

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

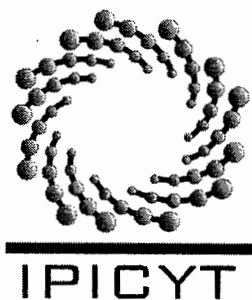
**Purificación, análisis de estabilidad térmica y
ensayos de cristalización de la proteína G0S2 de
humano**

Tesis que presenta
Edgar Daniel Páez Pérez

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2016



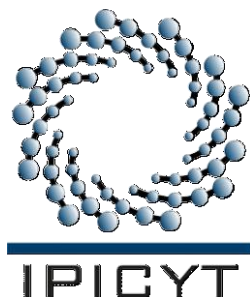
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Purificación, análisis de estabilidad térmica y ensayos de cristalización de la proteína G0S2 de humano”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Edgar Daniel Páez Pérez** y aprobada el trece de julio del dos mil dieciséis por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Samuel Lara González
Director de la tesis

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Miembro del Comité Tutorial

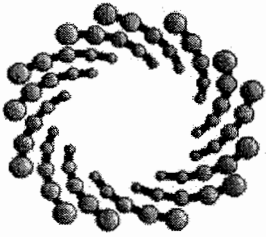
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Samuel Lara González.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 331851) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT CB-2011-01 No 168710 y por el proyecto CONACYT INFR-2013-01 No 204373.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 151 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 09:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. Samuel Lara González

Presidente
Secretario
Sinodal

IPICYT
IPICYT
IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Edgar Daniel Páez Pérez

sobre la Tesis intitulada:

Purificación, análisis de estabilidad térmica y ensayos de cristalización de la proteína G0S2 de humano

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 10:46 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de julio de 2016.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

**A mi Familia
y
Amigos**

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Al Dr. Samuel Lara González por la dirección y apoyo en este trabajo

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Dr. Luis Antonio Salazar Olivo, por las aportaciones en la tesis.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
RESUMEN	2
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Materiales	5
Evaluación de la expresión de la proteína recombinante 6xHis-G0S2 de humano (hG0S2) en <i>E. coli</i>	5
Evaluación de la expresión de la proteína de fusión GST-hG0S2	6
Análisis del cDNA de G0S2 de humano y de ratón	6
Construcción de un vector de expresión (pETSUMO)	7
Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión SUMO-hG0S2 y SUMO-mG0S2	7
Evaluación de la solubilidad de la proteína de fusión SUMO-hG0S2	8
Purificación de la proteína recombinante hG0S2	8
Análisis por western blot	9
Ensayos de cristalización	10
Fluorimetría Diferencial de Barrido (DSF)	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
Análisis y optimización de las construcciones de G0S2	11
Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína de fusión SUMO-hG0S2	15
Purificación de la proteína recombinante hG0S2	18
Purificación de SUMO-hG0S2	22
Ensayos de cristalización	23
Estabilidad térmica de hG0S2	23
CONCLUSIÓN	32
Referencias	33
Material Suplementario	37
Apéndice	39

Lista de tablas

Tabla 1. Construcciones de G0S2 de humano y ratón.	12
Tabla 2. Tm de desnaturalización de hG0S2 en las diferentes condiciones evaluadas con el ensayo de estabilidad.	31

Lista de figuras

Figura 1. Expresión de las construcciones pET28-PPS/G0S2i, pGEX-6P/hG0S2 y pETSUMO en <i>E coli</i> BI21 (DE3).	13
Figura 2. Expresión y solubilidad de SUMO-hG0S2	16
Figura 3. Análisis de corte con PPS de la proteína de fusión SUMO-hG0S2	17
Figura 4. Purificación de hG0S2	20
Figura 5. Purificación de SUMO-hG0S2	22
Figura 6. Ensayo de estabilidad térmica comparando distintas concentraciones de la proteína hG0S2	25
Figura 7. Efecto del pH y metales en la estabilidad térmica de la proteína hG0S2	26
Figura 8. Efecto del glicerol y aminoácidos en la estabilidad térmica de la proteína hG0S2	28
Figura 9. Efecto de agentes reductores en la estabilidad térmica de la proteína hG0S2	30

Abreviaturas (por sus siglas en Inglés)

ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
CV	Column Volume
FA	Fatty Acids
G0S2	G0/G1 switch 2 (G0S2)
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LD	Lipid Droplet
NLSDM	Neutral Lipid Storage Disease
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPS	Prescission Protease
TG	Triacylglycerol
TM	Temperature Melting
MGL	Monoacylglycerol Lipase

Resumen

Purificación, análisis de estabilidad térmica y ensayos de cristalización de la proteína G0S2 de humano

G0S2 es una proteína básica de 103 aminoácidos. Hasta la fecha, la función mejor conocida de G0S2 es su capacidad inhibitoria directa sobre la enzima lipolítica triglicérido lipasa de tejido adiposo (ATGL). Aunque también se le han asignado diversas actividades biológicas, incluyendo papeles en el ciclo celular, proliferación celular, apoptosis, inflamación y carcinogénesis. Es por esto que dilucidar la estructura y las funciones con más precisión de G0S2 sería de gran aporte para poder abordar cuestiones específicamente sobre la regulación de ATGL, así como también su participación en aspectos importantes en la lipólisis y otros procesos celulares. Con el objetivo de obtener la estructura tridimensional experimental de G0S2, expresamos G0S2 humana (hG0S2) como proteína de fusión con la proteína SUMO de *S. cerevisiae* en *E.coli* mediante el vector de expresión pETSUMO. La proteína de fusión SUMO-hG0S2 y su producto de proteólisis hG0S2 fueron solubles y se purificaron por cromatografías de afinidad, intercambio iónico y exclusión molecular. De estas dos formas de la proteína Obtuvimos concentraciones de proteína de 10 y 5 mg/mL, respectivamente, lo que permitió realizar los primeros ensayos de cristalización. Finalmente, observamos que el uso de glicerol al 10% y pH 6.5 tienen un impacto positivo en la estabilidad térmica de hG0S2, lo que nos proporciona un buen punto de partida para buscar la optimización de condiciones para su cristalización y poder caracterizar la estructura de hG0S2.

PALABRAS CLAVE: G0S2, lipólisis, purificación, ensayo de desplazamiento térmico o Thermofluor

Abstract

Purification, thermal stability analysis and crystallization trials of the human protein G0S2

G0S2 is a basic protein of 103 amino acids. To date, the best-known function of G0S2, is the inhibitory effect that it has on the activity of the lipolytic enzyme, adipose triglyceride lipase (ATGL). Although, G0S2 has also been related to various biological activities, including roles in cell cycle, cell proliferation, apoptosis, inflammation and carcinogenesis. That is why, the elucidation of the 3D structure of G0S2 would be a significant contribution to address issues specifically on the regulation of ATGL, as well as their participation in important aspects in lipolysis and other cellular processes. In order to obtain the experimental three-dimensional structure of G0S2, we expressed human G0S2 (hG0S2) as a fusion protein with SUMO protein of *S. cerevisiae* in *E. coli* with the expression vector, pETSUMO. The fusion protein SUMO-hG0S2 was found to be soluble and its purification was carried out using IMAC, ion exchange and gel filtration chromatography, the hG0S2 was released by proteolysis with PPS. We obtained protein concentrations of 10 and 5 mg/mL for the SUMO-hG0S2 and hG0S2 proteins, respectively, which allowed us to set the first crystallization trials. Finally, we found by thermofluor approach that the use of 10% glycerol, and pH 6.5 has a positive impact on hG0S2 thermal stability, which provides a good starting point to optimize purification and crystallization conditions that should let us characterize the structure of hG0S2.

KEY WORDS: G0S2, lipolysis, purification, Thermal Shift Assay or Thermofluor

Purificación, análisis de estabilidad térmica y ensayos de cristalización de la proteína G0S2 de humano

*Edgar D. Páez-Pérez, Samuel Lara-González**

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT. División de Biología Molecular. Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, 78216 San Luis, S.L.P. México.

RESUMEN

G0S2 es una proteína básica de 103 aminoácidos. Hasta la fecha, la función mejor conocida de G0S2 es su capacidad inhibitoria directa sobre la enzima lipolítica, triglicérido lipasa de tejido adiposo (ATGL). Aunque también se le han asignado diversas actividades biológicas, incluyendo papeles en el ciclo celular, proliferación celular, apoptosis, inflamación y carcinogénesis. Es por esto, que dilucidar la estructura y las funciones con más precisión de G0S2 sería de gran aporte para poder abordar cuestiones específicamente sobre la regulación de ATGL, así como también su participación en aspectos importantes en la lipólisis y otros procesos celulares. Con el objetivo de obtener la estructura tridimensional experimental de G0S2, expresamos G0S2 humana (hG0S2) como proteína de fusión con la proteína SUMO de *S. cerevisiae* en *E.coli* mediante el vector de expresión pETSUMO. La proteína de fusión SUMO-hG0S2 fue soluble y se purificó, al igual que la proteína hG0S2 liberada por proteólisis, por cromatografías de afinidad, intercambio iónico y exclusión molecular. Obtuvimos concentraciones de proteína de 10 y 5 mg/mL, respectivamente, lo que permitió realizar los primeros ensayos de cristalización. Finalmente, observamos que el uso de glicerol al 10% y pH 6.5 tiene un impacto positivo en hG0S2, lo que nos proporciona un buen punto de partida para buscar la optimización de condiciones y poder caracterizar la estructura de hG0S2

PALABRAS CLAVE: G0S2, lipólisis, purificación, ensayo de desplazamiento térmico o Thermofluor

En la mayoría de los organismos, el exceso de energía se almacena en forma de triglicéridos (TG) en gotas de lípidos (LD) con el fin de asegurar la disponibilidad de energía en un caso de demanda. Durante períodos de incremento de la demanda de energía, los TG se hidrolizan mediante lipólisis, que resulta en la liberación de ácidos grasos (FA) y glicerol como sustratos de energía.¹ La importancia de la lipólisis para prácticamente todos los organismos, se hizo evidente con la constatación de que los TG no pueden moverse a través de las membranas celulares sin ser degradados por las lipasas.² Aunque la importancia de la lipólisis ha sido reconocida durante décadas, muchas de las proteínas clave que intervienen en ella han sido descubiertas recientemente. Hasta la fecha, tres enzimas han sido implicadas en la completa hidrólisis de las moléculas de TG en las reservas celulares de lípidos: la triglicérido lipasa de tejido adiposo³ (ATGL), que realiza selectivamente el primer paso limitante en la hidrólisis de TG en diacilglicerol (DG) y AG, la lipasa sensible a hormona⁴ (HSL), necesaria para el catabolismo del DG y finalmente la monoglicérido lipasa⁵ (MGL), que escinde monoacilgliceroles (MAG) originando glicerol y AG. El papel central de ATGL en el catabolismo de TG se hizo evidente a partir del análisis de ratones deficientes en esta enzima y de pacientes humanos con mutaciones en el gen *patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 (PNPLA2)*. Ratones deficientes en ATGL muestran una lipólisis reducida y un incremento en la acumulación de grasa en prácticamente todos sus tejidos corporales.⁶ Los pacientes con mutaciones en el gen *PNPLA2* desarrollan la enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros con miopatía (NLSDM; del inglés: *Neutral Lipid Storage Disease*) que se caracteriza por la acumulación sistémica de TG en múltiples tejidos y cardiomiopatía.⁷ Hasta la fecha, nuestra comprensión de la regulación de ATGL es bastante limitada, aunque dos proteínas han sido identificadas como reguladores importantes de esta enzima: CGI-58 que estimula su actividad y G0S2 que la inhibe.^{8,9} En humanos y ratones G0S2 es una proteína de 103 aminoácidos que fue descubierta en cultivos de células mononucleares durante la transición de G0 a G1 del ciclo celular.¹⁰ Se ha descrito la expresión de G0S2 en diversos tejidos humanos y murinos, encontrándose mayores niveles en

