

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Análisis estructural y funcional de la proteína Clp de
Xanthomonas axonopodis pv. citri

Tesis que presenta

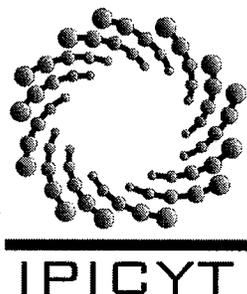
Akira Pérez Márquez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

**Director de la Tesis:
Dr. Samuel Lara González**

San Luis Potosí, S.L.P., 30 de junio del 2016



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Análisis estructural y funcional de la proteína Clp de Xanthomonas axonopodis pv. citri*" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Akira Pérez Márquez** y aprobada el once 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. Braulio Gutiérrez Medina
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

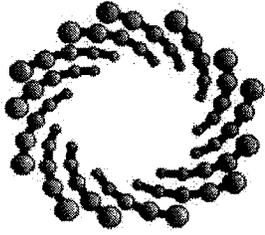


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de proteínas 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 331649) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACyT No CB2011-168710. Parte del equipo utilizado fue adquirido con el proyecto CONACyT INFRA 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 145 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 11 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:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Dr. Samuel Lara González

Presidenta
Secretario
Sinodal

IPICYT
IPICYT
IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Akira Pérez Márquez

sobre la Tesis intitulada:

Análisis estructural y funcional de la proteína Clp de Xanthomonas axonopodis pv. citri

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 10:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 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 Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Dr. Samuel Lara González.

A mi comité tutorial, Dr. Braulio Gutierrez Medina, Dra. Irene Castaño Navarro

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de Examen Dedicatorias	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras.....	ix
Abreviaturas	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Introducción.....	2
Materiales y Métodos	7
Clonación de Clp en el vector de expresión pET28-PPS	7
Expresión de la proteína Clp6xHis recombinante	7
Purificación de la proteína Clp recombinante	8
Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC)	8
Cromatografía de intercambio iónico.....	9
Cromatografía de exclusión molecular.....	9
Preparación de dúplex de ADN de 38 pb (ADN38) para ensayos de movilidad	9
Ensayo de movilidad del complejo Clp-ADN38 (SEC-MSA).....	10
Ensayo de estabilidad térmica de Clp.....	10
Resultados y Discusión	11
Evaluación de la expresión de Clp	11
Purificación de la proteína Clp.....	11
Actividad Biológica de Clp recombinante.....	14
Análisis de Estabilidad Térmica.....	15
Efecto del amortiguador optimizado sobre la estabilidad de Clp.....	18
Conclusiones.....	19
Agradecimientos.....	20
Referencias	30
Anexos	34
Anexo 1. Figuras Suplementarias.....	34
Anexo 2. Protocolo de purificación de Clp recombinante.....	36

Lista de tablas

Tabla 1 Valores de Tm obtenido por análisis de Thermofluor para distintos compuestos.....	27
---	----

Lista de figuras

Figura 1. Expresión de Clp.....	21
Figura 2. Solubilidad de Clp-6XHis.....	22
Figura 3. Purificación de Clp-His por IMAC.....	23
Figura 4. Purificación de Clp por Cromatografía de Intercambio Iónico y Filtración en Gel.....	24
Figura 5. Ensayo de movilidad en filtración en gel.	25
Figura 6. Análisis por Thermofluor de varios aditivos.....	28
Figura Suplementaria 1. Representación esquemática de un modelo de la autoinducción de la señal del DSF.....	34
Figura Suplementaria 2. Digestión con pps.....	35

Abreviaturas

(Por sus siglas en inglés)

Xac	Xanthomonas axonopodis pv. citri
Clp	Crp like protein
Xcc	Xanthomonas campestris pv. campestris
DSF	Difusible signal factor
QS	Quorum sensing
c-di-GMP	Ciclic diguanosil monophosphate
CAP	Catabolite activator protein
AMPc	Ciclic adenosin monophosphate
ADN	Ácido desoxirribonucleico
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography

Resumen

Análisis estructural y funcional de la proteína Clp de *Xanthomonas axonopodis pv. citri*

Clp (Crp-like protein) es un regulador de la expresión de factores de virulencia en la bacteria gram negativa *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, fitopatógeno causante del cáncer de los cítricos y de gran importancia económica. Este factor de transcripción pertenece a la familia CRP/FNR presentando 45% de identidad de secuencia con CAP (por sus siglas del inglés Catabolite Activator Protein), sin embargo es único en su clase por dos cuestiones. En primer lugar es capaz de unirse al ADN sin necesidad de unirse a su ligando, y esta unión a ligando solo provoca su inhibición. Además el ligando que une es c-di-GMP, a diferencia de la mayoría de los integrantes de la familia que unen AMPc como es el caso de CAP. Nuestro objetivo es resolver la estructura tridimensional del complejo Clp-ADN. Para esto se expresó Clp en la cepa BL21 (DE3) Star de *Echerichia Coli*, induciendo la expresión de la proteína con 0.4 mM de IPTG a 28 °C durante 16 horas tras un choque frío de 2 horas. La purificación se realizó mediante tres pasos cromatográficos, IMAC, intercambio iónico y por último exclusión molecular. El proceso tuvo un rendimiento final de 0.6 mg/litro de cultivo. La proteína Clp recombinante obtenida presentó actividad biológica evaluada por un ensayo de movilidad monitoreado mediante exclusión molecular, mostrándose que el tiempo de retención del complejo Clp-ADN disminuye (10 mL = 197242 Da) con respecto al ADN solo (11.8 ml = 65493 Da). Por análisis de Thermofluor se observó que el cloruro de sodio, el glicerol, el cloruro de litio y el ácido glutámico aumentaron la estabilidad térmica de Clp.

PALABRAS CLAVE: Clp, CAP, factores de transcripción, c-di-GMP, proteína-ADN

Abstract

Structural and functional analysis of the Clp protein of *Xanthomonas axonopodis pv. citri*

The Crp-like protein (Clp) is a global regulator of the expression of virulence factors in gram negative bacteria *Xanthomonas axonopodis pv. citri*. phytopathogen that causes citrus cancer, which is economically important. This factor belongs to the CRP / FNR family and presents 45% of sequence similarity with Catabolite Activator Protein (CAP). However it is unique in its class for two reasons: first, it is able to bind DNA without binding to its ligand, and the ligand binding causes inhibition. Furthermore, the binding ligand is c-di-GMP, unlike most family members, such as CAP, that bind cAMP. Our goal is to solve the three-dimensional structure of Clp-DNA complex. Clp was expressed in the BL21 (DE3) Star *Escherichia coli* strain, inducing protein expression with IPTG 0.4 mM at 28 °C for 16 hours after a cold shock for 2 hours. Purification was performed by three chromatographic steps, IMAC, ion exchange and lastly molecular exclusion. The process had a final yield of 0.6 mg / liter of culture. Recombinant Clp obtained presented biological activity evaluated by size-exclusion mobility shift assay, showing that the retention time of the Clp-DNA complex decreases (10mL = 197,242 Da) compared to DNA alone (11.8ml=65,493Da). Sodium chloride, glycerol, lithium chloride and glutamic acid increased the thermal stability of Clp.

KEYWORDS: Clp, CAP, transcription factors, c-di-GMP.

Análisis estructural y funcional de la proteína Clp de *Xanthomonas axonopodis pv. citri*

Pérez-Márquez A¹, Lara-González S^{1*}

¹ IPICYT, Laboratorio de Biología Estructural. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

PALABRAS CLAVE: Clp, CAP, factores de transcripción, c-di-GMP, proteína-ADN.

Introducción

Las bacterias patogénicas gram negativas pertenecientes al género *Xanthomonas* causan daños severos en algunos cultivos vegetales alrededor de todo el mundo, y muestran gran especificidad patógeno-hospedero (Boch and Bonas, 2010). Entre estas se encuentran *Xanthomonas* spp., incluyendo *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (syn. *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas campestris* pv. *citri* o *Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (Cubero and Graham, 2002). Xac causa cáncer cítrico, una enfermedad que afecta las diferentes especies comerciales de cítricos alrededor del mundo ocasionando pérdidas millonarias.

El Factor Señal Difusible (DSF por sus siglas del inglés **D**ifusible **S**ignal **F**actor), ácido cis-11-metil-2 dodecanoico, media la virulencia en *Xanthomonas* spp. Las señales mediadas por DSF regulan la expresión de al menos 165 genes involucrados en diversas funciones (Y. W. He et al., 2007). En el caso particular de Clp, un estudio comprobó que una delección en el gen que codifica para el DSF, o cualquiera de los genes que codifican para proteínas involucradas en su cascada de señalización, provoca una disminución de 1.5 a 1.8 veces de la tasa de transcripción de Clp (Y.-M. Hsiao et al., 2005). El sistema de quórum sensing (QS del inglés **Q**uorum **S**ensing) media la cascada de señalización de este factor (Zhang, 2010). En Xcc, al igual que en los organismos que presentan este mecanismo, mediante QS se detecta un umbral de densidad bacteriana y esto conlleva a la expresión de los genes de virulencia. En condiciones de baja densidad bacteriana, el receptor de DSF se encuentra formando un complejo con

la sintasa de este factor e inhibiéndola, pero a alta densidad bacteriana ocurre un cambio conformacional en este receptor que libera a la sintasa que es capaz entonces de sintetizar más DSF (He and Zhang, 2008). (Figura Suplementaria 1). La relación entre el QS y el DSF involucra también a varios genes *rpf* (del inglés regulation pathogenicity factors). En la síntesis del DSF interviene una enoil-CoA hidratasa que está codificada por el gen *rpfF*, mientras que RpfC y RpfG constituyen dos elementos reguladores (Y.-W. He et al., 2007). RpfC detecta al DSF y fosforila a RpfG, el cual es una fosfodiesterasa del c-di-GMP (por sus siglas del inglés de cyclic diguanosil monophosphate), que al ser escindido libera GMP (Rott et al., 2013).

