



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Caracterización de la interacción de las proteínas  
G0S2 y Bcl-2**

Tesis que presenta  
**Liliana Gómez Pacheco**

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., julio de 2022



## **Constancia de aprobación de la tesis**

La tesis “**Caracterización de la interacción de las proteínas G0S2 y Bcl-2**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Liliana Gómez Pacheco** y aprobada el **24 de junio de 2022** 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. Guillermo Pastor Palacios**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Miembro del Comité Tutorial

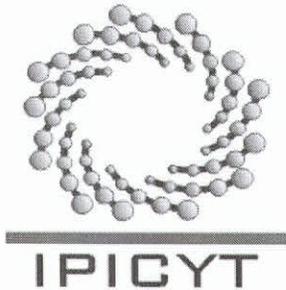


## **Créditos Institucionales**

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 (1007798) 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 y por el proyecto CONACYT INFRA-2013-01 No 204373.



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

## Acta de Examen de Grado

La Secretaría Académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 231 del Libro Segundo 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 8 días del mes de julio del año 2022, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Samuel Lara González</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Guillermo Pastor Palacios</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>IPN</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Liliana Gómez Pacheco**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización de la interacción de las proteínas G0S2 y Bcl-2*

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 17:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe la Secretaría Académica 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 8 días del mes de julio de 2022.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Secretaria Académica



## **Dedicatorias**

A mi familia, a mis papás Arturo y Graciela, gracias por apoyarme en lo que me propongo y por ayudarme a cumplir mis metas, gracias a su esfuerzo he cumplido con este gran logro. A mis hermanos, Arturo y Carolina, gracias por estar una vez más en un momento tan importante y por su cariño. A Bobby, gracias por tu lealtad e incondicionalidad; y a Darwin.

A Iván, gracias por siempre estar y por tu apoyo.

A mis amigos y compañeros que conocí durante esta etapa, gracias por los buenos momentos.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada No. 1007798

.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Al Dr. Samuel Lara González, por permitirme ser parte de su laboratorio, por compartirme sus conocimientos y por la dirección y apoyo de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Lina Riego Ruiz y al Dr. Guillermo Pastor Palacios, por las aportaciones en la tesis.

A mis compañeros del laboratorio, por su apoyo y contribuciones.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Optimización de la secuencia del gen Bcl-2 de ratón.	8
Clonación de la secuencia codificante del gen de Bcl-2 de ratón en el vector pET28pps	8
Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína mBcl-2	9
Purificación de la proteína recombinante mBcl-2	10
Purificación de la proteína recombinante mG0S2	11
Dispersión dinámica de luz de mBcl-2 y del complejo mG0S2/mBcl-2	13
Análisis de la interacción entre mBcl-2 y mG0S2 por cromatografía de exclusión molecular.	14
Ensayo de cristalización	14
RESULTADOS	16
Optimización de la secuencia del gen Bcl-2 de ratón.	16
Clonación de Bcl-2 de ratón	16
Expresión de Bcl-2 de ratón	17
Purificación de Bcl-2 de ratón	17
Purificación de G0S2 de ratón	18
Análisis mediante dispersión dinámica de luz de mBcl-2 y del complejo mG0S2/mBcl2	19
Análisis de la interacción del complejo proteico mediante cromatografía de exclusión molecular	20
Ensayos de cristalización	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIÓN	27
REFERENCIAS	35

## **Lista de tablas**

Tabla 1. Parámetros de optimización de la secuencia de Bcl-2 de ratón.	28
--	----

## Lista de figuras

Fig. 1. Clonación y expresión de la secuencia codificante del gen Bcl-2 de ratón.	29
Fig. 2. Purificación de mBcl-2.	30
Fig. 3. Purificación de mG0S2.	31
Fig. 4. Análisis de mBcl-2 y su interacción con mG0S2 mediante DLS.	32
Fig. 5. Análisis de la interacción del complejo mBcl-2/mG0S2 mediante cromatografía de exclusión molecular.	33
Fig. 6. Formación de un posible crecimiento de cristales del complejo mBcl-2/mG0S2.	34

