo de pH se puede cocrystalizar la ubiquitina con el dominio UEV de la TSG101, solo se prepararon muestras en el intervalo óptimo de dicha proteína. De esta forma, conocido el intervalo favorable para la TSG101-UEV, comprobamos si también es adecuado para la Ubiquitina.

El menor tamaño de la Ubiquitina nos obligó a partir de concentraciones de proteína de al menos 5mg/mL. Como ya se ha mencionado, para que la medida sea fiable, es necesario un número mínimo de cuentas para que el correlograma sea analizable. A las concentraciones ensayadas y en el intervalo de pH estudiado, el radio hidrodinámico de la Ubiquitina fue de 1.9 nm, lo que se corresponde con el valor esperado para una forma monomérica de la misma. Además, la anchura de los picos nos indica que en estas condiciones la disolución de la proteína es monodispersa. Los datos obtenidos se recopilan en la Figura 4.5.



4.2.3 VP40

Por las razones anteriormente expuestas, no fue posible realizar el estudio completo de esta proteína. El radio hidrodinámico concuerda con el valor esperado para el dímero de una proteína con una masa molecular de 38kDa. Por lo tanto, se ha comprobado que la proteína se encuentra como dímero en disolución a pH 8.0 (Figura 4.6).



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Se han optimizado los protocolos de purificación de tres proteínas: el dominio UEV de la TSG101, la Ubiquitina y la proteína de la matriz del virus del Ébola VP40. Los rendimientos en los tres casos son bastante altos.
2. Se ha comprobado la pureza de las proteínas Ubiquitina y TSG101-UEV en la muestra final mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, esta ha sido superior al 90% en todos los casos.
3. Se ha estudiado la solubilidad y monodispersidad del dominio UEV de la TSG101 y de la Ubiquitina mediante las medidas del radio hidrodinámico de las especies presentes en sus disoluciones a diferentes pHs y concentraciones de la proteína. Se ha comprobado que el pH óptimo para realizar pruebas de cristalización del dominio UEV de la TSG101 junto con la Ubiquitina es 5.5.
4. Se han optimizado las condiciones para mantener la proteína VP40 en disolución y poderla utilizar en estudios de caracterización y cristalización. Se ha comprobado que a una concentración de 10mg/mL la proteína es un dímero en disolución a pH 8.0.