La molécula de c-di-GMP, considerado como segundo mensajero (Romling et al., 2013), es una molécula señal implicada en la regulación de varias funciones en bacterias, incluyendo biosíntesis de celulosa (Weinhouse et al., 1997), motilidad bacteriana (Simm et al., 2004), formación de biopelículas (Hickman et al., 2005) y producción de factores de virulencia extracelulares (Ryan et al., 2006). Existen diversos tipos de efectores que están regulados por esta molécula, entre los que se encuentran PilZ, PeiD, FleQ, PleD, LapD (Zhang, 2010), y más recientemente descubierto Clp (Lu et al., 2012). Clp es muy afín por el dinucleótido ($K_D = (1.61 \pm 0.22) \times 10^{-7}$ M). Esta unión provoca la inhibición de la unión de Clp con el ADN (Hsiao et al., 2008; Leduc and Roberts, 2009), por lo que el dinucleótido se considera un regulador negativo de la transcripción de los genes de virulencia, conllevando a una evidente disminución de la virulencia de la bacteria (Tao et al., 2010).

Clp (por sus siglas del inglés **C**rp **l**ike **p**rotein) es un factor de transcripción presente en *Xanthomonas* spp. Se ha observado en varios estudios que la delección del gen *clp*, que codifica para la proteína del mismo nombre, provoca alteraciones en la virulencia de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc).(Akimoto-Tomiyama et al., 2014). Según Hsiao y colaboradores en 2005 una delección de *clp* provoca una disminución del 82%, 65% y 82% en la producción de proteasa, celulasa y exopolisacáridos respectivamente, los cuales constituyen factores de virulencia de estas bacterias (Y. M. Hsiao et al., 2005). Se han identificado 299 genes que son regulados por Clp en Xcc, de ellos 260 de manera positiva y 39 negativamente, los cuales se encuentran involucrados en varias funciones: síntesis de exopolisacáridos (EPS), resistencia a fármacos y desintoxicación, síntesis del flagelo y motilidad, reacciones hipersensibles, patogenicidad, captación de hierro, metabolismo de proteínas, ciclo del TCA, respiración, componentes de membrana, transportadores, metabolismo de ácidos grasos y proteínas hipotéticas (Y. W. He et al., 2007).

Clp es un factor de transcripción de la familia CRP/FNR. Esta comprende alrededor de 369 proteínas, que en su mayoría actúan como activadores transcripcionales en presencia de un catabolito, aunque existen ejemplos también de algunos que no necesitan ser activados como SdrP y otros, como en el caso de Clp que es inhibido por el catabolito (Agari et al., 2008; Tao et al., 2010). CAP (del inglés **C**atabolite **A**ctivator **P**rotein), principal proteína de esta familia, es el factor de transcripción más ampliamente estudiado de *E. coli*, por lo cual constituye una proteína modelo para entender el mecanismo de iniciación de la transcripción en procariontes. Al igual que CAP, Clp es un homodímero de aproximadamente 50

kDa en el que cada subunidad está organizada en dos dominios, un dominio N-terminal (residuos 1-136) que constituye el sitio de unión a AMPc, y un dominio C-terminal que comprende el motivo hélice-giro-hélice de unión a ADN (residuos 139-209) (Popovych et al., 2009). Existen dos conformaciones predominantes de CAP, apo-CAP (sin AMPc) y CAP-(AMPc)₂ (con un AMPc unido por subunidad). La especie apo-CAP es incapaz de unirse al ADN de manera específica, mientras que la especie CAP-(AMPc)₂ presenta una alta afinidad por secuencias específicas de ADN (Bostford y col., 1992), presentando una afinidad 450 veces mayor por su secuencia consenso que por su sitio de unión en el operón lac (Ebright et al., 1989). Clp ha sido descrito en varios integrantes del género *Xanthomonas*, principalmente en *Xanthomonas campestris pv. campestris* así como en *Xanthomonas axonopodis pv. citri*. En *Xac* presenta un 45% de identidad de secuencia con la proteína CAP de *E.coli.*, conservando los seis residuos que hacen contacto con AMPc en CAP (Weber and Steitz, 1987), excepto S83 en CAP que corresponde a E99 en Clp (Tao et al., 2010). Esto sugiere que esta proteína presenta un sitio de unión a nucleótido. Sin embargo, aquí radica una de las principales diferencias con el factor de transcripción CAP, ya que el nucleótido que une Clp no es precisamente AMPc sino el dinucleótido cíclico c-di-GMP.

Chin y colaboradores en 2010 resolvieron la estructura en solución de Clp, y la compararon con la de CAP. Observaron que Clp, sin unirse al dinucleótido forma un dímero simétrico similar a otros de la familia Crp/Fnr en el que cada subunidad comprende un dominio de barril beta en el extremo N-terminal (residuos 21-127) y un dominio de unión a ADN en el C-terminal (residuos 158-230), los cuales están unidos por una interfase de dimerización (residuos 128-157)(Chin et al., 2010). Clp

y CAP presentan una alta identidad de secuencia por lo que se utilizó CAP-(AMPC)₂ para resolver la estructura de Clp por reemplazo molecular. Por experimentos de “docking” se sugirió el sitio de unión a c-di-GMP entre dos α hélices, la α C y la α D. Sin embargo aun no se encuentra resuelta la estructura de Clp unido a c-di-GMP, lo cual corroboraría, este resultado. Al contrario de lo que ocurre con AMPc y CAP, y constituyendo la segunda gran diferencia entre estos dos factores de transcripción, c-di-GMP es un modulador alostérico negativo de Clp. En el genoma de *Xanthomonas* spp., no se han encontrado genes que codifiquen para la adenilato ciclasa o CAP, por lo que se cree que el c-di-GMP y Clp son los principales reguladores de la expresión génica en este organismo (Chen et al., 2010). Al unirse el dinucleótido, provoca un cambio conformacional que impide que este factor se una al promotor en el ADN(Gomelsky, 2009). Este efecto contrario marca una gran diferencia entre Clp y CAP. Tao y colaboradores en 2010 demostraron que un aumento en el contenido intracelular de c-di-GMP regula negativamente la expresión de genes de virulencia y atenúa la virulencia bacteriana. Clp reconoce el mismo sitio de unión al ADN que CAP (TGTTGA-N6-TCACA) y puede sustituir a CAP en la activación de la transcripción en el promotor lac de *Echerichia coli* in vivo(de Crecy-Lagard et al., 1990; Dong and Ebright, 1992).

El objetivo de este trabajo es obtener la estructura tridimensional del complejo Clp-ADN por medio de cristalización de proteínas y difracción de rayos X. Para ello se evaluó se evaluó la expresión, purificación y solubilidad de la construcción pET28pps_axoClp. La caracterización funcional de la proteína recombinante se realizó mediante ensayos de movilidad en gel.

Materiales y Métodos

Clonación de Clp en el vector de expresión pET28-PPS

El gen sintético de Clp optimizado para su expresión en *E. Coli* fue comprado como gblock a la empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Con el objetivo de obtener la proteína Clp fusionada a una etiqueta de seis histidinas (6XHis) en el extremo N-terminal, su gen fue amplificado por PCR con los oligos 5'-GGGAATTCCATATGAGCCCAGG y 5'-CGCGGATCCAAGCTTTCAGCGG y clonado entre dos sitios de restricción de las enzimas Hind III y Nde I del vector pET28-PPS que contiene un sitio de corte para la proteasa PPS. La clona se verificó por secuenciación.

Expresión de la proteína Clp6xHis recombinante

50 μ l de células competentes se descongelaron por 10 minutos en hielo, se añadió 1 μ l de ADN a una concentración de 25 ng/ μ l y se incubó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico colocándolo en bloque a 42 °C durante 45 segundos y se colocó nuevamente en hielo por 2 minutos. Luego se le añadió 500 μ l de medio Luria-Bertani (LB) incubándose 1 hora a 37 °C con agitación. Al finalizar se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 5 minutos, el precipitado se resuspendió en 50 μ l de medio LB y se sembró en placas de agar con Kanamicina a 50 μ g/ml.

A partir de esta colonia se creció un preinóculo en 50 ml de medio LB suplementado con kanamicina durante 12 horas a 37 °C. Con este preinóculo se inoculó 1L de medio LB fresco con kanamicina y se hizo crecer a 37 °C con

agitación de 180 rpm hasta una DO_{600nm} de 0.6. En este punto se le realizó un choque frío manteniendo el cultivo por dos horas a 4 °C y posteriormente se indujo la expresión con una concentración final de 0.4 mM de IPTG (isopropil B-D-1-thiogalactopiranosido). La expresión tuvo lugar a 28 °C durante 16 horas. Pasado este tiempo el cultivo se centrifugó a 4 °C por 10 minutos a 6000 rpm. El precipitado de las células se guardó a -20 °C hasta su uso. La expresión fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%.

Purificación de la proteína Clp recombinante

El pellet de 500 ml de cultivo de células se resuspendió en 120 ml de amortiguador de lisis (tris HCl 50 mM, pH 8.0, KCl 500 mM, lisozima 4 mg/mL). La muestra se sonicó con 60 ciclos a 60% de amplitud, en pulsos de 15 segundos ON y 45 segundos OFF. El producto se centrifugó a 4 °C durante 15 minutos a 12000 rpm. Se desechó el pellet y el sobrenadante fue utilizado para los posteriores pasos de purificación.

Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC)

El sobrenadante se inyectó a una columna de Ni-NTA previamente equilibrada con 5 volúmenes de columna (VC) de amortiguador de lisis previamente descrito. Luego se realizó un lavado con 10 VC de imidazol 10 mM en amortiguador tris HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 250 mM, LiCl 100 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 1 mM y otro de 6 VC imidazol 50 mM. La elución se realizó con 6 VC de imidazol 500 mM. Se colectaron el frente y los lavados por separado, además de las fracciones de elución de 1 VC cada una. Se evaluó cada una de las etapas por SDS-PAGE al 12%. Las fracciones donde se observó la banda de interés se unieron y desalaron

por columna PD10 (GE Healthcare) en amortiguador tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM.