# Resumen

## Caracterización de la interacción de las proteínas G0S2 y Bcl-2

La proteína G0S2, es una molécula de bajo peso molecular que es codificada por el gen *switch 2 G0/G1*. Se han realizado varios estudios para conocer con más detalle la función de G0S2 y los mecanismos moleculares en los que se ve implicada. A la fecha, la función mejor conocida de G0S2 ocurre en el metabolismo de los lípidos, principalmente sobre su capacidad inhibitoria en la actividad de ATGL, la lipasa esencial de la lipólisis. G0S2 está involucrada en diversos procesos celulares como la fosforilación oxidativa, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. En la apoptosis, G0S2 participa interaccionando directamente con la proteína antiapoptótica Bcl-2 promoviendo la disociación del complejo Bcl-2/Bax. Sin embargo, los detalles moleculares de dicha interacción no se conocen. Es por ello que, el objetivo de este trabajo fue analizar la interacción de G0S2 con Bcl-2 por dispersión dinámica de luz (DLS) y exclusión molecular (SEC). Para la obtención de la proteína recombinante, el gen que codifica para la proteína Bcl-2 de ratón (mBcl-2) se clonó en el vector pET28pps, para ser expresado en células competentes de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) star mediante una inducción con IPTG a 1 mM. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel, y de exclusión molecular. La purificación de la proteína G0S2 de ratón (mG0S2) fue realizada sucesivamente mediante cromatografía de afinidad a níquel, intercambio catiónico y SEC. Como resultado del proceso de purificación, se obtuvo un rendimiento de 9 y 0.25 miligramos de proteína por litro de cultivo para Bcl-2 y G0S2, respectivamente. Se observó por DLS que Bcl-2 se encuentra conformada como dímero en solución; sin embargo, cuando interacciona con mG0S2, el homodímero es disociado para formar el heterodímero mBcl-2/mG0S2. Estos resultados fueron confirmados por SEC. Para comprender aún más como se da la interacción entre las proteínas mBcl-2 y mG0S2, es necesario obtener la estructura cristalográfica del complejo que forman.

**Palabras clave:** apoptosis, interacción proteína-proteína, Bcl-2, G0S2.

## Abstract

### Characterization of the interaction between G0S2 and Bcl-2 proteins

G0S2 is a low molecular weight protein encoded by the *G0/G1 switch 2 gene*. Different studies have been carried out to learn more about the function of G0S2 and the molecular mechanisms in which it is involved. The best-known function of G0S2 occurs in lipid metabolism, mainly on its inhibitory capacity in the activity of ATGL, the essential lipase of lipolysis. G0S2 is involved in several cellular processes such as oxidative phosphorylation, proliferation, differentiation, and apoptosis. The aim of this work was to analyze the interaction between G0S2 and Bcl-2 by dynamic light scattering (DLS) and size exclusion chromatography (SEC). To obtain the recombinant protein, the gene that codes for the mouse Bcl-2 protein was cloned in the pET28pps vector for its further expression in competent cells of the *E. coli* BL21 (DE3) star strain by induction with IPTG at 1 mM. The protein was purified by nickel affinity chromatography followed by size exclusion chromatography. Purification of mouse G0S2 protein was successively performed by nickel affinity, cation exchange, and size exclusion chromatography. As a result of the purification process, a yield of 9 and 0.25 milligrams of protein per liter of culture was obtained for Bcl-2 and G0S2, respectively. It was observed by DLS that mBcl-2 is a dimer in solution; however, when it interacts with mG0S2, the homodimer is dissociated to form the heterodimer mBcl-2/mG0S2. To further understand how the interaction between mBcl-2 and mG0S2 proteins occurs, it is necessary to obtain the crystallographic structure of the protein complex.