tejidos adiposos e hígado, seguidos por el músculo, ovario y riñón.^{9,11} G0S2 no comparte similitudes de secuencia con alguna estructura 3D de proteínas conocidas, ninguna característica llamativa está presente en la estructura de la proteína que sugiera una función discernible inmediata¹². De acuerdo a la predicción de su estructura secundaria, G0S2 contiene 2 α hélices separadas por una secuencia hidrofóbica, con potencial de generar giros y asumir una conformación de hoja β .¹³ Por otra parte, se ha observado que la delección de los residuos 27-41, que corresponden a la región hidrofóbica, interrumpe la interacción de G0S2 con ATGL.⁹ A G0S2 se le han asignado diversas actividades biológicas, incluyendo papeles en el ciclo celular, proliferación celular, apoptosis, inflamación y carcinogénesis.¹³ Sin embargo, la función mejor estudiada de G0S2, es su papel en el metabolismo de lípidos. La capacidad inhibitoria de G0S2 sobre ATGL fue originalmente caracterizada por Yang y colaboradores (2010), quienes expresaron G0S2 en células HeLa y determinaron su localización subcelular por inmunofluorescencia, después de tratar con ácido oleico para promover la formación de gotas de lípidos. Se observó que las gotas de lípidos en las células que expresaban G0S2 fueron significativamente más grandes y numerosas en comparación con las células no transfectadas. Además, G0S2 se localizó en la superficie de las gotas de lípidos. Debido que ATGL juega un papel clave en la degradación de gotas de lípidos en células HeLa, se concluyó que G0S2 previene la degradación de las gotas de lípidos mediada por ATGL. Más importante aún, se determinó que G0S2 interactúa directamente con ATGL y es capaz de inhibir su actividad hidrolasa, aun en condiciones de activación por CGI-58.^{9,14} Sin embargo, surgen nuevas preguntas acerca de cómo es la interacción de ATGL con G0S2 y si esta última juega otros papeles diferentes en el metabolismo de lípidos. A pesar de que G0S2 ha sido objeto de numerosos trabajos de investigación, a la fecha su estructura tridimensional no ha sido determinada, y es necesario realizar esfuerzos en cristalografía para obtener su estructura resuelta, ya que esta proteína tiene una participación en el metabolismo celular cada vez más interesante e importante. Dilucidar su estructura permitiría conocer mejor su función y poder ampliar nuestro conocimiento del metabolismo celular en donde se ve involucrada

esta proteína. Por lo cual el propósito de este proyecto fue obtener una construcción de G0S2 que se exprese de forma soluble y a una concentración adecuada para iniciar experimentos de cristalización, para posteriormente resolver su estructura tridimensional por difracción de rayos X. En este trabajo se construyó un modelo por homología de G0S2 de humano (hG0S2). Expresamos a hG0S2 como proteína de fusión con la proteína SUMO de *S. cerevisiae* en *E.coli*, mediante la construcción del vector de expresión pETSUMO. Se estandarizó el proceso de purificación de las proteínas SUMO-hG0S2 y hG0S2, por cromatografías de afinidad, intercambio iónico y exclusión molecular, lo que permitió realizar los primeros ensayos de cristalización. Por último, se estandarizó una solución amortiguadora por la técnica de Themofluor, que permite preparaciones solubles y estables de la proteína, lo cual nos permitirá en un futuro obtener cristales y resolver la estructura terciaria experimental de la proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las enzimas de restricción y la DNA-ligasa T4 fueron compradas a New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). Antibióticos fueron de Gold Biotechnology Inc (St. Louis, MO, USA). Los amortiguadores MOPS y MES son productos de USB (Cleveland, USA). Los demás reactivos son de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Evaluación de la expresión de la proteína recombinante 6xHis-G0S2 de humano (hG0S2) en *E. coli*

El cDNA que codifica para hG0S2 fue optimizado para el uso de codones en *E. coli*, y se clonó en marco entre los sitios de restricción NdeI y HindIII del vector de expresión pET28-PPS, para así generar la construcción pET28-PPS/hG0S2i. El vector pET28-PPS, consiste en un pET28 estándar, en el cual el sitio de corte para trombina se sustituyó por el de la proteasa PreScission. Para evaluar la expresión de la proteína hG0S2, la cepa BL21 (DE3) de *E.coli* se transformó con la

construcción generada. Las células transformadas se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. El preinóculo (10 ml) se incubó a 37 °C toda la noche y se usó para inocular 0.1 L de medio LB con su respectivo antibiótico. La expresión de la proteína se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM cuando las células alcanzaron una densidad óptica (600 nm) entre 0.6-0.8. Después de la inducción, el cultivo celular se incubó a 37 °C a 180 rpm por 4 h. Las células se recolectaron por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Se tomó una muestra de las células antes y después de la inducción y la expresión de la proteína se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 17%.

Evaluación de la expresión de la proteína de fusión GST-hG0S2

El cDNA de hG0S2 se amplificó por PCR a partir de la construcción pET28-PPS/hG0S2i utilizando la DNA-polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y los oligonucleótidos: Forward 5'CGCGGATCCATGGAAACGGTCCAGGAGCTG y Reverse 5'CCGCTCGAGGAATTCTTAGGAGGCGTGCTGACGGTTG. El producto de PCR se purificó, cortó con las enzimas BamHI y EcoRI y se clonó en marco en el vector pGEX-6P utilizando la DNA-ligasa T4, para generar la construcción pGEX-6P/hG0S2. La cepa BL21 (DE3) de *E.coli* se transformó con esta construcción y se evaluó la expresión como se mencionó anteriormente.

Análisis del cDNA de G0S2 de humano y de ratón

La plataforma en línea (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis) se utilizó para analizar el contenido de GCs de las secuencias nucleotídicas de los cDNA de hG0S2 (utilizada para generar las construcciones pET28-PPS/hG0S2i y pGEX-6P/hG0S2) y de G0S2 de ratón (mG0S2). Ambas secuencias se optimizaron para el uso de codones de *E. coli* y para el porcentaje de GC. Los cDNA se sintetizaron de novo por la empresa Integrated DNA Technologies, IDT. Los cDNA se amplificaron por PCR utilizando la DNA-polimerasa Phusion HF (New England Biolabs, Ipswich, MA) y los

oligonucleótidos: Forward
5' GGAATTCCATATGGAAACCGTTCAGGAACTGATCCC y Reverse
5' CGCGGATCCAAGCTTCTATTAAGACGCGTGCTGACGG para hG0S2; Forward
5' GGAATTCCATATGGAATCTGTCCAGGAGCTG y Reverse
5' CGCGGATCCAAGCTTCTATTAAGAGGCGTGTTGGCG para mG0S2. Los productos de PCR se purificaron, digirieron con las enzimas NdeI y HindIII y se clonaron en marco en pET28-PPS utilizando la DNA-ligasa T4, para generar las construcciones pET28-PPS/hG0S2gc y pET28-PPS/mG0S2gc y se evaluó la expresión de cada proteína como se describió previamente.

Construcción de un vector de expresión (pETSUMO)

Se utilizó el cDNA de la proteína SUMO de *S. cerevisiae* que se tiene reportado han utilizado como proteína de fusión en sistemas de expresión en *E. coli*. Este cDNA se modificó para que la proteína SUMO tenga una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal y un sitio de corte para la proteasa PPS en el extremo C-terminal. El cDNA se sintetizó de novo por la empresa Integrated DNA Technologies, IDT. El cDNA se amplificó por PCR utilizando la Phusion HF DNA polimerasa y los oligonucleótidos: Forward 5' GGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATC y Reverse 5' CCAGTCATGCTAGCCATATGGGGCCCC. El producto de PCR se purificó, digirió con las enzimas NcoI y NdeI y se clonó en marco en pET28-PPS utilizando la T4 DNA ligasa, de esta manera se eliminó la antigua etiqueta de histidinas y se reemplazó por esta construcción, a este nuevo vector se le denominó pETSUMO. Se evaluó la expresión de la proteína SUMO como describió previamente.

Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión SUMO-hG0S2 y SUMO-mG0S2

Los cDNA de hG0S2 y mG0S2 se clonaron en marco entre los sitios NdeI y HindIII de pETSUMO para ensayar su expresión como proteínas de fusión en *E. coli*. A estas construcciones se les denominó pETSUMO/hG0S2 y pETSUMO/mG0S2. Para evaluar la expresión de la proteína de fusión SUMO-hG0S2, la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* se transformó con las construcciones

pETSUMO/hG0S2 y pETSUMO/mG0S2. Las células transformadas se crecieron en medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. El preinóculo (10 ml) se incubó a 37 °C toda la noche y se usó para inocular 0.1 L de medio LB con su respectivo antibiótico. La expresión de la proteína se indujo con IPTG 1 mM cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica (600 nm) entre 0.6-0.8. Después de la inducción, el cultivo celular se incubó a 28 °C y 180 rpm por 18 h. Las células se recolectaron por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C y se almacenaron a -20 °C. Muestras de células inducidas y sin inducir se analizaron por SDS-PAGE.

Evaluación de la solubilidad de la proteína de fusión SUMO-hG0S2

Las células se resuspendieron en amortiguador de lisis (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 8.0) y se lisaron por sonicación (30 ciclos a 50% amplitud con periodos 15s ON/45s OFF), el lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se tomó una muestra del sobrenadante y la pastilla y la solubilidad de la proteína se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Purificación de la proteína recombinante hG0S2

La pastilla celular de la expresión obtenida a partir de 1L de células BL21 (DE3) transformadas con la construcción pETSUMO/hG0S2, se resuspendió en amortiguador de lisis (ver sección anterior). Las células se lisaron por sonicación durante 30 ciclos a 50% amplitud con periodos 15s ON/45s OFF, y posteriormente el lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante del extracto celular se transfirió a una columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada con amortiguador de lisis. El lavado de la inyección se hizo con 3 volúmenes de columna (CV) con el amortiguador de lavado (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8.0), la elución se realizó con un gradiente escalonado de imidazol de 50, 250 y 500 mM preparado en el amortiguador de lavado. Las fracciones eluidas se colectaron y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las fracciones donde eluyó la proteína de fusión SUMO-hG0S2 se concentraron por microfiltración en un vivaspín 15 turbo con una membrana de retención de 10 kDa (Sartorius). La muestra se filtró

por una membrana de 0.22 μm y se inyectó en la columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) usando el equipo FPLC Akta. En total se realizaron 5 inyecciones de 500 μL de muestra, la separación de proteínas se realizó a un flujo de 0.8 mL/min con el amortiguador (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0) y un volumen de elución de 1.5 CV. Finalmente, se analizó el cromatograma de la purificación con el software UNICORN versión 5.31 y se analizaron las fracciones correspondientes a los picos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las fracciones correspondientes a la proteína eluída se mezclaron y se le adicionó 5 unidades de PPS por mililitro de muestra para llevar a cabo el corte de la proteína SUMO. La reacción se llevó a cabo a 4 °C toda la noche. La mezcla de proteína SUMO y hG0S2 obtenida después de la digestión se concentró por microfiltración en un vivaspin 15 turbo con una membrana de retención de 3 kDa (Sartorius), y se inyectó nuevamente en la columna Superdex 75. En total, se realizaron 5 inyecciones de 500 μL cada una, la separación de proteínas fue como se mencionó anteriormente. Se analizaron las fracciones correspondientes a los picos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las fracciones correspondientes a la proteína eluída se concentraron nuevamente, se desalaron con la columna PD-10 GE (Healthcare Life Sciences) en el amortiguador 50 mM HEPES, pH 7.0). La muestra (5 mL) se inyectó a una columna HiTrap SP HP (GE Healthcare Life Sciences) usando el equipo FPLC Akta. Se colectó la fracción no unida a la columna, y la elución se llevo a cabo con un gradiente lineal con el amortiguador (50 mM Hepes, 1M NaCl, pH 7.0) en 20 CV. Se recolectaron fracciones de 3 mL con un flujo constante de 2 mL/min. La fracción no unida y las fracciones eluídas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Análisis por western blot

Las muestras de interés se corrieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en un sistema semi-seco (Thermo Fisher). La membrana se incubó 2 h con el anticuerpo primario monoclonal 6X-His Epitope Tag de raton (Thermo Fisher) a una dilución 1:3000. Posteriormente, la membrana fue lavada, y se incubó con el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón conjugado con la fosfatasa alcalina

(abcam) a una dilución 1:5000. Las bandas se visualizaron utilizando el kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Bio-Rad).