Cromatografía de intercambio iónico

Se inyectaron en un AKTA-FPLC (GE Healthcare) 7 mL de proteína filtrada y previamente desalada a una columna HiTrap Q HP previamente equilibrada en el amortiguador A (tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM). La muestra se recuperó con un gradiente lineal de 0 a 100% de amortiguador B (tris-HCl 20mM, pH 8.0, 1M NaCl) en 20 VC. La corrida se realizó a un flujo de 2 mL/min, y se colectaron fracciones de 3 mL cada una en hielo. Por absorbancia a 280 nm no se detecta ningún pico dada la ausencia de triptofanos en la proteína, por lo que fue necesario detectar la proteína analizando las fracciones por SDS-PAGE al 12%. La concentración fue cuantificada mediante método de Bradford (Bradford, 1976) mientras que el análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa Image J, versión 1.44.

Cromatografía de exclusión molecular

En un AKTA-FPLC (GE Healthcare) se inyectaron 0.5 mL de proteína a una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), equilibrada en el amortiguador tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 250mM, LiCl 100mM, DTT 0.5 mM, PMSF 1mM. Se colectaron fracciones de 1 mL de la corrida realizada a un flujo constante de 0.8 mL/min. El volumen total de la corrida fue de 1.5 VC. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 12%. Las fracciones en las que se detectó proteína se unieron y se concentraron hasta 1 mL.

Preparación de dúplex de ADN de 38 pb (ADN38) para ensayos de movilidad

Se diseñaron y obtuvieron dos oligos, uno de 17 nucleótidos con la secuencia 5'-ATTCGAAAATTGTGAT y otro de 21 nucleótidos con secuencia 5'-

CTAGATCACAATTTTCGAAAT. El ensamble de estos permite la siguiente secuencia palindrómica de doble cadena:

5'-ATTTTCGAAAATTGTGAT/CTAG ATCACAATTTTCGAAAT-3'

3'-TAAAGCTTTTAACTA GATC/TAGTGTTAAAAGCTTTA-5'

La reacción de ensamble se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad, utilizando un gradiente de temperatura de 90 a 20 °C. Se obtuvo una concentración final de ADN₃₈ de 0.2 mM.

Ensayo de movilidad del complejo Clp-ADN38 (SEC-MSA)

El ensayo de movilidad se realizó en el AKTA-FPLC (GE Healthcare), utilizando una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Se realizaron dos corridas independientes que correspondieron al ADN₃₈ y la otra al complejo Clp-ADN₃₈. El complejo se formó mezclando ADN₃₈ con Clp en una relación molar de 1:5, incubando en hielo durante 1 hora.

Ambas corridas se realizaron en las mismas condiciones , flujo de 0.8 mL/min y colectando fracciones de 1mL. Se siguió la corrida por Abs_{260nm}.

Ensayo de estabilidad térmica de Clp

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron mediante Thermofluor en un equipo RT-PCR 7500 Fast (Applied Biosystems). La muestra de proteína (0.6 mg/mL en amortiguador tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 250mM, LiCl 100mM, DTT 0.5 mM, PMSF 1mM) se diluyó a una concentración final de 0.05 mg/mLañadiendo Sypro Orange a una concentración final de 5x y diferentes aditivos en un volumen final de 40 µLpara medir mediante fluorescencia el cambio en la temperatura media de desnaturalización. La fluorescencia fue capturada y graficada. El valor de la Tm se obtuvo por regresión no lineal utilizando la ecuación

de Boltzman en las secciones sigmoideas de los espectros de fluorescencia obtenidos.

Resultados y Discusión

Evaluación de la expresión de Clp

Se clonó el gen sintético *clp* de *Xac* optimizado para *E. coli* en el vector pET28PPS fusionado a una etiqueta de seis histidinas (6XHis). El resultado de la clonación fue corroborado por secuenciación en el laboratorio nacional LANBAMA. La secuencia confirmó la presencia del gen *clp* en el marco de lectura correcto.

La figura 1 muestra un gel de SDS-PAGE en el que se evalúa la expresión del gen en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star realizada a 28°C con IPTG 0.4 mM. En el gel se observa en el peso correspondiente a Clp-6XHis, una banda muy intensa en la muestra tomada después de las 16 horas de inducción (DI), la misma no se presenta en la muestra antes de la inducción con IPTG.

Purificación de la proteína Clp

Se estableció un protocolo de purificación que incluye tres pasos cromatográficos. En primer lugar una cromatografía de afinidad a níquel (IMAC) seguida por una cromatografía de intercambio iónico y finalmente una cromatografía de exclusión molecular.

La figura 2 muestra un gel en el que se puede observar la solubilidad de Clp. Al sonicar las células una gran cantidad de proteína queda de manera soluble en el sobrenadante, aproximadamente el 40%, determinado por análisis densitométrico, esto permite disponer de una gran cantidad de proteína para continuar con la purificación.

Al realizar la purificación por IMAC se observa que Clp-6XHis eluye con 500 mM de imidazol en seis volúmenes de columna (Figura 3). La pureza de la proteína se ve incrementada después de este paso aunque aún existen algunos otros contaminantes pero en muy baja concentración, esto nos lleva a realizar otro paso de purificación. El rendimiento del proceso hasta este punto fue de de 3mg/Litro de cultivo.

Hasta este punto la proteína estaba fusionada a la etiqueta de histidinas, sin embargo se realizó un corte con la proteasa PPS para eliminar la misma. Se utilizó 5 unidades de PPS por mililitro de muestra, incubando con agitación a 4 °C durante 12 horas. La digestión ocurre de manera parcial, quizás porque una fracción de la proteína se encuentra de manera agregada y el sitio de corte no se encuentra expuesto (Figura Complementaria 2). Una vez desalada esta muestra, se inyectó a una columna de intercambio iónico separando por gradiente. La proteína eluye en la fracciones 16, 17 y 18 en una concentración entre 300 y 350mM de NaCl. No se muestra cromatograma pues Clp no presenta triptófanos y por tanto no absorbe a 280 nm, por lo que es detectada solo mediante SDS-PAGE (Figura 4). La cuantificación se realiza mediante reactivo de Bradford.

Clp se concentró hasta 1.5 mL a 0.5 mg/mL por microfiltración y posteriormente se inyectó en una columna Superdex 75 de exclusión molecular. La proteína eluye en la fracción 12, que corresponde según la curva de calibración de la columna, al peso molecular del dímero aproximadamente (44800 Da), el cual constituye su forma activa. Se comprobó el nivel de pureza de Clp mediante SDS-PAGE (Figura 4).

Después de tres pasos cromatográficos de purificación se obtiene Clp con 95 % de pureza. Sin embargo el rendimiento del proceso es de alrededor de 0.6 mg/Litro de cultivo, el cual es un rendimiento bajo para realizar ensayos de cristalización ya que no permite alcanzar condiciones de sobresaturación en experimentos de cristalización (Asherie, 2004; Kim et al., 2011). Este bajo rendimiento puede deberse a varios factores derivados de las diferentes etapas del proceso: la baja solubilidad de Clp y las consiguientes pérdidas de proteína a lo largo de los pasos de cromatografías. Para tratar de mejorar este rendimiento se realizó un ensayo de thermofluor, ya que la fluorimetría de barrido permite mejorar las posibilidades de encontrar un amortiguador que favorezca la estabilidad térmica de la proteína (ver más adelante).

Con respecto a trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, donde se había estudiado Clp de Xcc, se observó como en nuestro caso se obtuvo igual rendimiento hasta la etapa de IMAC, aunque en este trabajo la proteína se logró seguir purificando mientras en el trabajo anterior, después de esta etapa ya no se podía continuar con la purificación. Estas dos proteínas solo difieren en dos aminoácidos. Existe un cambio de prolina por leucina y otro de alanina por treonina en la superficie de la proteína, lo cual puede explicar este aumento de la solubilidad de Clp de Xac con respecto a Clp de Xcc. Además es importante destacar que en este proceso no fue necesario utilizar CHAPS como se usaba en el proceso anterior, lo cual constituye una ventaja, dado el valor económico de este detergente y el hecho de que su uso permite la solubilización de otras proteínas contaminantes en la mezcla.

Actividad Biológica de Clp recombinante

Es necesario probar que Clp recombinante tiene actividad biológica. Clp es un factor de transcripción y su principal función involucra la unión al ADN. Se realizó un ensayo de movilidad por exclusión molecular o SEC-MSA (por sus siglas en inglés Size Exclusion Mobility Shift Assay). Para esto se utilizó una secuencia consenso para unión a Clp de 38 pares de bases (5'-ATTTCGAAAATTGTGAT|CTAG ATCACAATTTTCGAAAT-3') que se incubó con Clp en una relación 1:5 (ADN:Clp) durante una hora. Transcurrido este tiempo se realizó una corrida en filtración en gel y esta se comparó con una corrida de ADN sin proteína realizada en las mismas condiciones (Figura 5). Se utilizó la secuencia consenso en lugar de un promotor nativo puesto que se ha visto que CAP presenta una afinidad 450 veces mayor por su secuencia consenso que por su sitio de unión en el operón *lac* (Ebright et al., 1989), por lo que de forma similar a lo que se ha descrito para CAP, el uso de la secuencia consenso nos permitiría realizar el ensayo de movilidad en gel.