**Keywords:** apoptosis, protein-protein interaction, Bcl-2, G0S2

## INTRODUCCIÓN

G0S2 es una proteína codificada por el gen *switch 2 G0/G1*, tiene 103 aminoácidos y su peso molecular es de 11 kDa (Russell y Forsdyke, 1991). En cuanto a la predicción de su estructura secundaria, cuenta con 2  $\alpha$ -hélices separadas por una región hidrofóbica, con un potencial de generar giros y asumir una conformación de hoja  $\beta$ . La función que inicialmente se le atribuyó en células mononucleares cuando Russell y Forsdyke la caracterizaron en 1991, fue su participación en la transición de la fase G0 a la G1 del ciclo celular, mediante la inducción por lectinas (Russell y Forsdyke, 1991). En estudios posteriores se ha descubierto que G0S2 se encuentra localizada en diversos compartimentos celulares como la mitocondria, el citosol, el retículo endoplásmico y en las gotas de lípidos (Heckmann et al., 2013).

Recientemente, se ha reportado que G0S2 es una proteína intrínsecamente desordenada, es decir, que carecen de una estructura terciaria estable. Mediante un análisis *in silico* en el servidor de MetaDisorder GeneSilico, se determinó que las regiones N- y C- terminal de G0S2 de humano y de ratón tienden a ser desordenadas. Sin embargo, el C- terminal de G0S2 de ratón muestra una menor tendencia al desorden que la de humano. De igual manera, también se observó, mediante dicroísmo circular, que G0S2 de ratón y de humano poseen propiedades características de proteínas intrínsecamente desordenadas (Páez-Pérez et al., 2020). Una cuestión fundamental de mencionar es que G0S2 al ser una proteína intrínsecamente desordenada, le permite interactuar como efector con diversas moléculas que tienen una función regulatoria (Páez-Pérez et al., 2020).

Una de las funciones más estudiadas de G0S2 es su participación en el metabolismo de los lípidos, en el cual tiene un papel inhibitor en la lipólisis al interactuar con la lipasa adiposa de triglicérido (ATGL), incluso en presencia de la proteína activadora (CGI-58) (Yang et al., 2010). G0S2 interactúa mediante su dominio hidrofóbico (residuos del 27 al 42) con el dominio patatin-like de ATGL (residuos 10 al 178). Esta región de interacción fue identificada mediante la utilización de mutantes truncas de G0S2 y ATGL, del dominio hidrofóbico y patatin-like, respectivamente, lo cual evitó la interacción de ambas proteínas (Yang et al., 2010).

Otro proceso celular importante donde G0S2 actúa es en la proliferación celular. En un estudio en células madre hematopoyéticas de médula ósea, se determinó que G0S2 se expresa y que su dominio hidrofóbico interactúa con el dominio rico en Arg-Gly-Gly de la nucleolina, la cual es una proteína multifuncional que regula varios aspectos del metabolismo del ADN y el ARN. La interacción dio lugar a una reducción en la proliferación. Mediante mutaciones en ambas proteínas, se observó que G0S2 con su dominio hidrofóbico intacto, solo interactuó con las mutantes que contenían el dominio rico en Arg-Gly-Gly de la nucleolina. Por otro lado, cuando G0S2 es sobreexpresada, mantiene un estado de quiescencia en las células madre hematopoyéticas. El silenciamiento de la expresión endógena de G0S2 en las células de la médula ósea promovió la división celular, lo que respalda el papel inhibitor de G0S2 (Yamada et al., 2014).

También se conoce que G0S2 provoca un aumento en la producción de ATP como protección frente a un estímulo de estrés como condiciones de hipoxia, inanición y la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al interactuar con las subunidades del complejo ATP

sintasa, esto se observó en un cultivo de cardiomiocitos de rata y en un cultivo de células epiteliales de cordón umbilical humano, respectivamente. Mediante técnicas como construcciones truncas, inmunohistoquímica y coimmunoprecipitación se determinó que G0S2 interactúa con el complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa mediante su dominio hidrofóbico (Kioka et al., 2014; Wang et al., 2015).