Ensayos de cristalización

Las proteínas SUMO-hG0S2 y hG0S2 se concentraron con membranas de ultrafiltración Amicon Ultra-0.5 (Millipore) a 10,000 x g. La concentración alcanzada fue de 10 y 5 mg/mL respectivamente, en un volumen de 100 μ L, con la cual se montaron gotas 1:1 proteína:precipitante usando la técnica de difusión de vapor en gota sentada con placas de 96 pozos. El volumen de la gota de cristalización fue de 2 μ L, mientras que el volumen en el pozo del precipitante fue de 50 μ L. Se exploraron 98 condiciones de cristalización, las cuales corresponden a los kits de cristalización Crystal Screen y Crystal Screen 2 de Hampton Research. Las placas se incubaron a una temperatura de 16 °C y se observaron periódicamente con un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168)

Fluorimetría Diferencial de Barrido (DSF)

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron con la técnica Fluorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Fluorimetry) también conocida como “ensayo de desplazamiento térmico” (Thermal Shift Assay) ó Thermofluor. El experimento se realizó en una placa de PCR de 96 pozos y se utilizó el termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems). En un volumen de reacción final de 40 μ L, la proteína hG0S2, a una concentración final de 0.5 mg/mL, fue incubada en presencia de SYPRO ORANGE (Invitrogen) a una concentración final de 5X (tomada de una solución stock 5000X especificada por el fabricante) y con las condiciones a evaluar. La reacción se realizó en 70 ciclos de 120 s cada uno, con una temperatura inicial de 15 °C y un incremento de un 1 °C por ciclo. La fluorescencia emitida fue capturada en cada ciclo y fue graficada en Excel. Para obtener la T_m , los datos de la curva fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann con el complemento Solver de Excel. Las condiciones evaluadas fueron diferentes amortiguadores, pH y aditivos que se muestran en la tabla 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis y optimización de las construcciones de G0S2

G0S2 se ha expresado en *E. coli* como proteína de fusión empleando la proteína de unión a maltosa^{9,15} y el factor desencadenante¹ para la isoforma murina, y las proteínas glutatión S transferasa (GST)¹⁶ y SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)^{14,17} para la isoforma humana. Hasta el momento no se tiene reportado la expresión de G0S2 en los sistemas de expresión pET28, para obtener a G0S2 como a una proteína con una etiqueta de histidinas fusionada a su extremo N-terminal. Para este trabajo, se decidió evaluar la expresión de G0S2 en *E. coli* utilizando el sistema pET28. El cDNA de G0S2 de humano (hG0S2) fue analizado con el servidor RaCC, que es un servidor que analiza la presencia de codones poco frecuentes para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (nihserver.mbi.ucla.edu/RACC). La secuencia presenta los codones AGA, CGA y CCC, lo que disminuye la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*. La estrategia que seguimos para expresar a G0S2 como proteína recombinante fue la siguiente: Se optimizó el cDNA para su expresión en *E. coli*, y se clonó en el vector pET28-PPS (Tabla I). Sin embargo las primeras pruebas de expresión mostraron resultados negativos. Ya que al evaluar su expresión por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 1a), no se detectó una banda diferencial que correspondiera al tamaño esperado de la construcción (13kDa), a pesar de haber evaluado diferentes temperaturas de expresión. Los problemas típicos con las proteínas difíciles de expresar incluyen: rendimientos bajos o nulos de expresión, proteína insoluble, dificultades de purificación, la degradación de la proteína expresada, y el plegamiento incorrecto. Algunos avances en la mejora de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* incluyen el desarrollo de promotores fuertes¹⁸, coexpresión con chaperonas¹⁹, y la más influyente de todos, las etiquetas de fusión.^{20,21} Al tener la dificultad de detectar la expresión de G0S2 y con el antecedente de que se ha reportado el uso de proteínas de fusión para expresar a G0S2 en *E. coli*. Se pensó que debido a su pequeño tamaño (103 residuos de aminoácidos), podría ser un inconveniente para su expresión en

E.coli. En el laboratorio se cuenta con el vector de expresión pGEX-6P, el cual expresa la proteína glutatión S transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, por lo tanto se decidió clonar el cDNA de hG0S2 entre los sitios EcoRI y BamHI de pGEX-6P, para expresar la proteína de fusión GST-hG0S2. Al evaluar su expresión por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 1b) no se detectó una banda diferencial correspondiente a la construcción pGEX-6P/hG0S2 (36kDa), contrario a la banda diferencial correspondiente a la expresión control de GST (26kDa).

Tabla 1. Construcciones generadas y utilizadas en este trabajo.

Construcción	Vector	No. de Nucleótidos	No. de Aminoácidos	Resistencia
pET28-PPS/hG0S2i	pET28-PPS	309	103	Kanamicina
pGEX-6P/hG0S2	pGEX-6P	993	331	Ampicilina
pET28-PPS/hG0S2gc	pET28-PPS	309	103	Kanamicina
pET28-PPS/mG0S2gc	pET28-PPS	309	103	Kanamicina
pETSUMO	pET28-PPS	501	166	Kanamicina
pETSUMO/hG0S2	pETSUMO	687	228	Kanamicina
pETSUMO/mG0S2	pETSUMO	687	228	Kanamicina

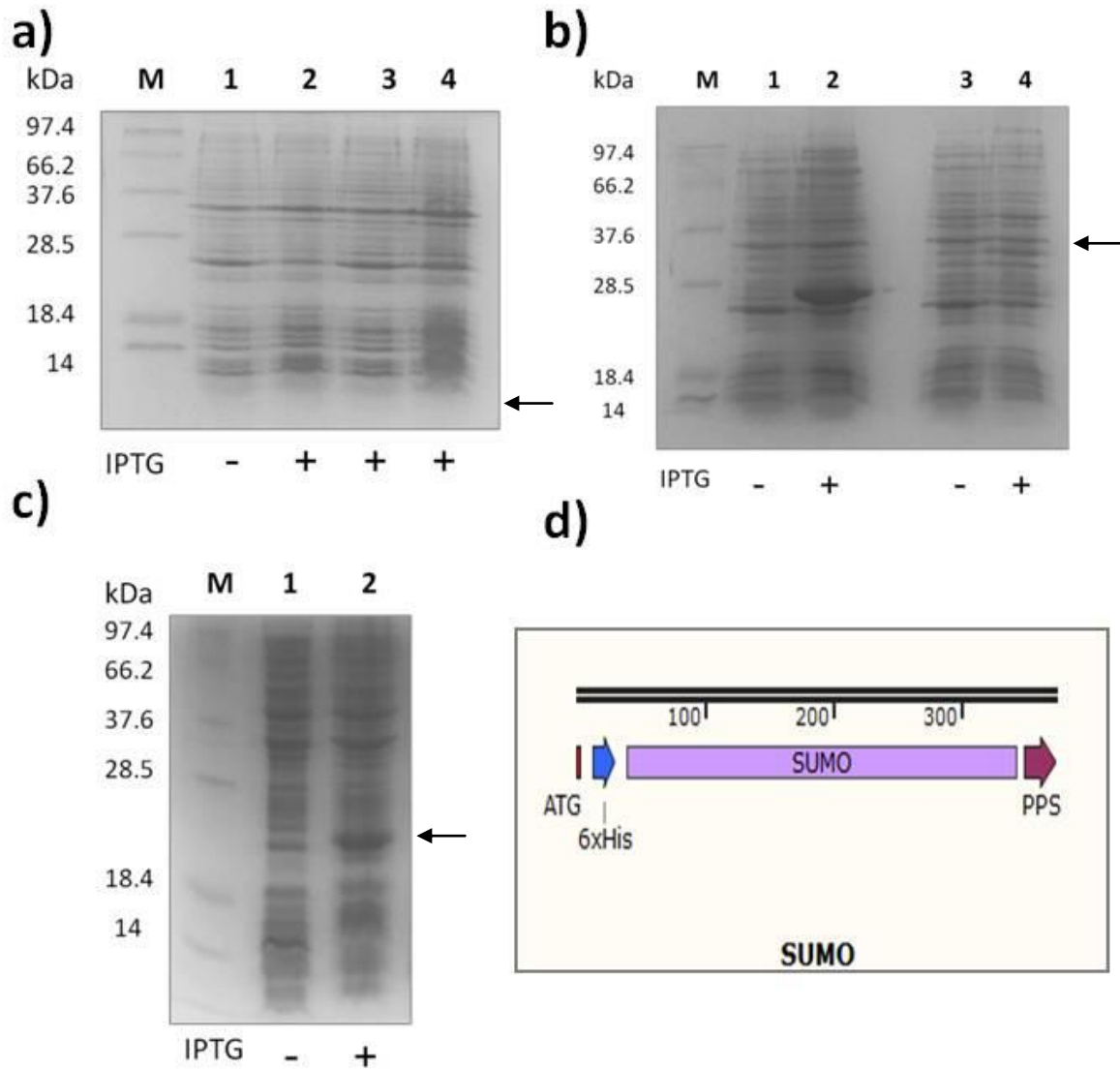


Figura 1. Expresión de las construcciones pET28-PPS/G0S2i, pGEX-6P/hG0S2 y pETSUMO en *E coli* BI21 (DE3). a) Gel SDS-PAGE de la expresión de hG0S2 con el sistema pET28, donde M: marcador de peso molecular; 1 tiempo antes; 2, 3 y 4 tiempo después de inducir la expresión a la temperatura de 37, 28 y 18 °C respectivamente. b) Gel SDS-PAGE de la expresión de hG0S2 con el sistema pGEX-6P. 1 y 2: tiempo antes y después de inducir la expresión control de GST; 3 y 4: tiempo antes y después de inducir la expresión de GST-hG0S2. c) Gel SDS-PAGE de la expresión de SUMO; 1 y 2: tiempo antes y después de inducir la

expresión. Las flechas señalan el peso molecular esperado de las proteínas. d) Esquema del cDNA de SUMO para la construcción de pETSUMO.