En exclusión molecular las moléculas mayores eluyen antes por lo que en un cromatograma se observarían en un tiempo de elución menor. En este experimento la muestra en la que se había incubado la proteína con el ADN eluyó en un menor tiempo de retención que el ADN sin proteína. Mientras que el ADN solo, eluye en 11.8 mL (65493 Da según curva de calibración, Figura 6), la mezcla ADN con Clp eluyó en los 10 mL (197242 Da). Nótese además que para el complejo no existe solo un pico de absorbancia sino dos, esto es debido a que no todo el ADN se encuentra unido a la proteína, y además esta unión es dinámica. Esto constituye una evidencia de que Clp es capaz de unirse al ADN, formando un

complejo, mostrando así su actividad biológica. Queda pendiente medir la afinidad de Clp por la secuencia consenso y algún promotor nativo de Xac para Clp, lo cual podría realizarse por anisotropía de fluorescencia y realizar un análisis comparativo de las mismas.

Análisis de Estabilidad Térmica

Con el fin de optimizar un amortiguador que permitiera mayor estabilidad térmica de Clp y estabilidad en el tiempo se realizó el ensayo de “Fluorimetría diferencial de barrido” también conocido como “ensayo de desplazamiento térmico” (thermal shift assay) o thermofluor, el cual consiste en aumentar la temperatura gradualmente a una solución en la que se encuentra la proteína de interés en presencia de un fluoróforo. Este interactúa con las zonas hidrofóbicas de la proteína las cuales se exponen gradualmente con el aumento de la temperatura, evidenciándose como un aumento en la fluorescencia. El experimento es muy útil para nuestros fines pues se puede ver el efecto de varios compuestos en la temperatura media de desnaturalización (T_m) de la proteína (Boivin et al., 2013; Reinhard et al., 2013). Si esta T_m se encuentra recorrida hacia la derecha, aumentando, se interpreta como un aumento en la estabilidad de la proteína, que en ocasiones puede traducirse en un aumento de la solubilidad. La fluorimetría de barrido además permite mejorar las probabilidades de cristalización encontrando el amortiguador idóneo (Phillips and de la Peña, 2011).

Son muchos y de varias naturalezas los aditivos que se pueden utilizar para aumentar la estabilidad y solubilidad de una proteína. Se probaron algunos en función de trabajos previos (Chin et al., 2010; de Crecy-Lagard et al., 1990; Hsiao et al., 2009; Leduc and Roberts, 2009; Lu et al., 2012)

Sales

Los principales agentes solubilizantes de las proteínas son las sales. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilidad por salado o salting in, en el que las cargas adicionales recubren con mayor eficacia las numerosas cargas iónicas de las moléculas proteicas, con lo que se incrementa la solubilidad de las proteínas.

Entre las sales más usadas se encuentra el cloruro de sodio. Hay estudios que prueban que se pueden utilizar incluso en concentraciones hasta 1 M y favorecen la solubilidad. Se evaluó el NaCl en concentraciones desde 150 mM hasta 1 M. Se observó que a partir de 300 mM de NaCl se logra incrementar la T_m hasta alcanzar un valor de aumento de cinco grados a 1M de NaCl (figura 6A, tabla 1).

Iones Metálicos

Los iones juegan un papel importante en la estabilización de proteínas (Pantoliano et al., 1988). Estos pueden presentarse coordinados con varios aminoácidos y de esta manera estabilizar las interacciones entre dos estructuras secundarias adyacentes. Se evaluó tanto el Mg^{++} como el Li^+ . El Magnesio tuvo un efecto negativo sobre la T_m , disminuyéndola (Figura 6C, Tabla1) Por otra parte el LiCl tiene un efecto positivo sobre la T_m , aumentándola en tres grados a concentraciones de 800 mM y 1 M (figura 6B, tabla1).

Agentes reductores

Mantener un ambiente reductor es favorable para la solubilidad de las proteínas pues evita las interacciones intermoleculares entre cisteínas y permite el mantenimiento del plegamiento de las mismas (Wingfield, 2015). Entre los agentes

reductores más usados se encuentran el DTT y el β -mercaptoetanol, este último presenta la ventaja de que es más estable en solución y por tanto no hay que estarlo suministrando periódicamente a las soluciones; además de que las concentraciones compatibles con las columnas de Ni-NTA son mayores que las permitidas de DTT. Se evaluaron varias concentraciones de β -mercaptoetanol (1mM, 3 mM, 5 mM y 10 mM). La figura 6E muestra que en ninguna de las concentraciones se presentó un efecto sobre la T_m .

Glicerol

El glicerol es un alcohol, y su grupo OH ayuda a estabilizar el plegamiento de las proteínas, aumentando la tensión superficial y aumentando las interacciones con las moléculas de agua que conforman la capa de solvatación de la proteína. La figura 6F muestra las curvas de fluorescencia de Clp en presencia de varias concentraciones de glicerol. Se observa claramente como este aditivo si tiene un efecto en la solubilidad de Clp, reflejado en el aumento de la T_m . Aunque disminuye un poco la señal de fluorescencia se aprecia claramente como las curvas mantienen su forma. A 15 % de glicerol se observa un corrimiento de la T_m de 4 grados, lo cual es muy favorable.

Detergentes

Se ha visto que el uso de detergentes es muy útil pues ayuda a solubilizar las proteínas. En este caso se probó Tween 20, el cual no presentó un efecto sobre la T_m , mostrando curvas de las clasificadas como “no interpretables” y en las que no se observa una temperatura de transición definida (Dupeux et al., 2011; Kopec and Schneider, 2011). (Figura 6D). Esto puede verse de cierta forma como una ventaja, pues el uso de estos encarecería el proceso de purificación. Además en

trabajos previos del laboratorio se observó que el uso de CHAPS, disminuía la pureza de la proteína pues de igual manera solubilizaba otras proteínas de la mezcla.

Aminoácidos

Se ha observado en trabajos previos que la adición de aminoácidos básicos y ácidos en bajas concentraciones contribuyen a aumentar la solubilidad y estabilidad de proteínas, disminuyendo la formación de agregados al disminuir las interacciones intermoleculares de las proteínas, dado su efecto potenciador de la tensión superficial (Golovanov et al., 2004). La figura 6G y 6H muestra el efecto de dos aminoácidos utilizados, arginina y ácido glutámico respectivamente. La arginina no tiene un efecto marcado en la solubilidad aunque el ácido glutámico sí. En todas las concentraciones evaluadas de ácido glutámico se observa un aumento de dos grados de la T_m . También fueron evaluados los aminoácidos en varias combinaciones entre ellos y combinados con otros aditivos pero no se notó un efecto (datos no mostrados).

Efecto del amortiguador optimizado sobre la estabilidad de Clp.

Al finalizar el proceso de purificación se conserva la proteína a 4 °C, sin embargo se observaba como esta precipitaba a los dos o tres días después de estar almacenada. Se evaluó la estabilidad de Clp purificando en presencia del amortiguador optimizado por thermofluor (tris 20 mM pH 8.0, NaCl 600 mM, glutámico 20 mM, glicerol 15%). Se almacenó a 4 °C y se tomaron muestras a los 3, 7 y 14 días posteriores. Las muestras fueron centrifugadas para permitir que toda la proteína precipitada estuviera en el fondo del tubo y se midió la concentración de la proteína que quedaba en solución en el sobrenadante. En el

amortiguador previo a la optimización a los tres días siguientes a la purificación la concentración disminuyó aproximadamente a la mitad (de 0.5 mg/ml a 0.3 mg/ml) y ya a la semana toda la proteína había precipitado. Sin embargo en el amortiguador optimizado hasta los 14 días la concentración de proteína soluble se mantuvo constante (0.5 mg/ml) (datos no mostrados).

Conclusiones

Clp puede expresarse en las células BL21 (DE3) Star de *Echerichia coli* con una concentración de IPTG de 0.4 mM a 28 °C durante 16 horas. Clp recombinante se obtiene con un 95% de pureza después del proceso de purificación, con un bajo rendimiento de 0.6 mg/litro de cultivo., concentración que no es suficiente para poner ensayos de cristalización. La adición de 15% de glicerol, 600 mM de NaCl, 1M de LiCl y 20 mM de ácido glutámico, contribuye al aumento de la estabilidad térmica de la proteína y la disminución de la formación de precipitados. Clp recombinante presenta actividad biológica pues es capaz de unirse a la secuencia consenso de 38 pb.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT, por el uso del equipo departamental.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 331649) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACyT No CB2011-168710 otorgado a S.L. Parte del equipo utilizado fue adquirido con el proyecto CONACyT INFRA No 204373.

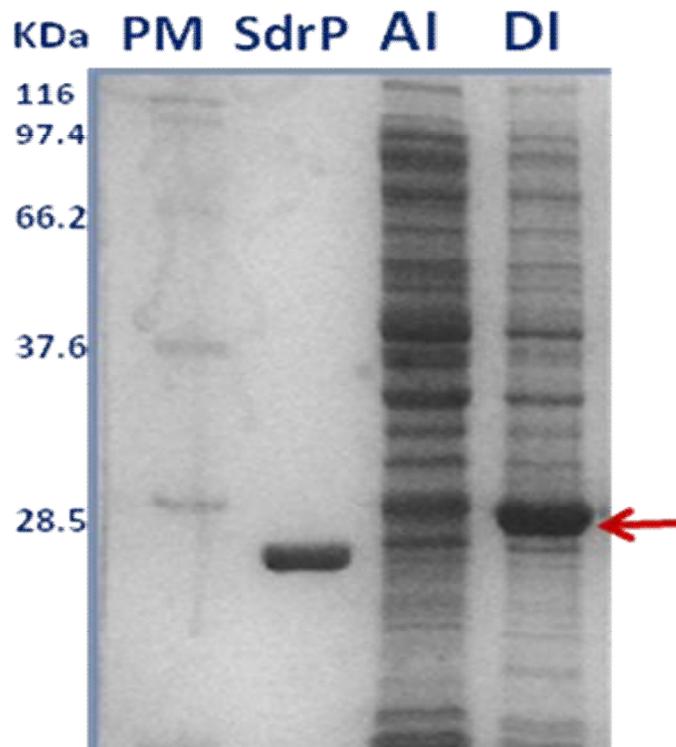


Figura 1. Expresión de Clp

SDS-PAGE de la expresión de la proteína Clp-6XHis en la cepa BL21 (DE3) Star de *E. coli*. La inducción de la expresión se realizó con 0.4mM de IPTG. **PM**: Patrón de Peso Molecular; **SdrP**: Proteína Sdrp con peso molecular de 24 kDa; **AI**: Muestra antes de la inducción; **DI**: Muestra después de la inducción. La flecha muestra la altura a la que migra Clp-6XHis, evidenciándose un notable aumento de la expresión de la proteína de interés