Por otro lado, se ha descrito que G0S2 interacciona con la proteína antiapoptótica Bcl-2, lo que conlleva a la disociación del complejo Bcl-2/Bax, y así dar inicio a la apoptosis (Welch et al., 2009). La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es el proceso en el cual una serie de moléculas iniciadoras y ejecutoras, en respuesta a señales regulatorias o inducidas por algún estrés (por ejemplo: la ausencia de factores de crecimiento, citocinas y hormonas, la exposición a radiación y condiciones de hipoxia), promueven que la célula se autodestruya. Por lo cual, se considera que la apoptosis ejerce un papel protector frente a posibles enfermedades (Rager, 2015). Debido a las diferentes señales de estrés que una célula recibe, se activa la vía intrínseca y se expresan las proteínas conocidas como “solo BH3” como Bid, Bim y Puma, cuya función es unirse a los factores antiapoptóticos como Bcl-2 con el propósito de liberar a las proteínas proapoptóticas como Bax o Bak, que previamente habían sido secuestradas por Bcl-2. Cuando Bax o Bak quedan liberados, ocurre su oligomerización, lo que conduce a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, liberando el citocromo c. Después de la liberación del citocromo c, se forma el apoptosoma, el cual es un complejo proteico compuesto por el citocromo c, el factor APAF-1 y la procaspasa 9 dando como resultado la conversión de la procaspasa 9 a caspasa 9 (Pfeffer y Singh, 2018). La caspasa 9 es la encargada de iniciar esta vía, activando a la

caspasa 3, cuya función consiste en ejecutar la apoptosis por medio de la activación de endonucleasas y proteasas que dará como resultado la degradación del ADN y del citoesqueleto (Fulda y Debatin, 2006).

En la vía intrínseca de la apoptosis participan las proteínas de la familia Bcl-2, integrada por proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, las cuales comparten similitud de secuencia dentro de las regiones conservadas conocidas como “dominios de homología Bcl-2” (BH). Existen cuatro dominios: BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales tienen una estructura de tipo  $\alpha$  hélice, que dicta su función (Danial, 2007). Las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, cuentan con los cuatro dominios BH; de estos, se ha determinado que el dominio BH4 es requerido exclusivamente para la función antiapoptótica. Las proteínas proapoptóticas como Bax y Bak solo cuentan con los dominios BH3, BH2 y BH1. Además, existe otro grupo de proteínas proapoptóticas llamadas “solo BH3”, ya que únicamente poseen el dominio BH3 como es el caso de Bim, Bid, Puma, Noxa y Bad (Adams y Cory, 2007).

Bcl-2 es codificada por el gen *BCL2* (linfoma de células B 2), consta de 239 aminoácidos, y tiene un peso molecular de 26 kDa (Cang et al., 2015). Bcl-2 inhibe la muerte celular, este descubrimiento modificó la forma de abordar la patología del cáncer, ya que dio origen a la noción de que el desarrollo de un tumor podría deberse no solo a una proliferación ilimitada, sino también a una apoptosis alterada (Tzifi et al., 2012). La estructura de Bcl-2 consta de 6  $\alpha$ -hélices; además se conoce que adopta una estructura terciaria conservada con respecto a las proteínas de la familia Bcl-2. La proteína Bcl-2 posee un surco de unión hidrofóbico en el dominio BH3, el cual actúa como receptor para los dominios BH de otras proteínas apoptóticas (Petros et al., 2001; Kale et al., 2018). También se ha reportado que