Al no detectarse la proteína de fusión, nos indicaba que la secuencia de cDNA de hG0S2 clonada, estaba impidiendo la traducción y hasta tal vez la transcripción de la proteína GST. Se decidió inducir la expresión de la proteína de fusión a 28 °C, y se evaluó su expresión por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura suplementaria 1), en esta ocasión si se logró visualizar la expresión de la proteína de fusión pero únicamente la parte de GST. La tecnología de proteínas de fusión puede facilitar la purificación, aumentar la expresión de la proteína y la solubilidad, su plegamiento apropiado, y reducir la degradación de la proteína. Sin embargo, la expresión de proteínas sigue siendo una tarea ardua que implica un árbol de decisiones complejo. Ya sea usar o no la tecnología de proteínas de fusión, es simplemente una opción. Otros factores incluyen el sistema de expresión²², la cepa utilizada²³, la estabilidad del mRNA²⁴, y el uso de codones²⁵. La complejidad se ve agravada por la diversidad de proteínas. Por lo tanto, el establecimiento de herramientas y condiciones óptimas para cada proteína sigue siendo un ejercicio empírico. Se decidió volver a analizar la secuencia nucleotídica del cDNA de hG0S2 para optimizarla y poder expresar la proteína en *E. coli*. Se analizó el contenido de GCs con el servidor (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis) arrojando resultados que nos indicaban que debido a una región con un alto contenido de GC en la mitad de la secuencia (Figura Suplementaria 2a), era muy probable que estuviera afectando la eficiencia de la transcripción o la traducción por la formación de estructuras secundarias del mRNA, por lo que se modificó manualmente el contenido GCs de esa región (Figura Suplementaria 2b), ya que el servidor indica que el rango de porcentaje ideal de contenido de GC es de entre 30 a 70%. Cualquier pico fuera de este rango afectaría negativamente la eficiencia transcripcional y traduccional. También se optimizó manualmente el cDNA para el uso de codones en *E. coli*. Se realizó el mismo procedimiento para el cDNA de G0S2 de ratón (mG0S2). Se sintetizaron los cDNA de novo con la empresa Integrated DNA Technologies, IDT. Se clonaron los cDNAs en el vector pET28 y la expresión se evaluó por electroforesis en geles

de poliacrilamida (Figura Suplementaria 2 c y f) y no se detectó ninguna banda diferencial.

Dado que otros grupos han expresado G0S2 en *E.coli* como proteína de fusión con SUMO^{14,17} (Small Ubiquitin-like Modifier) de *S. cerevisiae*, se decidió construir un vector de expresión utilizando como base el vector pET28. El cDNA de SUMO, modificado para incluir una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal y un sitio de corte para la proteasa PreScission Protease (PPS) en el extremo C-terminal (Figura 1d), se clonó entre los sitios NcoI y NdeI sustituyendo la etiqueta de histidinas. El nuevo vector, pETSUMO, expresa la proteína clonada como una banda de ~26kDa (Figura 1c), a pesar que esta construcción tiene un peso de 18kDa. Este comportamiento ya ha sido descrito en trabajos previos.²⁶

SUMO es la proteína Smt3 de *Saccharomyces cerevisiae* que es un homólogo de 11 kDa de la proteína SUMO-1 de mamíferos. Por lo anterior Smt3 se hace referencia como SUMO, es un miembro de una familia de proteínas de tipo ubiquitina, que regula varios procesos celulares, incluyendo la apoptosis, el transporte nuclear, y la progresión del ciclo celular. SUMO se une covalentemente a las cadenas laterales de lisina de las proteínas blanco. Sin embargo, a diferencia de ubiquitinación, la modificación por SUMO conduce a cambios en la función y actividad de la proteína, en lugar de su degradación. Estudios han demostrado que la fusión de una proteína heteróloga a Sumo puede conducir a un aumento de los niveles de expresión, así como mejorar la solubilidad de la proteína recombinante.^{26,27}

Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína de fusión SUMO-hG0S2

Los cDNA de hG0S2 y mG0S2 se clonaron entre los sitios NdeI y HindIII de pETSUMO para ensayar su expresión como proteínas de fusión en *E.coli*. A estas construcciones se les denominó pETSUMO/hG0S2 y pETSUMO/mG0S2. Estas proteínas fueron expresadas en células BI21 (DE3) en medio LB inducidas con IPTG a una concentración final de 1mM e incubadas a 28 °C por 18 h. Se tomó

una muestra antes y después de inducir y se evaluó la expresión de la proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 2a). En la figura 2a se puede observar en el carril 6 una banda diferencial con un peso de 24kDa correspondiente a la proteína de fusión SUMO-hG0S2, la cual fue confirmada por western blot (Figura 3a), de la misma manera en el carril 4 se observa una banda diferencial que corresponde a SUMO-mG0S2.

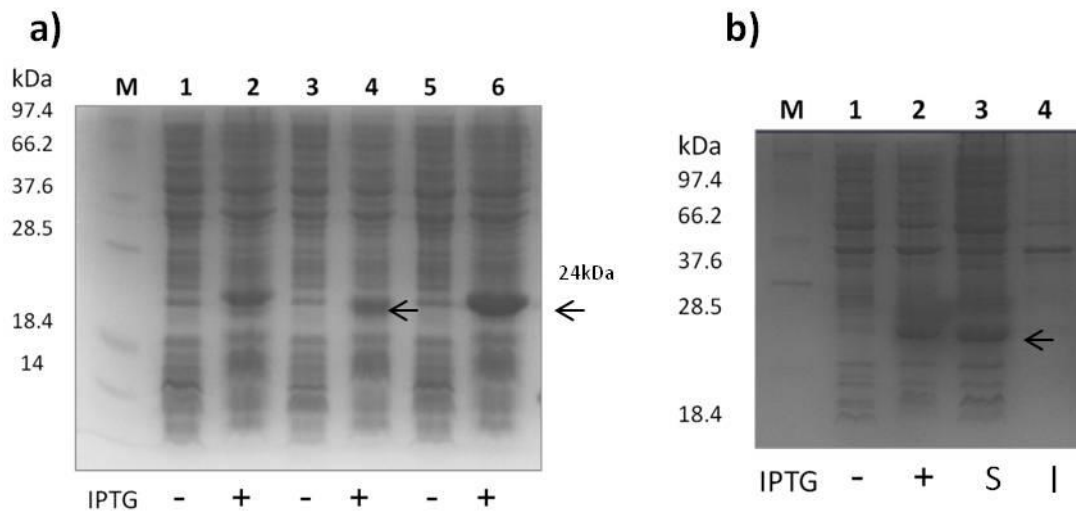


Figura 2. Expresión y solubilidad de SUMO-hG0S2. a) Gel SDS-PAGE de la expresión de SUMO-hG0S2 y SUMO-mG0S2, donde M: marcador; 1 y 2: tiempo antes y después de inducir la expresión control de SUMO; 3 y 4: tiempo antes y después de inducir la expresión de SUMO-mG0S2; 5 y 6: antes y después de inducir la expresión de SUMO-hG0S2. Las flechas señalan a las proteínas de fusión. b) Gel SDS-PAGE para evaluar la solubilidad de SUMO-hG0S2; 1 y 2: tiempo antes y después de inducir la expresión de SUMO-hG0S2; 3 y 4: fracción soluble e insoluble del lisado celular respectivamente. La flecha señala a la proteína SUMO-hG0S2 en la fracción soluble.

En el carril numero 2 se observa la banda diferencial correspondiente a la expresión control de la proteína SUMO. Una vez que se corroboró la expresión de las proteínas de fusión, se decidió evaluar la solubilidad de SUMO-hG0S2. La

solubilidad de la proteína se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 2b). Donde el carril 3 corresponde a la fracción soluble del lisado celular, donde se puede observar la banda correspondiente a la proteína de interés. Corroborando que la proteína es soluble, se decidió evaluar si la proteasa PPS es capaz de digerir la proteína de fusión, para purificar únicamente a hG0S2. En la figura 3b se muestra el gel de poliacrilamida y el western blot de la digestión de la proteína de fusión con PPS, donde el carril numero 1 se muestra el control de la proteína sin digerir y en el carril numero 2 se muestra la digestión con PPS, donde se puede apreciar el cambio de peso de la proteína digerida y la banda correspondiente a hG0S2 (10 kDa).

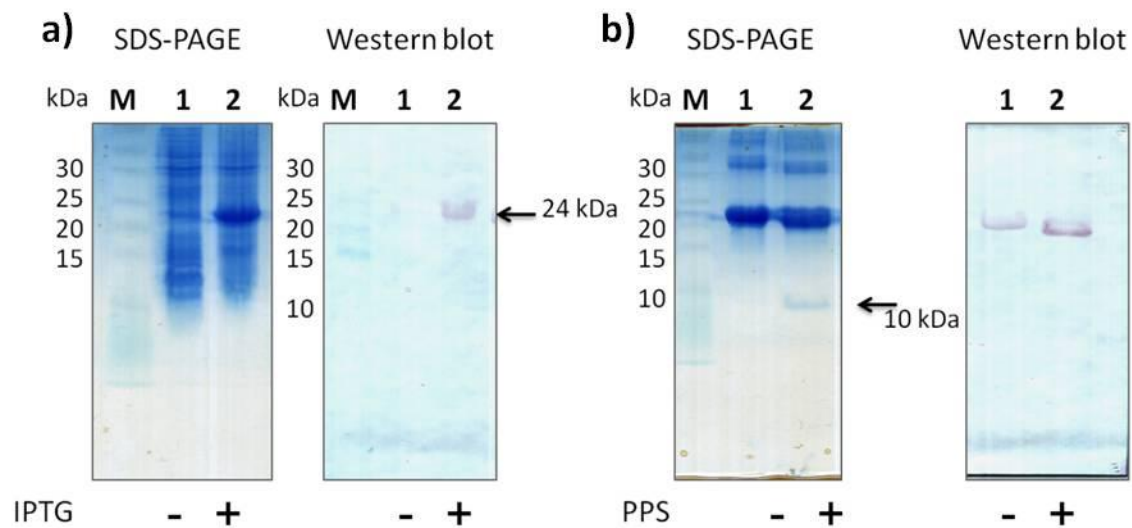


Figura 3. Análisis de corte con PPS de la proteína de fusión SUMO-hG0S2. a) SDS-PAGE y western blot de la expresión de SUMO-hG0S2, donde M: marcador de peso molecular; 1 y 2: tiempo antes y después de inducir la expresión. La flecha señala a la proteína de fusión. b) SDS-PAGE y western blot del corte de la proteína de fusión; 1 y 2 muestra antes y después de cortar. La flecha señala a la proteína hG0S2.

Corroborando que la proteína SUMO-hG0S2 se expresa y es soluble, y que se obtiene a hG0S2 con digerir con PPS se decidió escalar la producción de la proteína e iniciar el proceso de purificación.

Purificación de la proteína recombinante hG0S2

La cristalización de proteínas demanda muestras con altas concentraciones y alto grado de pureza. Iniciamos el proceso de purificación de SUMO-hG0S2 con la cromatografía de afinidad a Níquel. Esta proteína de fusión contiene una etiqueta de histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal de SUMO que se une eficientemente a la columna de Agarosa Ní-NTA y nos permite eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes en una primera etapa (Figura 4a). Se realizaron lavados y se eluyó la proteína mediante un gradiente creciente de imidazol. Las fracciones eluidas fueron colectadas y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 4a), la proteína eluye desde una concentración de 50mM de imidazol, sin embargo, la mayor concentración de proteína eluye en la primera fracción de 250 mM de imidazol.