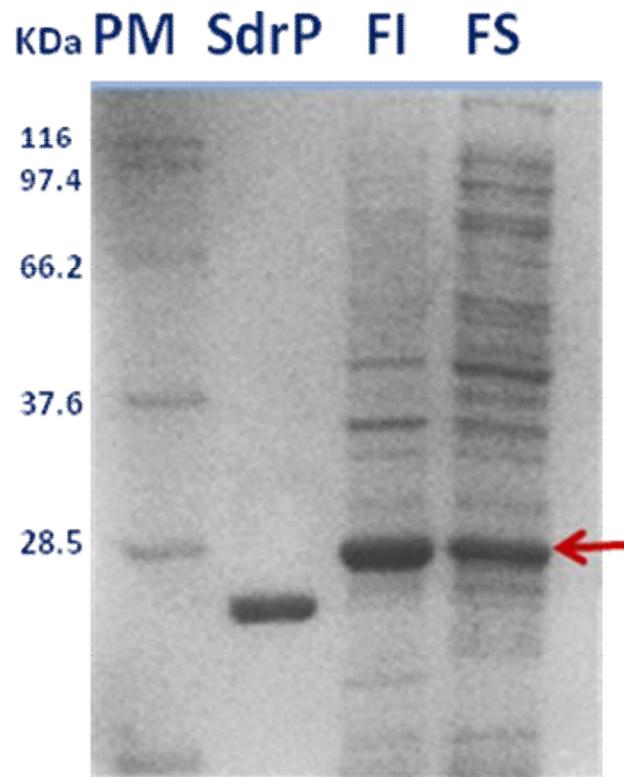


Figura 2. Solubilidad de Clp-6XHis

SDS-PAGE del sonicado de las células. **PM**: patrón de peso molecular; **FI**: fracción insoluble; **FS**: fracción soluble. La flecha muestra la altura a la que migra Clp-6XHis. Nótese que aunque gran cantidad de proteína se encuentra de forma insoluble, encontramos aproximadamente un 40% de esta en la fracción soluble

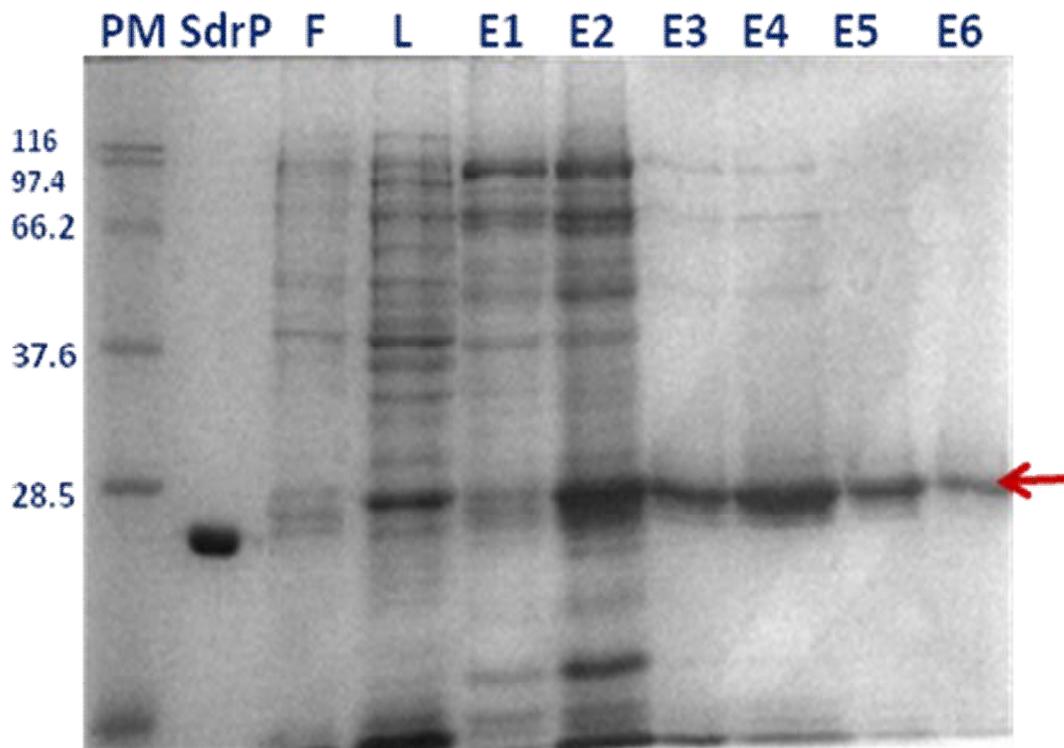


Figura 3. Purificación de Clp-His por IMAC

SDS-PAGE de las diferentes fracciones de IMAC. **PM**: patrón de peso molecular; **F**: frente, **L**: lavado con 10mM de imidazol; **E1, E2, E3, E4, E5, E6**: Fracciones de 3mL de elución con 500mM de imidazol. La flecha muestra la altura a la que migra Clp-His. Clp eluye a partir de la E2 por lo que se unieron las fracciones desde E2 hasta E6.

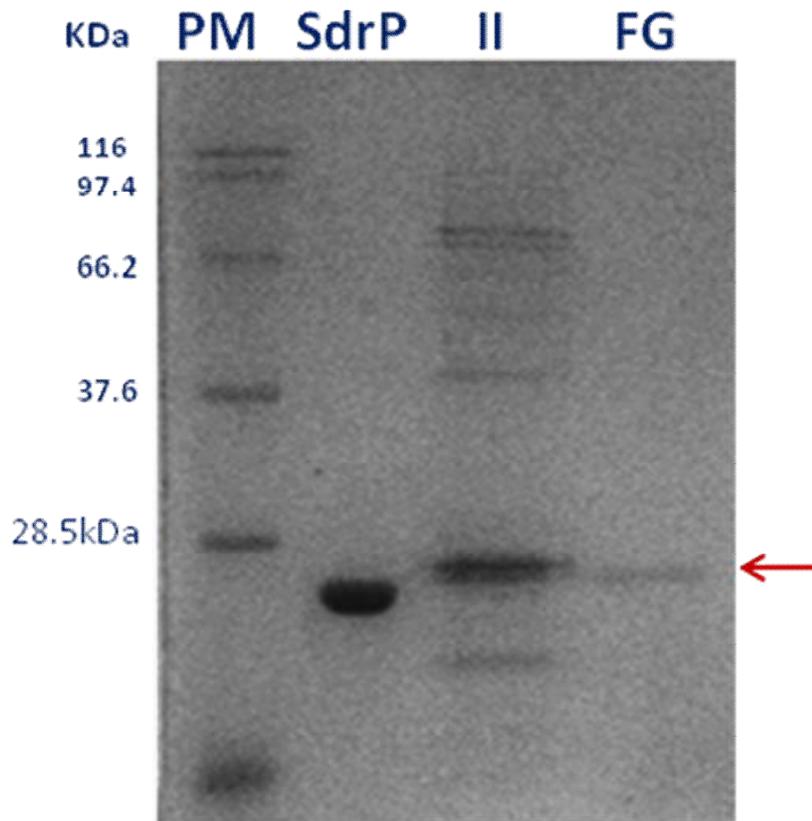


Figura 4. Purificación de Clp por Cromatografía de Intercambio Iónico y Filtración en Gel. SDS-PAGE de las fracciones finales de los últimos pasos de purificación. II: Intercambio Iónico; FG: Filtración en Gel. La flecha muestra la altura a la que migra Clp. Se observa cómo luego de Filtración en Gel la proteína presenta un alto porcentaje de pureza, aunque se obtiene un bajo rendimiento de 0.6 mg/litro de cultivo.