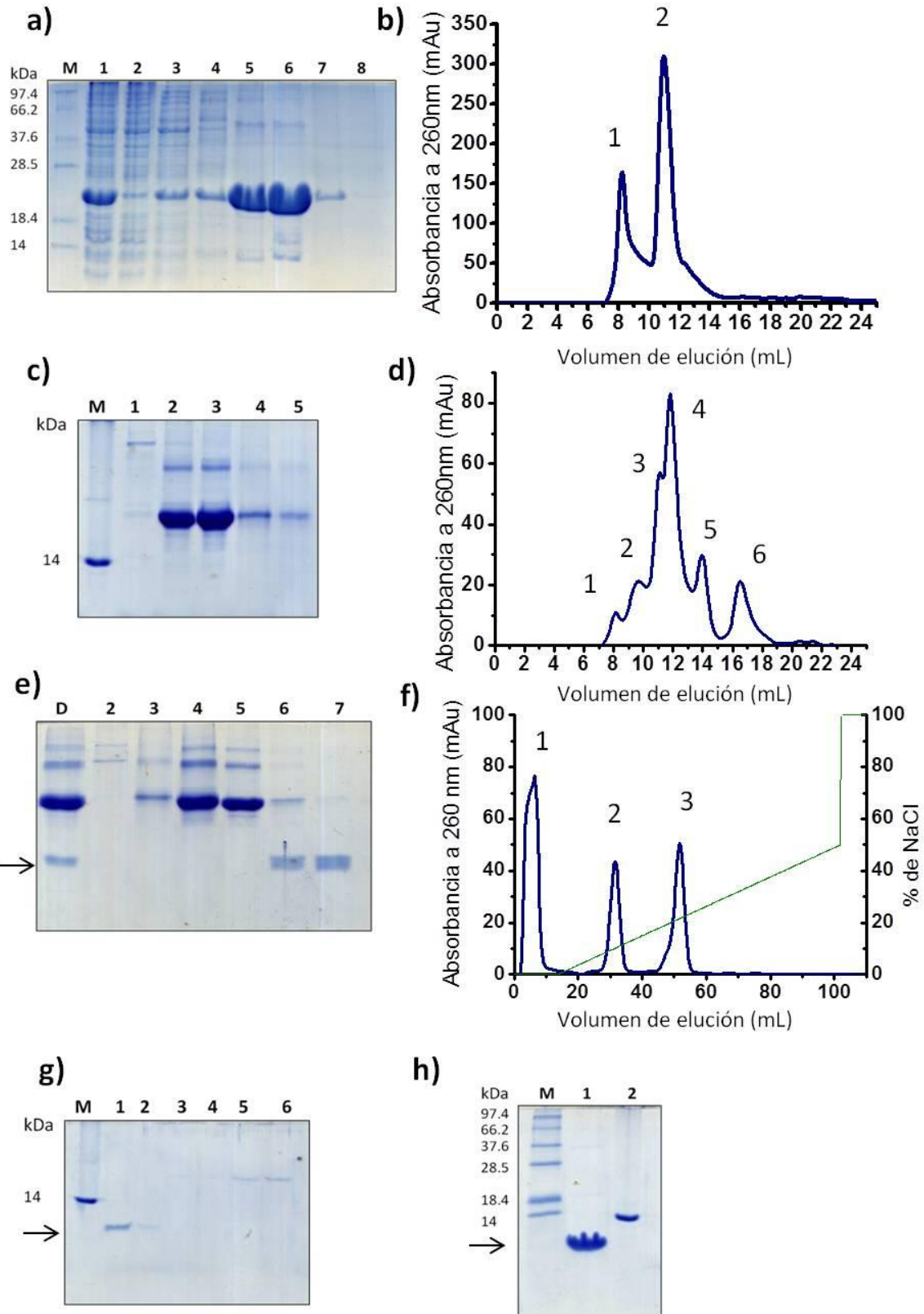


Figura 4. Purificación de hG0S2. a) SDS-PAGE de la purificación de SUMO-hG0S2 por cromatografía de afinidad a Níquel, donde M: marcador; 1: extracto celular; 2: proteína eluída (no unida); 3 y 4: proteína eluída con 10 mM de imidazol (2 lavados); 5: elución con 50 mM de imidazol; 6 y 7: elución con 250 mM de imidazol (2 lavados); 8: elución con 500mM de imidazol. b) Cromatograma de la purificación de SUMO-hG0S2 por exclusión molecular. La proteína eluye en el pico 2. c) Gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la exclusión molecular (inciso b), 1: pico 1; 2-5: pico 2 del cromatograma. d) Cromatograma de la purificación de SUMO-hG0S2 cortado con PPS por exclusión molecular. La proteína eluye en el pico 5. e) Gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la segunda exclusión molecular (inciso d), donde D: muestra de digestión inyectada; 2: pico 2; 3: pico 3; 4 y 5 pico 4; 6 y 7: pico 5 del cromatograma. f) Cromatograma de la purificación de hG0S2 por intercambio catiónico. La proteína eluye en el pico 1. g) Gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del intercambio catiónico (inciso f), 1 y 2: pico 1; 3 y 4: pico 2; 5 y 6: pico 3. h) Gel SDS-PAGE de hG0S2 utilizado para cristalización, 1: muestra de hG0S2; 2: marcador de lisozima (14 kDa). Las flechas señalan a la proteína hG0S2.

Se concentraron las fracciones por microfiltración (punto de corte de 10kDa). La muestra fue filtrada por una membrana de 0.22 μ m, para ser purificada por exclusión molecular. La muestra se inyectó en la columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) usando el quipo FPLC Akta. Se analizó el cromatograma de la purificación (Figura 4b) con el software UNICORN versión 5.31. El cromatograma nos dio como resultado 2 picos. Las fracciones correspondientes a los picos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 4c) en donde el carril uno corresponde al primer pico del cromatograma y los carriles restantes corresponden al segundo pico. El primer pico eluye a los 8 ml que corresponde a proteínas contaminantes y el segundo pico eluye a partir de los 11 ml que corresponde al dímero de la proteína de fusión SUMO-hG0S2 (Figura 4b). Las fracciones correspondientes a la proteína eluída se mezclaron y se le adicionó 5 unidades de PPS por mililitro de muestra para llevar a

cabo el corte de la proteína SUMO. La reacción se llevó a cabo a 4 °C toda la noche. La mezcla de proteína SUMO y hG0S2 obtenida después de la digestión, fue concentrada por microfiltración (punto de corte 3kDa). Se purificó nuevamente por exclusión molecular para separar a hG0S2 de la muestra. El cromatograma nos dio como resultado 6 picos, las fracciones correspondientes a los picos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 4e), el carril D corresponde a la muestra de digestión que se inyectó a la columna donde se aprecia a G0S2, el carril 2 corresponde al segundo pico, el carril 3 al tercer pico, los carriles 4 y 5 al cuarto pico, los carriles 6 y 7 al quinto pico. Los primeros dos picos que eluyen a 8 y 9.5 ml corresponden a proteínas contaminantes, el tercer pico que eluye a 11 ml corresponde a la proteína de fusión SUMO-G0S2 no cortada, el cuarto pico que eluye a los 12 ml corresponde a la proteína SUMO, y el quinto pico que eluye a los 14 ml corresponde a hG0S2 acompañada de un poco de SUMO. Para tener a hG0S2 en un mayor grado de pureza, se realizó un paso más de purificación, que consistió en un intercambio catiónico. Para esto se concentraron las fracciones correspondientes a la elución de hG0S2, y se desalaron con la columna PD-10 GE (Healthcare Life Sciences) con el objetivo de tener a la proteína en un buffer sin sal. La muestra se inyectó a una columna HiTrap SP HP (GE Healthcare Life Sciences) usando el quipo FPLC Akta. Se colectó la fracción no unida a la columna que corresponde al primer pico del cromatograma (Figura 4f), esta fracción consiste de hG0S2, y las fracciones correspondientes al segundo y tercer pico consisten de SUMO y que eluyeron a una porcentaje 14 y 24% de concentración de NaCl respectivamente. Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 4g) donde los carriles 1 y 2 corresponden a la fracción no unida (pico 1) donde se encuentra hG0S2, los carriles 3 y 4 corresponde al segundo pico, los carriles 5 y 6 corresponden al tercer pico, donde se encuentra SUMO. Por último se evaluó el grado de pureza de la proteína utilizada para los ensayos de cristalización por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 4h).

Purificación de SUMO-hG0S2

Para lograr tener una mayor concentración de proteína para los ensayos de cristalización de hG0S2 se decidió purificar la proteína de fusión SUMO-hG0S2. Se procesaron 1.5 L de cultivo de celular y se llevó a cabo el mismo procedimiento de purificación por cromatografía de afinidad a níquel y exclusión molecular ya mencionados, después se llevó a cabo un paso de purificación por intercambio catiónico de la misma manera antes mencionada, el cromatograma nos dio como resultado que una parte de la muestra de proteína no se une a la columna, y otra parte de la muestra si es retenida y eluye a las mismos porcentajes de concentración de NaCl antes mencionados (dato no mostrado). Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (dato no mostrado). Las fracciones se concentraron y se volvió a purificar por exclusión molecular (Figura 5a) para asegurarnos de solo utilizar una única población homogénea de proteína para los ensayos de cristalización. Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y por último se evaluó el grado de pureza de la proteína utilizada para los ensayos de cristalización (Figura 5b).

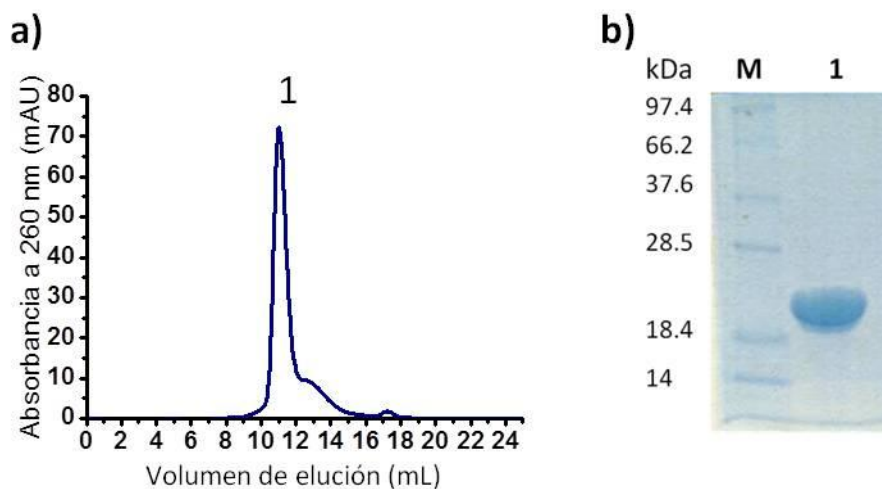


Figura 5. Purificación de SUMO-hG0S2. a) Cromatograma resultante del último paso de purificación de SUMO-hG0S2 por exclusión molecular usando la columna Superdex 75. La proteína eluye en un solo pico. b) Gel SDS-PAGE de SUMO-

hG0S2 utilizado para cristalización, donde M: marcador; 1: corresponde a la muestra de SUMO-hG0S2 utilizada para cristalización (10mg/ml).

Ensayos de cristalización

La purificación de las proteínas hG0S2 y SUMO-hG0S2 nos permitió realizar los primeros ensayos de cristalización. Logramos alcanzar una concentración de 5 y 10 mg/mL respectivamente en un volumen de 100 μ L, con la cual se montaron gotas 1:1 proteína:precipitante usando la técnica de difusión de vapor en gota sentada con placas de 96 pozos. El volumen de la gota de cristalización fue de 2 μ L. Se exploraron 98 condiciones de cristalización, las cuales corresponden a los kits de cristalización Crystal Screen y Crystal Screen 2 de Hampton Research. Las placas se incubaron a una temperatura de 16 °C y se observaron periódicamente con un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168). De las 98 condiciones que se exploraron en los ensayos de cristalización para la proteínas, no obtuvimos ningún cristal, sin embargo obtuvimos algunos pozos con precipitados (5 de 98 condiciones exploradas) para G0S2 y (30 de 98 condiciones exploradas) para SUMO-G0S2 esto nos indica que aún debemos ajustar las concentraciones de proteína y precipitante para obtener cristales.

Estabilidad térmica de hG0S2

La identificación de las condiciones iniciales de cristalización para moléculas biológicas se basa en gran parte a un proceso de ensayo y error, en el que un número de parámetros, tales como la composición de la solución de cristalización o la temperatura de incubación, son explorados a través de experimentos de escrutinio.²⁸ Esta tarea ha avanzado notablemente con la introducción de métodos de escrutinio automatizados de alto rendimiento. Estas técnicas no sólo aceleran el proceso de cristalización, sino también aumentan la probabilidad de éxito, ya que permiten la detección de un mayor número de condiciones diferentes.²⁹ Hoy en día, se dedica una cantidad sustancial de trabajo a la caracterización de las muestra y a experimentos de control de calidad en muchos proyectos de cristalización, con el objetivo de identificar en una etapa temprana y dando

prioridad a aquellas muestras que serían más probable de cristalizar.³⁰ Este enfoque supone que muestras que son estables y monodispersas y que no tienen regiones desplegadas, muestran una mayor tendencia a cristalizar³¹ y típicamente implican experimentos tales como filtración en gel, espectrometría de masas, dispersión dinámica de luz, ultracentrifugación y resonancia magnética nuclear. Nordland y colaboradores (2006) describieron un método para buscar componentes del amortiguador y pequeñas moléculas que aumenten la estabilidad térmica de la muestra.³² Ellos encontraron que los aditivos que aumentan la temperatura de desnaturalización aparente (T_m) de la muestra, también produjo un aumento en el número de éxitos de cristalización, mientras que los componentes del amortiguador que produjeron una disminución de la T_m condujo a una disminución en el número de éxitos cristalización. El ensayo de Thermofluor³³ se basa en el uso de una sonda fluorescente sensible, es decir, un fluoróforo con bajos rendimientos cuánticos en agua, pero que es altamente fluorescente en disolventes orgánicos. Este fluoróforo se añade a una solución de proteína, que después se somete escalonadamente a temperaturas crecientes. A medida que la proteína se desnaturaliza, su núcleo hidrófobo es expuesto y el fluoróforo interacciona en éste, produciendo un aumento de la fluorescencia³³. De esta manera, el desplegamiento de la proteína se puede monitorear como una función de la temperatura a través del aumento de la señal de fluorescencia, la T_m se aproxima como el punto medio en la curva de desnaturalización de la proteína. Una variable fundamental es la concentración de proteína. En general, las proteínas más pequeñas que tienen menos área de superficie hidrófoba oculta tendrán una transición de fusión menos pronunciada, y pueden ser necesarias mayores concentraciones de proteína para aumentar la señal global. Sin embargo, depende de cada proteína y se debe determinar para cada caso en particular. En nuestro caso, las concentraciones de hGOS2 evaluadas fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1 mg/ml en el amortiguador (50mM Tris-HCl pH 8.0 150 mM NaCl) con una concentración de 5X de SYPRO ORANGE (Figura 6). Los resultados indican que con todas las concentraciones utilizadas la T_m aparente es de 30 °C (Figura 6).

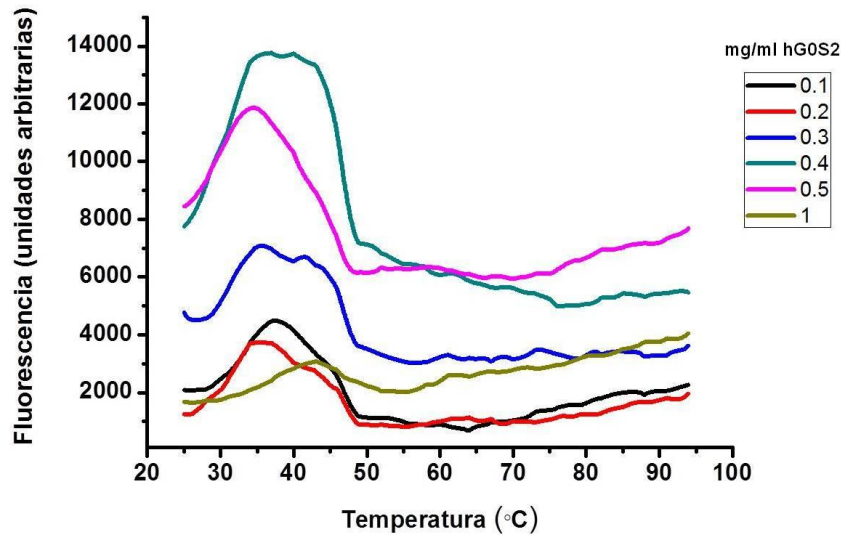


Figura 6. Ensayo de estabilidad térmica comparando distintas concentraciones de la proteína hG0S2. El ensayo se llevó a cabo con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1 mg/ml de proteína en el amortiguador 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 5X SYPRO ORANGE.

G0S2 al ser una proteína pequeña (103 a.a) muestra poca señal de fluorescencia al momento de su desnaturalización, aunque cabe mencionar que al tener una T_m de 30 °C, es muy poco termoestable, pero la señal que se observa en la grafica nos indica que si esta plegada, porque las curvas son sigmoideas, ya que si se presentara el caso de que no estuviera bien plegada (glóbulo fundido), tendríamos una alta señal de fluorescencia inicial y después un decaimiento.³⁴ También se observa que con las concentraciones de 0.4 y 0.5 mg/ml, se tiene una mayor señal y curvas con pendientes más definidas, por lo que se decidió utilizar una concentración de 0.5 mg/ml de proteína, para evaluar diferentes condiciones y aditivos (Tabla 2), que nos permitan estabilizar a la proteína y poder optimizar su purificación y caracterización.

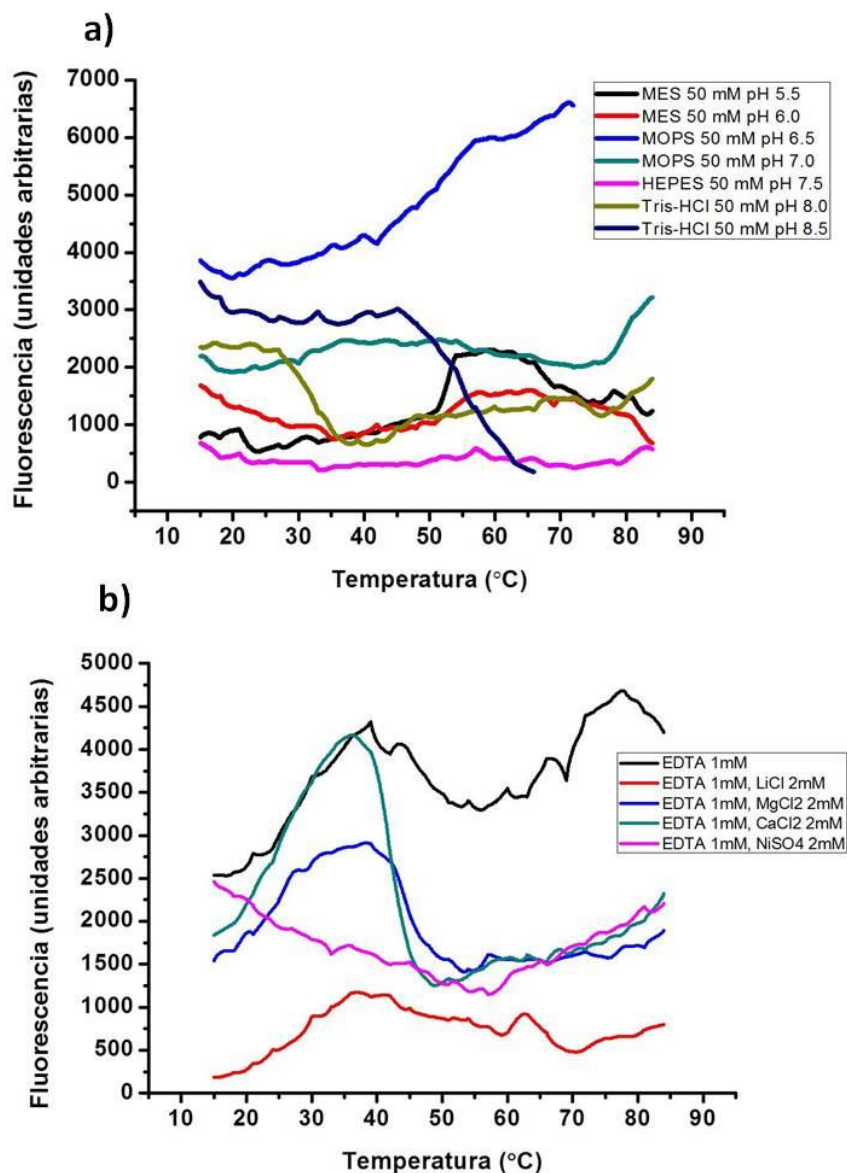


Figura 7. Efecto del pH y metales en la estabilidad térmica de la proteína hG0S2. a) Evaluación de la estabilidad térmica de hG0S2 en un rango de pH de 5.5 a 8.5. Los amortiguadores utilizados fueron: MOPS pH 5.5 y 6.0, MES pH 6.5 y 7.0, HEPES pH 7.5 y TRIS-HCl 8.0y 8.5. Las condiciones de reacción fueron 0.5mg/ml de proteína, 50 mM de amortiguador y 5X de SYPRO ORANGE. b) Evaluación de la estabilidad térmica de hG0S2 con diferentes metales. Los iones metálicos analizados fueron LiCl, MgCl₂, CaCl₂ y NiSO₄. Las condiciones de reacción fueron 0.5 mg/ml de proteína, 50 mM de amortiguador Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5X de SYPRO ORANGE, 1mM EDTA y 2mM del metal.

La primera condición evaluada fue el pH, en la que utilizamos diferentes amortiguadores en un rango de 5.5 a 8.5 (Figura 7a). La proteína hG0S2 es más estable a pH más ácidos, donde se encontró que a un pH de 6.5 el valor de la Tm es de 54.14 °C, y mientras el pH se vuelve más básico, la proteína pierde estructura ya que la señal de fluorescencia es la del glóbulo fundido (pH 8.0 y 8.5), este comportamiento se espera por la naturaleza básica de la proteína¹³, ya que el punto isoeléctrico de hG0S2 es de 9.

Se ha mostrado que los iones metálicos juegan un papel importante en la estabilización de proteínas por unirse a sitios específicos.³⁵ Los resultados para esta condición de metales nos sugieren que la proteína no requiere la presencia de iones metálicos para estabilizarse ya que en la presencia de EDTA (Figura 7b), el cual es un agente quelante, la TM de hG0S2 es de 28 °C, la cual es muy similar a la observada en ausencia de EDTA. En presencia de Mg²⁺ y Ca²⁺ la TM disminuye a 24.83 °C y 25.59 respectivamente (Figura 7b).