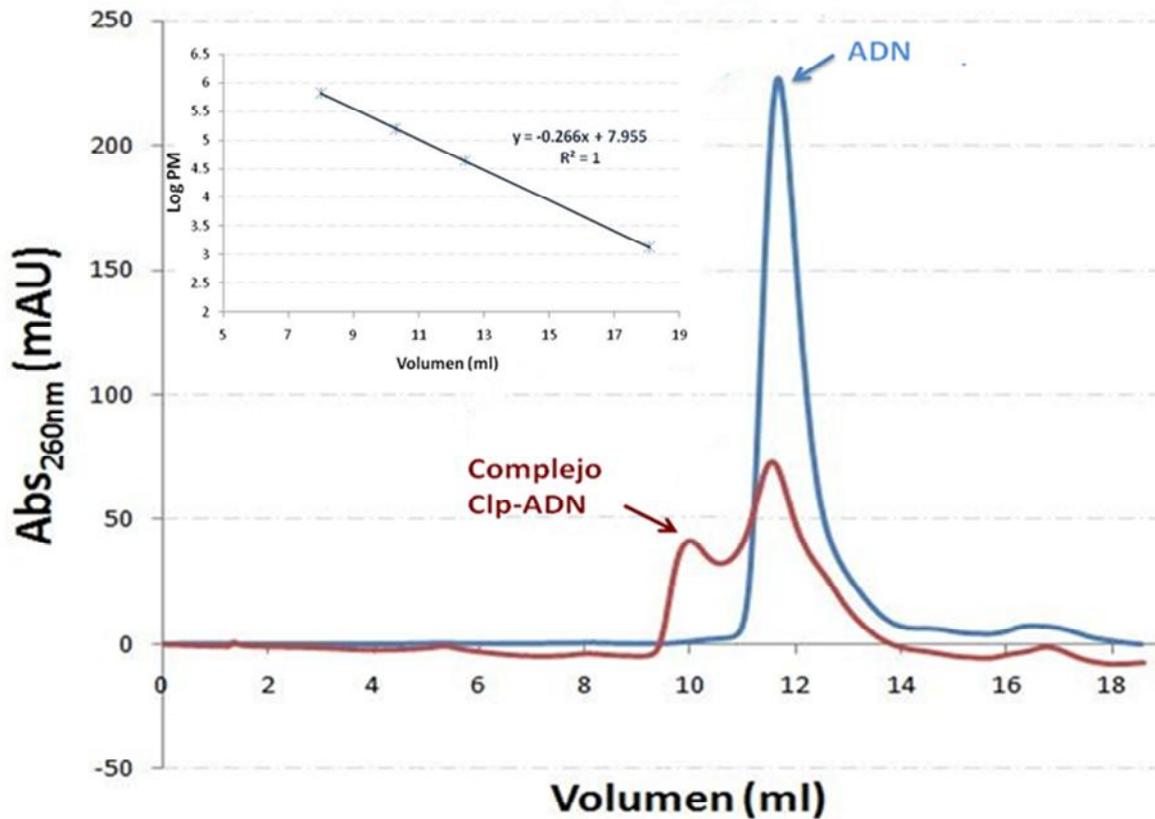
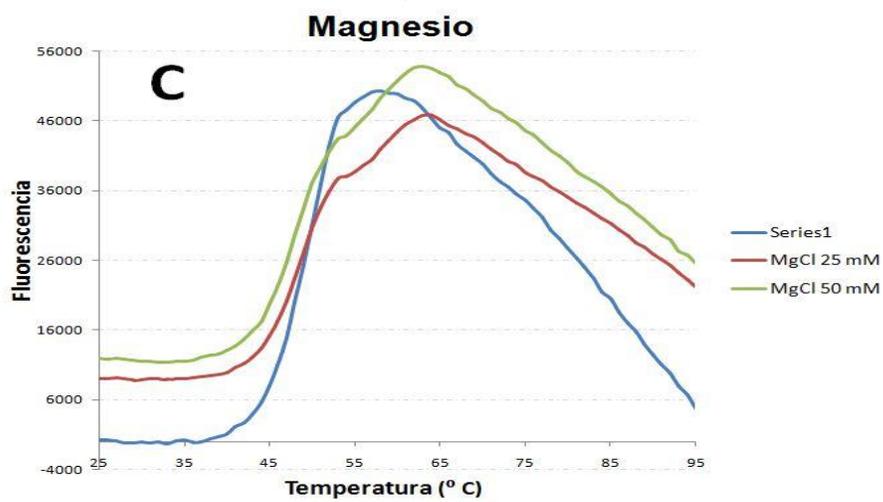
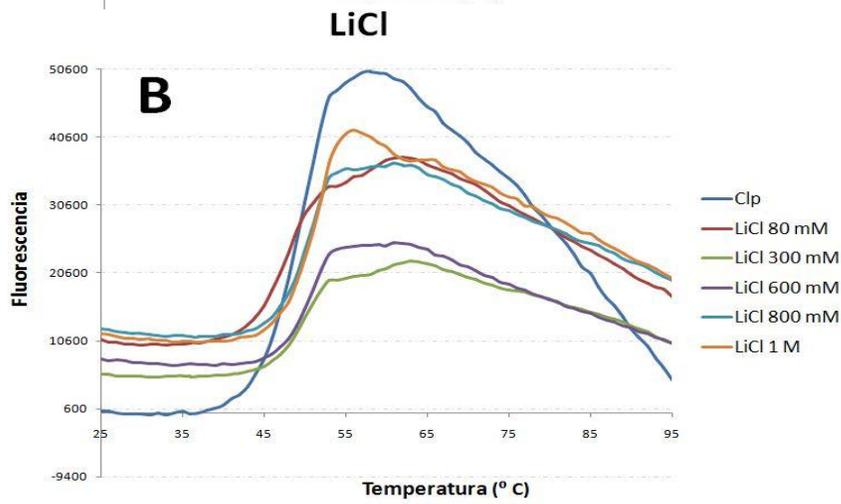
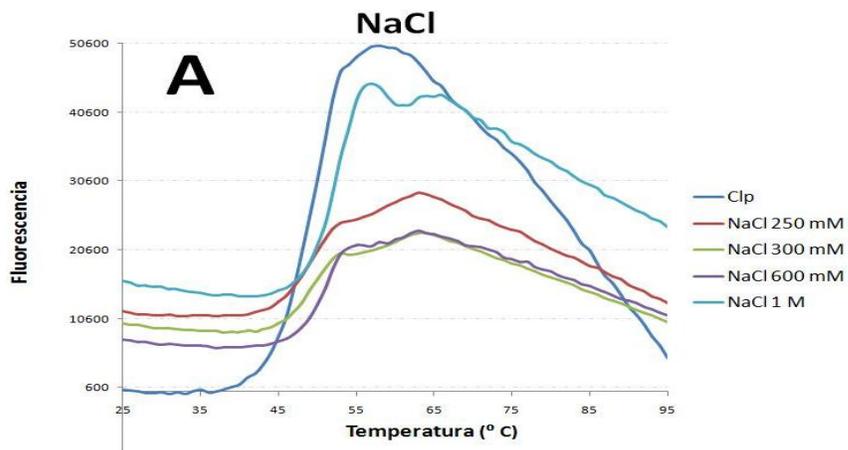
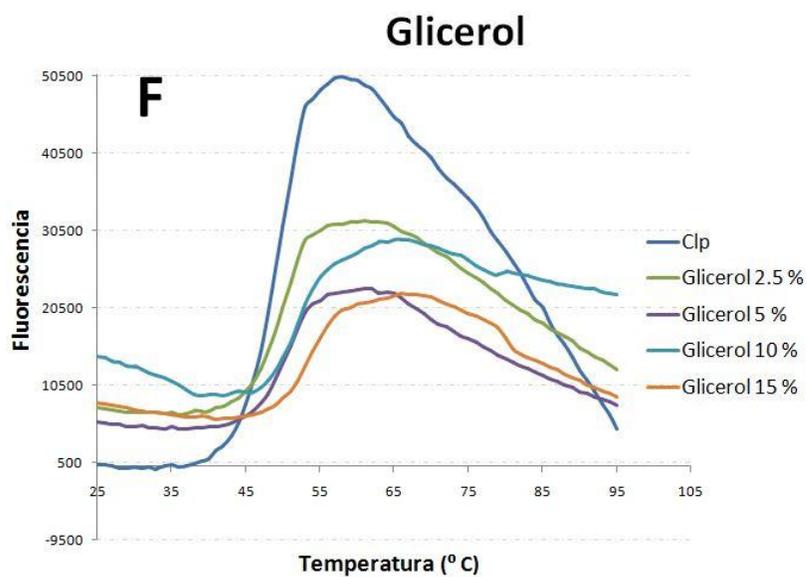
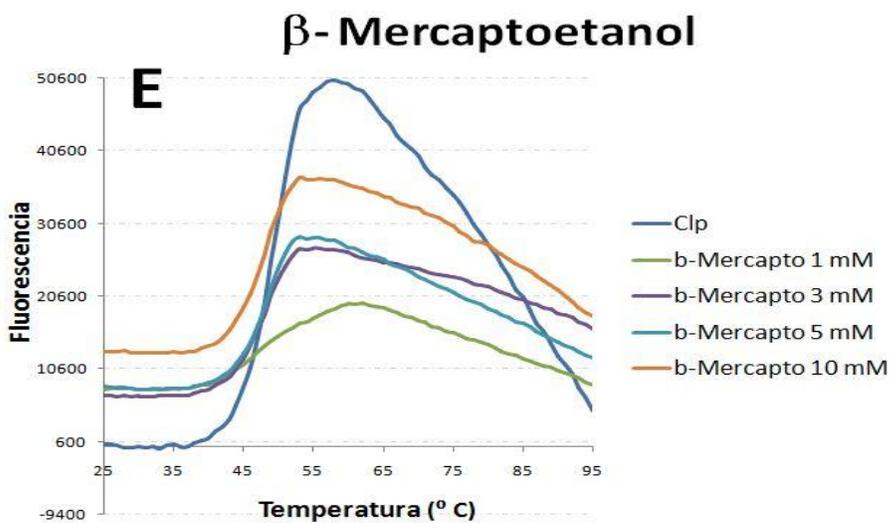
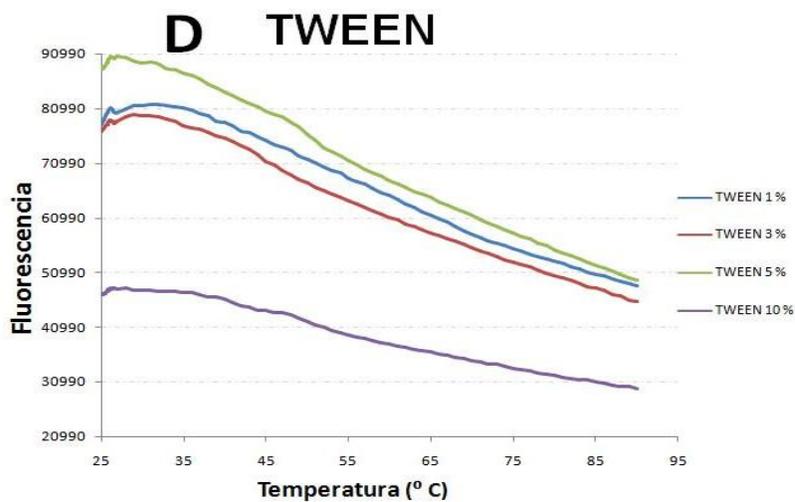


Figura 5. Ensayo de movilidad en filtración en gel.