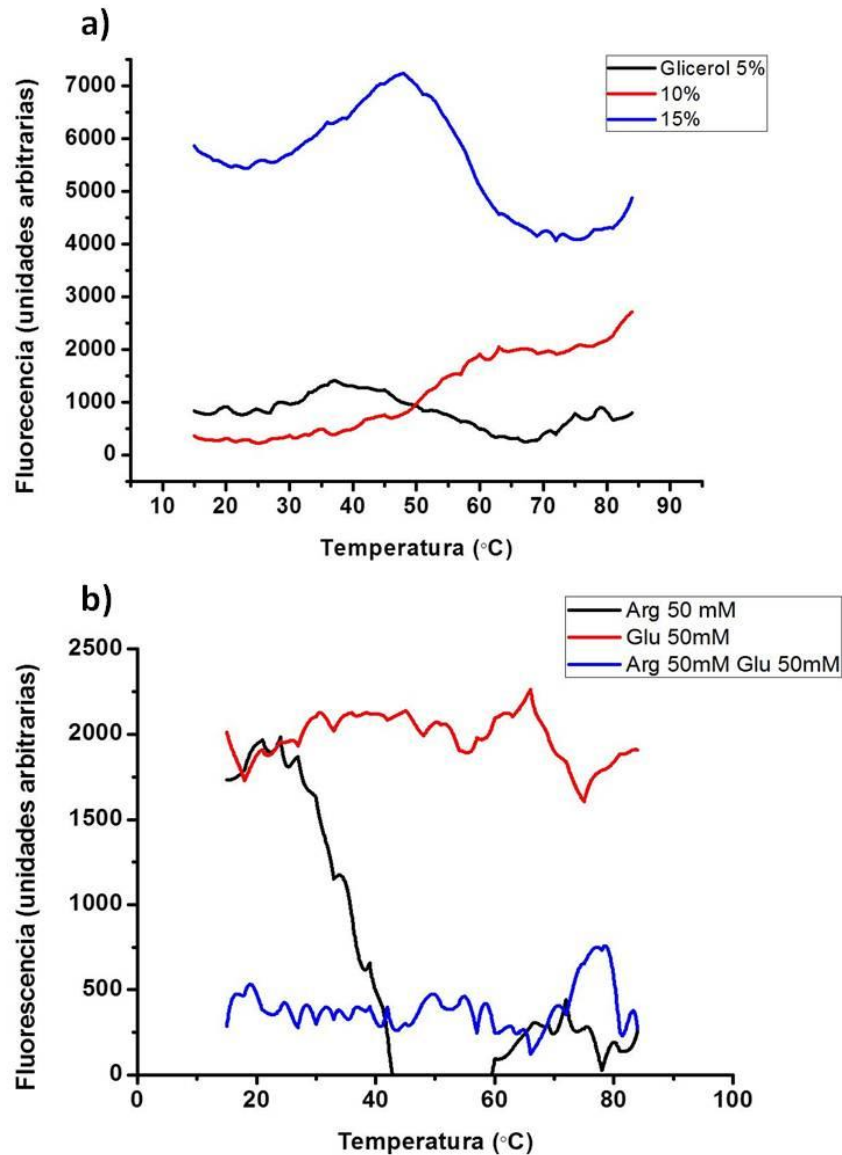


Figura 8. Efecto del glicerol y aminoácidos en la estabilidad térmica de la proteína hG0S2. a) Evaluación de la estabilidad térmica de hG0S2 con diferentes concentraciones de glicerol. Las concentraciones analizadas fueron 5, 10 y 15 %. b) Evaluación de la estabilidad térmica de hG0S2 con diferentes aminoácidos. Los aminoácidos analizados fueron arginina, ácido glutámico y una combinación de ambos. Las condiciones de reacción fueron 0.5 mg/ml de proteína, 50 mM de amortiguador Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5X de SYPRO ORANGE y las distintas concentraciones de glicerol o aminoácidos.

El glicerol ha sido empleado como agente estabilizador para la cristalización de proteínas, incluso proteínas de membrana.³⁶ En el experimento de Thermofluor se evaluaron 3 concentraciones de glicerol (Figura 8a), dando como resultado que la proteína hGOS2 en presencia de glicerol al 10% aumenta su estabilidad térmica, ya que su Tm incrementó en 20 °C. Este cambio en la estabilidad es mayor comparado con las otras concentraciones que se evaluaron.

Una combinación equimolar de los aminoácidos L-arginina y el ácido glutámico han sido previamente sugeridos³⁷ como una forma de incrementar el límite de solubilidad y la estabilidad a largo plazo de proteínas propensas a la agregación. Desde entonces, el método ha sido ampliamente adoptado en estudios estructurales y funcionales de proteínas.³⁸ Para el experimento de Thermofluor se utilizó por separado la L-arginina y el ácido glutámico a 50 mM y la combinación de estos a esa misma concentración (Figura 8b). Pero no se tuvo ningún efecto, debido tal vez a la naturaleza básica de la proteína.

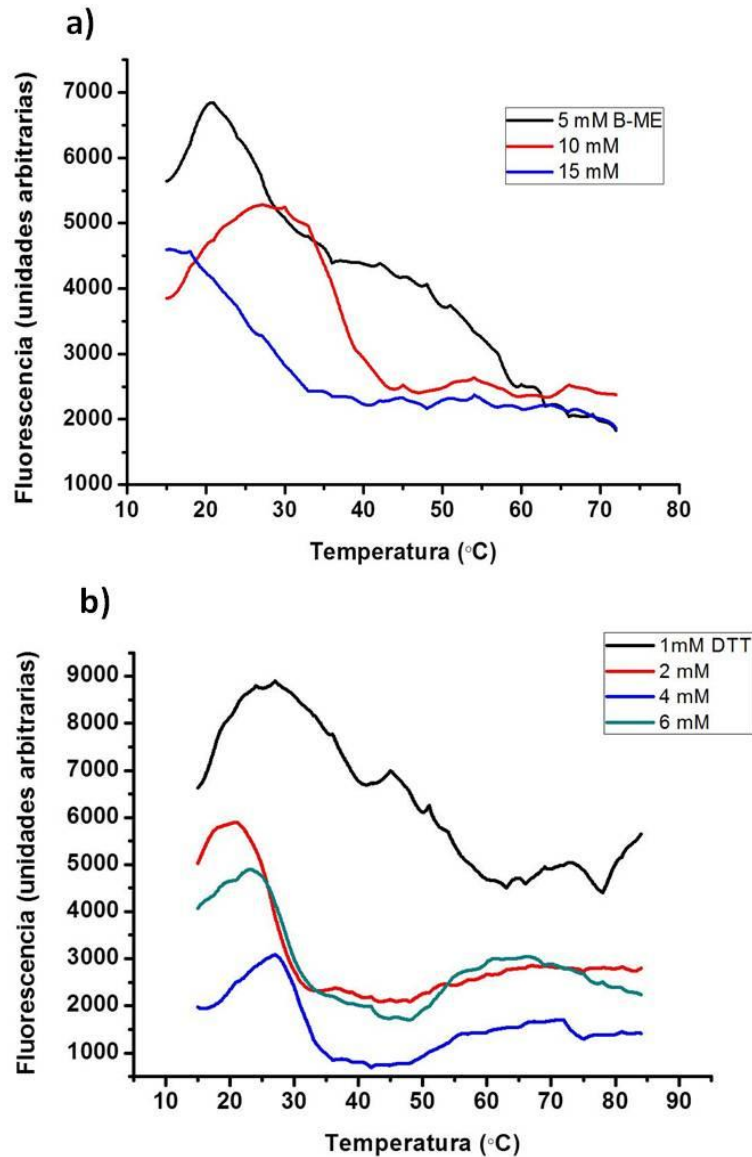


Figura 9. Efecto de agentes reductores en la estabilidad térmica de la proteína hGOS2. a) Evaluación de la estabilidad térmica de hGOS2 con diferentes concentraciones de B-ME. Las concentraciones analizadas fueron 5, 10 y 15 mM. b) Evaluación de la estabilidad térmica de hGOS2 con diferentes concentraciones de DTT. Las concentraciones analizadas fueron 1, 2, 4, y 6 mM. Las condiciones de reacción fueron 0.5mg/ml de proteína, 50 mM de amortiguador Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5X de SYPRO ORANGE y las diferentes concentraciones de B-ME o DTT.

Diversas investigaciones, sugieren la adición de altas concentraciones de agentes reductores para mantener un estado de reducción adecuado y prevenir la oxidación de las cisteínas presentes en las proteínas, que por consecuencia logran la desestabilización y agregación de estas.³⁹ Nosotros evaluamos los agentes reductores DTT y B-ME (Figura 9), pero no se tuvo ningún efecto positivo sobre la Tm.

Pretendemos extender este análisis para incluir otras condiciones como concentración de sal en los amortiguadores con pH ácido, entre otros, para obtener el amortiguador óptimo que permita estabilizar nuestra proteína. Hasta el momento, con los resultados de Thermofluor sabemos que la composición de nuestro amortiguador durante la purificación, debe incluir MOPS a pH 6.5 y glicerol al 10%.

Tabla 2. Tm de desnaturalización de hGOS2 en las diferentes condiciones evaluadas con el ensayo de estabilidad.

Condición	Compuesto	Concentración	pH	Tm, °C	Error matemático
pH	MES	50 mM	5.5	52.53	0.025
	MES	50 mM	6	53.22	0.019
	MOPS	50 mM	6.5	54.14	0.025
	MOPS	50 mM	7	31.43	0.069
	HEPES	50 mM	7.5	-	-
	Tris-HCl	50 mM	8	-	-
	Tris-HCl	50 mM	8.5	-	-
Metal	EDTA	1mM	8	27.95	0.006
	EDTA, LiCl	1mM, 2mM	8	27.85	0.14
	EDTA, MgCl2	1mM, 2mM	8	24.83	0.018
	EDTA, CaCl2	1mM, 2mM	8	25.59	0.012
	EDTA, NiSO4	1mM, 2mM	8	-	-
Estabilizador	Glicerol	5%	8	33.42	0.009
		10%	8	50.74	0.003
		15%	8	35.99	0.169
Aminoácidos	Arg	50 mM	8	-	-
	Glu	50 mM	8	-	-
	Arg, Glu	50mM, 50mM	8	-	-
Agente Reductor	DTT	1 mM	8	18.54	0.003
		2 mM	8	16.36	0.0005
		4 mM	8	21.26	0.004
		6 mM	8	18.71	0.0018
	B-ME	5 mM	8	18.04	0.0004
		10 mM	8	19.77	0.004
		15 mM	8	-	-

CONCLUSIÓN

En este trabajo se generaron distintas construcciones con el fin de expresar a hG0S2 en *E.coli*, el diseño consistió en clonar el cDNA de hG0S2 en distintos vectores de expresión (pET28 y pGEX), obteniendo resultados negativos, aun después de analizar y optimizar su cDNA. Por lo que se decidió diseñar y generar nuestro propio vector de expresión utilizando la proteína SUMO de *S. cerevisiae* y así expresar a hG0S2 como proteína de fusión. Se estandarizó el proceso de purificación de las proteínas SUMO-hG0S2 y hG0S2 donde se logró obtener concentraciones de 10 y 5 mg/ml respectivamente, lo que permitió realizar los primeros ensayos de cristalización, aunque después de optimizar el protocolo de purificación de hG0S2, se logró obtener una concentración de 15 mg/ml (ver Apéndice). Los resultados de Thermofluor en presencia de glicerol 10% y pH 6.5 sugieren que en estas condiciones hG0S2 presenta un comportamiento de proteína globular. Además el cambio de T_m en presencia de estos aditivos, nos indica que podrían ser favorables para la optimización de las condiciones de cristalización.