En azul se muestra el cromatograma obtenido de la corrida del ADN de 38 pares de bases sin incubarse con Clp. En rojo se observa el cromatograma resultante de la corrida del complejo Clp-ADN en una relación 1:5 (ADN:Clp). Se observa cómo se recorre hacia la izquierda el pico del complejo con respecto al del ADN sin proteína, evidenciando que efectivamente hay una interacción entre el ADN y Clp, por lo que se puede afirmar que esta presenta actividad biológica. En el extremo superior izquierdo se insertó la curva de calibración de la columna Sephadex 75 en la que se realizó el experimento, a partir de la cual se pudieron estimar los pesos moleculares de las especies analizadas.





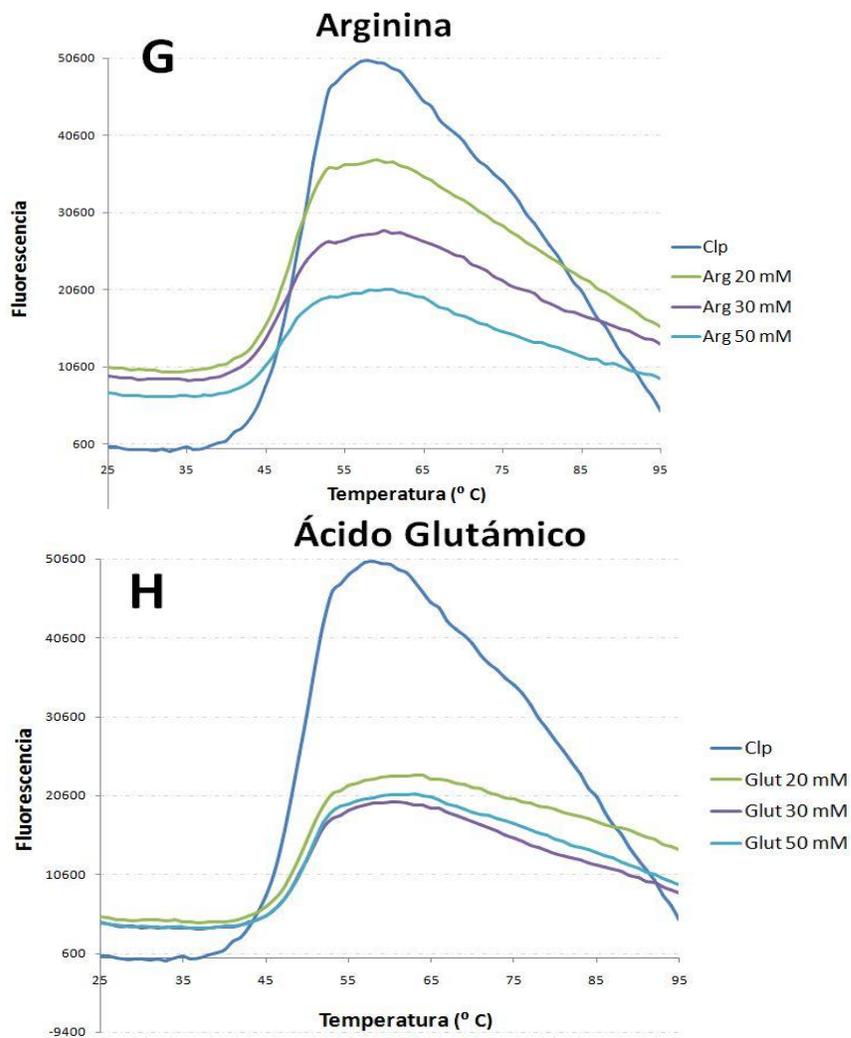


Figura 6. Análisis por Thermofluor de varios aditivos.
A NaCl. **B** LiCl. **C** Magnesio. **D** Tween. **E** β -Mercaptoetanol. **F** Glicerol. **G** Arginina.
H Ácido Glutámico. El ensayo se realizó con una concentración de Clp de 0.05 mg/ml. El fluoróforo utilizado fue Sypro Orange a una concentración de 5X

Tabla 2. Valores de Tm obtenidos por análisis de Thermofluor para distintos compuestos.

El valor de Tm se obtuvo por regresión no lineal utilizando la ecuación de Boltzman en las secciones sigmoideas de los espectros de fluorescencia obtenidos. El valor de Tm en amortiguador Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, LiCl 100 mM (Tm= 48) fue usado como referencia. Además de los expuestos en la tabla se evaluaron MgCl 10 mM, MgCl 15 mM, Tween 20 1, 3, 5 %. Sin embargo estos compuestos no favorecieron un aumento de la Tm.

Aditivos	Concentración	Tm (°C)
NaCl	300 mM	49
	600 mM	51
	800 mM	51
	1 M	53
Magnesio	25 mM	48
	50 mM	46
Litio	80 mM	47
	300 mM	50
	600 mM	50
	800 mM	51
	1 M	51
<u>β-mercaptoetanol</u>	1 mM	49
	3 mM	48
	5 mM	48
	10 mM	47
Glicerol	2.5 %	50
	5 %	52
	10 %	50
	15 %	53
Arginina	20 mM	48
	30 mM	47
	50 mM	47
Ácido Glutámico	20 mM	50
	30 mM	50
	50 mM	50

Referencias

- Agari, Y., Kashihara, A., Yokoyama, S., Kuramitsu, S., Shinkai, A., 2008. Global gene expression mediated by *Thermus thermophilus* SdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.* 70, 60–75. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06388.x
- Akimoto-Tomiyama, C., Furutani, A., Ochiai, H., 2014. Real time live imaging of phytopathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* MAFF106712 in “plant sweet home”. *PLoS One* 9, e94386. doi:10.1371/journal.pone.0094386
- Asherie, N., 2004. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods* 34, 266–272. doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.028
- Boch, J., Bonas, U., 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 419–436. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081936
- Boivin, S., Kozak, S., Meijers, R., 2013. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr. Purif.* doi:10.1016/j.pep.2013.08.002
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Chen, C.H., Lin, N.T., Hsiao, Y.M., Yang, C.Y., Tseng, Y.H., 2010. Two non-consensus Clp binding sites are involved in upregulation of the gum operon involved in xanthan polysaccharide synthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Res. Microbiol.* 161, 583–589. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.012
- Chin, K.H., Lee, Y.C., Tu, Z. Le, Chen, C.H., Tseng, Y.H., Yang, J.M., Ryan, R.P., McCarthy, Y., Dow, J.M., Wang, A.H.J., Chou, S.H., 2010. The cAMP Receptor-Like Protein CLP Is a Novel c-di-GMP Receptor Linking Cell-Cell Signaling to Virulence Gene Expression in *Xanthomonas campestris*. *J. Mol. Biol.* 396, 646–662. doi:10.1016/j.jmb.2009.11.076
- Cubero, J., Graham, J.H., 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1257–1264. doi:10.1128/AEM.68.3.1257-1264.2002
- de Crecy-Lagard, V., Glaser, P., Lejeune, P., Sismeiro, O., Barber, C.E., Daniels, M.J., Danchin, A., 1990. A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 172, 5877–83.

- Dong, Q., Ebright, R.H., 1992. DNA binding specificity and sequence of *Xanthomonas campestris* catabolite gene activator protein-like protein. *J. Bacteriol.* 174, 5457–61.
- Dupeux, F., Röwer, M., Seroul, G., Blot, D., Márquez, J.A., 2011. A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 67, 915–919. doi:10.1107/S0907444911036225
- Ebright, R.H., Ebright, Y.W., Gunasekera, A., 1989. Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. *Nucleic Acids Res.* 17, 10295–305.
- Golovanov, A.P., Hautbergue, G.M., Wilson, S.A., Lian, L., 2004. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8933–9. doi:10.1021/ja049297h
- Gomelsky, M., 2009. Cyclic-di-GMP-binding CRP-like protein: A spectacular new role for a veteran signal transduction actor. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01173-09
- He, Y.W., Ng, A.Y.J., Xu, M., Lin, K., Wang, L.H., Dong, Y.H., Zhang, L.H., 2007. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol. Microbiol.* 64, 281–292. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05670.x
- He, Y.-W., Ng, A.Y.-J., Xu, M., Lin, K., Wang, L.-H., Dong, Y.-H., Zhang, L.-H., 2007. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol. Microbiol.* 64, 281–92. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05670.x
- He, Y.W., Zhang, L.H., 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00120.x
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F., Harwood, C.S., 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14422–14427. doi:10.1073/pnas.0507170102
- Hsiao, Y.I.M., Fang, M.C., Sun, P.F., Tseng, Y.H., 2009. Clp and RpfF Up-regulate transcription of *pelA1* gene encoding the major pectate lyase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6207–6215. doi:10.1021/jf900701n
- Hsiao, Y.M., Liao, H.Y., Lee, M.C., Yang, T.C., Tseng, Y.H., 2005. Clp upregulates transcription of *engA* gene encoding a virulence factor in