Autor de correspondencia:

* Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT. Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, 78216 San Luis, S.L.P. México. Correo electrónico: samuel.lara@ipicyt.edu.mx. Tel: +52(444) 8342000 ext 6239.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT CB-2011-01 No 168710 y por el proyecto CONACYT INFR-2013-01 No 204373.

Referencias

- (1) Cornaciu, I., Boeszoermenyi, A., Lindermuth, H., Nagy, H. M., Cerk, I. K., Ebner, C., Salzburger, B., Gruber, A., Schweiger, M., Zechner, R., Lass, A., Zimmermann, R., and Oberer, M. (2011) The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and GOS2, respectively. *PLoS One* 6.
- (2) Young, S.G., and Zechner, R. (2013). Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 27, 459–484.
- (3) Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383–1386.
- (4) Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., and Zechner, R. (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* 277, 4806–4815.
- (5) Karlsson, M., Contreras, J. A., Hellman, U., Tornqvist, H., and Holm, C. (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J. Biol. Chem.* 272, 27218–27223.
- (6) Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E. F., Klingenspor, M., Hoefler, G., and Zechner, R. (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734–7.
- (7) Fischer, J., Lefèvre, C., Morava, E., Mussini, J.-M., Laforêt, P., Negre-Salvayre, A., Lathrop, M., and Salvayre, R. (2007) The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat. Genet.* 39, 28–30.
- (8) Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 3, 309–319.
- (9) Yang, X., Lu, X., Lombard, M., Rha, G. B., Chi, Y. I., Guerin, T. M., Smart, E. J., and Liu, J. (2010) The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. *Cell Metab.* 11, 194–205.
- (10) Russell, L., and Forsdyke, D. R. (1991) A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated. *DNA Cell Biol.* 10, 581–591.
- (11) Welch, C., Santra, M. K., El-Assaad, W., Zhu, X., Huber, W. E., Keys, R. A., Teodoro, J. G., and Green, M. R. (2009) Identification of a protein, GOS2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2. *Cancer Res.* 69, 6782–6789.

- (12) Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., and Zechner, R. (2011) Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* 50, 14–27.
- (13) Heckmann, B.L., Zhang, X., Xie, X., and Liu, J. (2013). The G0/G1 switch gene 2 (G0S2): Regulating metabolism and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 276–281.
- (14) Schweiger, M., Paar, M., Eder, C., Brandis, J., Moser, E., Gorkiewicz, G., Grond, S., Radner, F. P., Cerk, I., Cornaciu, I., Oberer, M., Kersten, S., Zechner, R., Zimmermann, R., and Lass, A. (2012) G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *J. Lipid. Res.* 53, 2307–2317.
- (15) Kioka, H., Kato, H., Fujikawa, M., Tsukamoto, O., Suzuki, T., Imamura, H., Nakano, A., Higo, S., Yamazaki, S., Matsuzaki, T., Takafuji, K., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Shintani, Y., Yoshida, M., Noji, H., Kitakaze, M., Komuro, I., Asano, Y., and Takashima, S. (2014) Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 273–8.
- (16) Kobayashi, S., Ito, A., Okuzaki, D., Onda, H., Yabuta, N., Nagamori, L., Suzuki, K., Hashimoto, H., and Nojima, H. (2008) Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Res.* 15, 253–265.
- (17) Cerk, I. K., Salzburger, B., Boeszoermyeni, A., Heier, C., Pillip, C., Romauch, M., Schweiger, M., Cornaciu, I., Lass, A., Zimmermann, R., Zechner, R., and Oberer, M. (2014) A peptide derived from G0/G1 switch gene 2 acts as noncompetitive inhibitor of adipose triglyceride lipase. *J. Biol. Chem.* 289, 32559–32570.
- (18) Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60–89.
- (19) Ikura, K., Kokubu, T., Natsuka, S., Ichikawa, A., Adachi, M., Nishihara, K. (2002). Co-overexpression of folding modulators improves the solubility of the recombinant guinea pig liver transglutaminase in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2002; 32:189–205.
- (20) Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40.
- (21) Bedouelle, H., and Duplay, P. (1988) Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. *Eur. J. Biochem.* 171, 541–549.
- (22) Yin, J., Li, G., Ren, X., and Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* 127, 335–347.
- (23) Grodberg, J., and Dunn, J. J. (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170, 1245–1253.

- (24) Hatfield, G.W., and Roth, D.A. (2007). Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation EngineeringTM. *Biotechnol. Annu. Rev.* 13, 27–42.
- (25) Sharp, P. M., and Li, W. H. (1987) The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 15, 1281–1295.
- (26) Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D., and Butt, T. R. (2004) SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* 5, 75–86.
- (27) Zuo, X., Li, S., Hall, J., Mattern, M. R., Tran, H., Shoo, J., Tan, R., Weiss, S. R., and Butt, T. R. (2005) Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in escherichia coli. *J. Struct. Funct. Genomics* 6, 103–111.
- (28) McPherson, A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.* p 586.
- (29) Banci, L., Bertini, I., Cusack, S., De Jong, R. N., Heinemann, U., Jones, E. Y., Maskos, K., Kozielski, F., Owens, R., Perrakis, A., Siebold, C., Silman, I., Messerschmidt, A., Poterszman, A., Schneider, G., Sixma, T., Sussman, J. L., Stewart-Jones, G., Thierry, J. C., and Moras, D. (2006) First steps towards effective methods in exploiting high-throughput technologies for the determination of human protein structures of high biomedical value. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 62, 1208–1217.
- (30) Geerlof, A., Brown, J., Coutard, B., Egloff, M. P., Enguita, F. J., Fogg, M. J., Gilbert, R. J. C., Groves, M. R., Haouz, A., Nettleship, J. E., Nordlund, P., Owens, R. J., Ruff, M., Sainsbury, S., Svergun, D. I., and Wilmanns, M. (2006) The impact of protein characterization in structural proteomics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 62, 1125–1136.
- (31) Zulauf, M., and D’Arcy, A. (1992) Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. *J. Cryst. Growth* 122, 102–106.
- (32) Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., DeTitta, G. T., Dekker, N., and Nordlund, P. (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* 357, 289–298.
- (33) Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. a, Lane, P., and Salemme, F. R. (2001) High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen. Off. J. Soc. Biomol. Screen.* 6, 429–440.
- (34) Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J., and Magliery, T. J. (2009) High-throughput thermal scanning: A general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 3794–3795.
- (35) Pantoliano, M. W., Whitlow, M., Wood, J. F., Rollence, M. L., Finzel, B. C., Gilliland, G. L., Poulos, T. L., and Bryan, P. N. (1988) The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. *Biochemistry* 27, 8311–7.
- (36) Sousa, R. (1995). Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* 51, 271–277.

- (37) Golovanov, A. P., Hautbergue, G. M., Wilson, S. a, and Lian, L.-Y. (2004) A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8933–8939.
- (38) Blobel, J., Schmidl, S., Vidal, D., Nisius, L., Bernadó, P., Millet, O., Brunner, E., and Pons, M. (2007) Protein tyrosine phosphatase oligomerization studied by a combination of ¹⁵N NMR relaxation and ¹²⁹Xe NMR. Effect of buffer containing arginine and glutamic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5946–5953.
- (39) Graslund, S. (2008) Protein production and purification. *Nat. Methods* 5, 135–146.

Material Suplementario

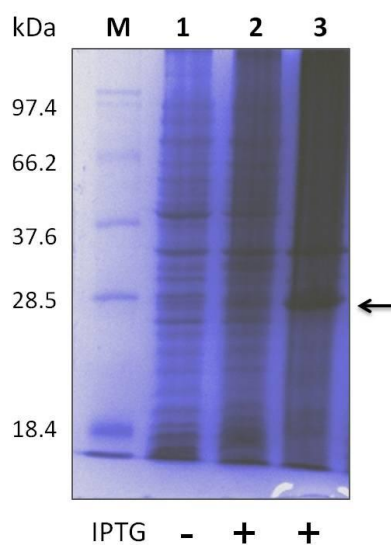


Figura suplementaria 1. Evaluación de la expresión de GST-hG0S2. Gel SDS-PAGE para evaluar la expresión de hG0S2 con el sistema pGEX-6P, donde M: marcador de peso molecular; 1 corresponde al tiempo antes (-); 2 y 3 al tiempo después (+) de inducir las células BL21 (DE3) transformadas con pGEX-6P/hG0S2, a la temperatura de 37 y 28 °C respectivamente. La flecha señala a la proteína GST-hG0S2.

Apéndice

Purificación de hG0S2

Amortiguadores:

Amortiguador de lisis: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl.

Amortiguador A: 50 mM Tris-HCl pH8.0.

Amortiguador B: 50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 M NaCl.

Lisis

1. Descongelar células en hielo.
2. Resuspender células (de 1L de cultivo) en aproximadamente 15 mL de **amortiguador de lisis**.
3. Lisar las células por sonicación:

Duración de sonicación: 7:30 minutos
Amplitud: 50%
Longitud de pulso: 15 segundos
Longitud de pausa: 45 segundos
Numero de ciclos: 30

4. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C, retener el sobrenadante. Comenzar **paso #1** de **columna de afinidad**.

Columna de Afinidad

1. Equilibrar la **columna de afinidad a níquel** con **amortiguador de lisis**. (3 volúmenes de columna, CV).
2. Cargar el lisado.
3. Colectar lo no unido.
4. Lavar la columna con amortiguador de lisis con 10 mM de imidazol (5-10 CV). Guardar el frente.
5. Eluir con 3 CV de amortiguador de lisis con 50, 250 y 500 mM de imidazol.

6. Analizar las fracciones por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%.
7. Juntar las fracciones donde eluyó SUMO-hG0S2 y concentrar por microfiltración con corte de 10 kDa.

Columna de Exclusión Molecular (Superdex 75 10/300 GL)

1. Equilibrar la **columna Superdex 75** con **amortiguador de lisis**. (3 volúmenes de columna, CV a 0.8ml/min).
2. Inyectar proteína (500 µl de muestra y realizar la separación de proteínas a un flujo de 0.8 mL/min en un volumen de elución de 1.5 CV.) Repetir si la muestra es mayor de 500 µL.
3. Colectar fracciones y analizarlas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%.

Digestión con PPS y Segunda Exclusión Molecular

1. Juntar las fracciones donde eluyó SUMO-hG0S2 e incubar con PPS (5 unidades por ml de muestra) a 4 °C con agitación constante por 16 horas.
2. Concentrar proteína por microfiltración con corte de 3 kDa.
3. Repetir el paso de exclusión molecular y analizar las fracciones donde eluyó hG0S2 por electroforesis en geles de poliacrilamida al 17%.

Columna de Intercambio Iónico (HiTrap Q HP)

1. Desalar la muestra de proteína con la columna PD-10 en el **amortiguador A**
2. Equilibrar la columna **HiTrap Q HP** con 5 CV de **amortiguador A** con un flujo de 2mL/min
3. Inyectar la muestra (5mL) y colectar la fracción no unida.
4. Eluir hG0S2 con un gradiente lineal con el **amortiguador B** en 20 CV. Recolectar fracciones de 3 mL con un flujo constante de 2 mL/min.
5. Analizar por electroforesis en geles de poliacrilamida (17%) las fracciones eluidas.
6. Concentrar por microfiltración con corte de 3 kDa.
7. Cuantificar por absorbancia a 280nm.

*Rendimiento esperado: 15 mg por litro de cultivo.