- Xanthomonas campestris by direct binding to the upstream tandem Clp sites. FEBS Lett. 579, 3525–3533. doi:10.1016/j.febslet.2005.05.023
- Hsiao, Y.-M., Liao, H.-Y., Lee, M.-C., Yang, T.-C., Tseng, Y.-H., 2005. Clp upregulates transcription of engA gene encoding a virulence factor in Xanthomonas campestris by direct binding to the upstream tandem Clp sites. FEBS Lett. 579, 3525–33. doi:10.1016/j.febslet.2005.05.023
- Hsiao, Y.M., Zheng, M.H., Hu, R.M., Yang, T.C., Tseng, Y.H., 2008. Regulation of the pehA gene encoding the major polygalacturonase of Xanthomonas campestris by Clp and RpfF. Microbiology 154, 705–713. doi:10.1099/mic.0.2007/012930-0
- Kim, Y., Babnigg, G., Jedrzejczak, R., Eschenfeldt, W.H., Li, H., Maltseva, N., Hatzos-Skintges, C., Gu, M., Makowska-Grzyska, M., Wu, R., An, H., Chhor, G., Joachimiak, A., 2011. High-throughput protein purification and quality assessment for crystallization. Methods. doi:10.1016/j.ymeth.2011.07.010
- Kopec, J., Schneider, G., 2011. Comparison of fluorescence and light scattering based methods to assess formation and stability of protein-protein complexes. J. Struct. Biol. 175, 216–223. doi:10.1016/j.jsb.2011.04.006
- Leduc, J.L., Roberts, G.P., 2009. Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of Xanthomonas axonopodis pv. citri. J. Bacteriol. 191, 7121–7122. doi:10.1128/JB.00845-09
- Lu, X.H., An, S.Q., Tang, D.J., McCarthy, Y., Tang, J.L., Dow, J.M., Ryan, R.P., 2012. RsmA Regulates Biofilm Formation in Xanthomonas campestris through a Regulatory Network Involving Cyclic di-GMP and the Clp Transcription Factor. PLoS One 7. doi:10.1371/journal.pone.0052646
- Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Wood, J.F., Rollence, M.L., Finzel, B.C., Gilliland, G.L., Poulos, T.L., 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. doi:10.1021/bi00422a004
- Phillips, K., de la Peña, A.H., 2011. The combined use of the thermofluor assay and thermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. Curr. Protoc. Mol. Biol. doi:10.1002/0471142727.mb1028s94
- Popovych, N., Tzeng, S.-R., Tonelli, M., Ebright, R.H., Kalodimos, C.G., 2009. Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 6927–6932. doi:10.1073/pnas.0900595106

- Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., Weiss, M.S., 2013. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69, 209–214. doi:10.1107/S1744309112051858
- Romling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M., 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 1–52. doi:10.1128/MMBR.00043-12
- Rott, P., Fleites, L.A., Mensi, I., Sheppard, L., Daugrois, J.H., Dow, J.M., Gabriel, D.W., 2013. The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugar cane stalks by *Xanthomonas albilineans*. *Microbiol. (United Kingdom)* 159, 1149–1159. doi:10.1099/mic.0.065748-0
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.-W., Zhang, L.-H., Heeb, S., Cámara, M., Williams, P., Dow, J.M., 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6712–7. doi:10.1073/pnas.0600345103
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., Römling, U., 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessibility to motility. *Mol. Microbiol.* 53, 1123–1134. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x
- Tao, F., He, Y.W., Wu, D.H., Swarup, S., Zhang, L.H., 2010. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J. Bacteriol.* 192, 1020–1029. doi:10.1128/JB.01253-09
- Weber, I.T., Steitz, T.A., 1987. Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 198, 311–326. doi:10.1016/0022-2836(87)90315-9
- Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P., Benziman, M., 1997. C-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett.* 416, 207–211. doi:10.1016/S0014-5793(97)01202-7
- Wingfield, P.T., 2015. Overview of the purification of recombinant proteins., *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*. doi:10.1002/0471140864.ps0601s80
- Zhang, L.-H., 2010. A novel C-di-GMP effector linking intracellular virulence regulon to quorum sensing and hypoxia sensing. *Virulence* 1, 391–4. doi:10.4161/viru.1.5.12487

Anexos

Anexo 1. Figuras Suplementarias

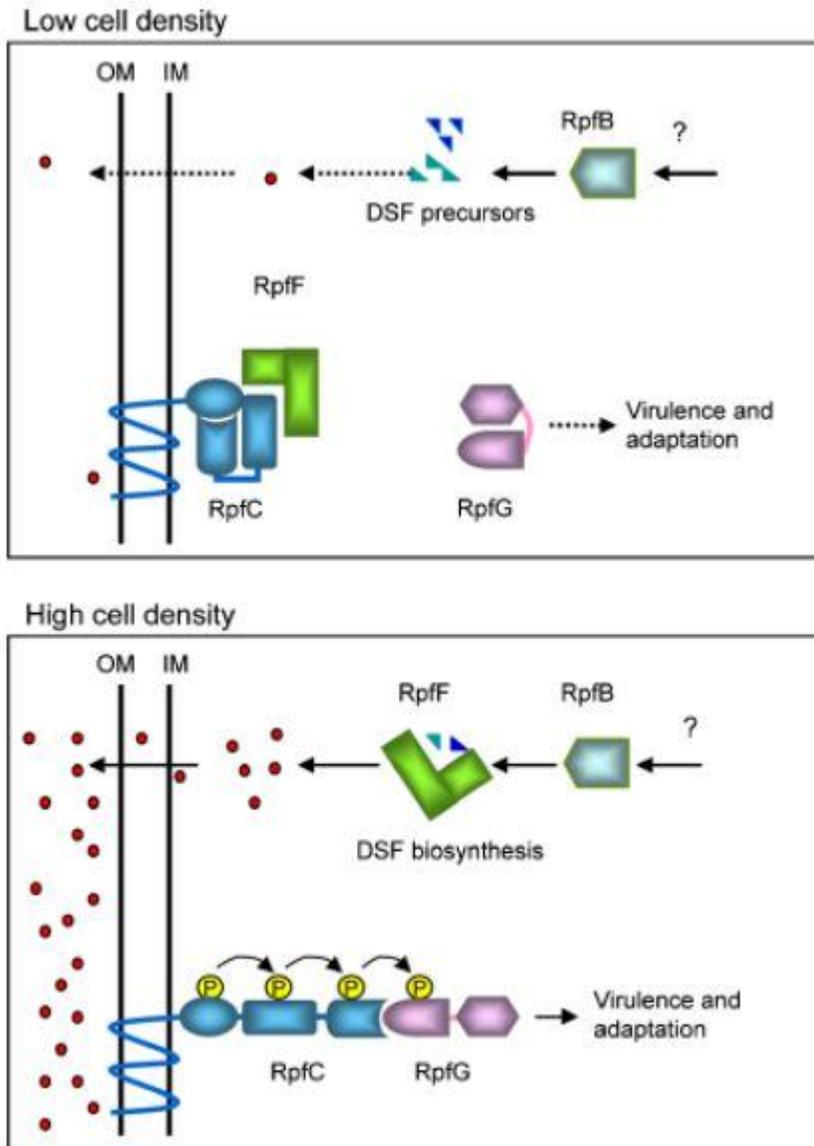


Figura Suplementaria 1. Representación esquemática de un modelo de la autoinducción de la señal del DSF.

A baja densidad celular, el receptor del DSF, RpfC, forma un complejo con la sintasa RpfF, impidiendo a la enzima una síntesis efectiva de DSF. A alta densidad bacteriana, el factor DSF extracelular acumulado interacciona con RpfC e induce un cambio conformacional en el receptor que conlleva su autofosforilación y facilita la liberación de RpfF, lo que favorece la síntesis de más DSF. Tomado de He and Zhang, 2008



Figura Suplementaria 2. Digestión con pps.

SDS-PAGE de la digestión de Clp6XHis con la proteasa PPS. En el primer carril se muestra el resultado de la elución por IMAC en que se encuentra Clp6XHis. El segundo carril muestra el resultado de la digestión de CLP6XHis con la proteasa PPS, realizado utilizando 5 unidades de enzima por mililitro de proteína con agitación a 4 °C durante 12 horas.

Anexo 2. Protocolo de purificación de Clp recombinante

Reactivos

Medio LB
IPTG
lisozima
1M tris, pH 8.0
5M NaCl
5M LiCl
5M KCl
1M DTT
100 mM PMSF

Amortiguador de Lisis

50 mM Tris-HCl pH 8.0
500 mM KCl
4 mg/mL lisosima

Amortiguador de IMAC

20 mM tris-HCl pH 8.0
250 mM NaCl
100 mM LiCl
0.5 mM DTT
1 mM PMSF

Amortiguador de intercambio iónico

A: 20 mM tris-HCl pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM PMSF
0.5 mM DTT
B: 20 mM tris-HCl pH 8.0
1M NaCl
1 mM PMSF
0.5 mM DTT

Amortiguador de exclusión molecular

20 mM tris-HCl pH 8.0
250 mM NaCl
100 mM LiCl

0.5 mM DTT
1 mM PMSF

Amortiguador de almacenamiento de columnas

0.02% NaN₃
1X amortiguador

Otros

Vector pET28PPS
Cepa BL21 (DE3) Star de *E. Coli*
Proteasa PPS

Procedimiento

1. Transformar cepas BL21 (DE3) Star de *E. coli* con vector pET28PPS-Clp mediante protocolo de choque térmico
2. Expresar induciendo con 0.4 mM de IPTG a 28 °C durante 16 horas. Centrifugar después de este tiempo y guardar botones de células a -20 °C.
3. Sonicar células de 500 mL de cultivo en amortiguador de lisis a 60% de amplitud durante 60 ciclos con 15 segundos ON y 45 segundos OFF. Centrifugar al final a 4 °C durante 15 minutos a 12 000 rpm.
4. Aplicar sobrenadante a una columna de IMAC, aplicando un lavado de 10 VC de imidazol 10 mM, seguido de 7 VC de imidazol 50 mM y eluir con 6 VC de imidazol 500 mM. Unir fracciones de la elución.
5. Digerir con PPS utilizando 5 unidades por mL de proteína, incubando con agitación a 4°C durante 12 horas.
6. Concentrar hasta un volumen de 5 ml, desalar la muestra en amortiguador A y realizar intercambio iónico eluyendo con gradiente lineal de 0 a 100%

de amortiguador B. Colectar fracciones de 1 ml, analizarlas y unir las que tengan la proteína

7. Concentrar e inyectar a columna de exclusión molecular, colectando las fracciones de 3 ml y analizarlas por SDS-PAGE.
8. Concentrar y conservar a 4⁰C.