Bcl-2 interacciona con otras proteínas que están relacionadas indirectamente con el proceso de la apoptosis, la interacción la realiza mediante su dominio BH4. Se ha descrito que Bcl-2 interacciona mediante su dominio BH4 con el receptor inositol 1,4,5- trifosfato (IP3R) de canal de calcio, para inhibir la elevación proapoptótica sostenida de calcio sin interferir con las oscilaciones de calcio necesarias para la supervivencia. Bcl-2 también interactúa por medio de su dominio BH4 con diversas proteínas como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que es un factor de transcripción que lleva a cabo una función antiapoptótica en las células de los mamíferos. Otro ejemplo de interacción es con la proteína quinasa serina/treonina (Raf-1) que tiene un papel importante en la apoptosis y el ciclo celular (Rong et al. 2009).

La participación de G0S2 en la apoptosis es mediante la interacción con la proteína Bcl-2, la cual ha sido comprobada mediante varios experimentos que involucran técnicas de coimmunoprecipitación, métodos de detección de apoptosis, construcciones truncas y mutaciones puntuales. En una línea celular de células de riñón embrionario (HEK293) que fueron transfectadas con plásmidos que sobreexpresaban a G0S2 (marcado con la etiqueta HA) y un miembro de la familia Bcl-2 (marcado con la etiqueta FLAG), G0S2 se inmunoprecipitó con el anticuerpo  $\alpha$ -HA, además el inmunoprecipitado se analizó por inmunotransferencia con el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG para observar la interacción con miembros de la familia Bcl-2 como Bak, Bax, Bad, Bid, Mcl-1, Bcl-xL y Bcl-2. De las proteínas analizadas, solamente Bcl-2 fue detectada en el inmunoprecipitado de G0S2 (Welch et al., 2009). La interacción de Bcl-2 con G0S2 también fue confirmada con las técnicas de FRET y pull-down (Welch et al., 2009).

Para determinar la región de interacción de G0S2 con la proteína Bcl-2, se realizaron construcciones truncas de G0S2. Por medio de experimentos de co-inmunoprecipitación, se observó que solo las construcciones que contenían la región central de G0S2 (aminoácidos 33-67) podían interactuar con Bcl-2 (Welch et al., 2009). El mecanismo por el cual G0S2 es capaz de inducir la apoptosis se investigó si tiene relación con el heterodímero Bcl-2/Bax, ya que Bcl-2 interacciona con otros miembros de la familia Bcl-2 para evitar que desencadenen su actividad proapoptótica. En un experimento de co-inmunoprecipitación, se observó que la adición de G0S2 inhibía la capacidad de que Bcl-2 y Bax coinmunoprecipitaran, lo que sugiere que G0S2 inhibe la función de Bcl-2 de unirse con Bax y formar el complejo (Welch et al., 2009). Dentro del dominio hidrofóbico de G0S2, realizaron varias mutaciones en los aminoácidos sustituyendo por una alanina a la arginina y al ácido aspártico de los residuos 57 y 58 respectivamente, originando a las mutantes R57A y D58A, se observó que dichas mutantes redujeron drásticamente la interacción con Bcl-2 (Welch et al., 2009). Sin embargo, aún faltan por investigar varios aspectos moleculares sobre la interacción entre Bcl-2 y G0S2. Por ejemplo, aún no se ha reportado la estequiometría, el peso molecular del complejo o la constante de afinidad de la interacción (Kd), entre otros.

En este trabajo, nos propusimos estudiar la interacción de las proteínas Bcl-2 y G0S2 mediante la técnica de dispersión dinámica de luz y cromatografía de exclusión molecular. Para esto, optimizamos la secuencia de la proteína Bcl-2 de ratón (mBcl-2) para su expresión en cultivos bacterianos. Establecimos el protocolo de expresión de Bcl-2 y G0S2 a partir del vector pET28pps y su subsecuente purificación en columnas de afinidad, de intercambio iónico y de exclusión

molecular. Este trabajo confirma que existe una interacción física entre las dos proteínas, y sienta las bases para estudios posteriores de cristalogénesis encaminados a resolver la estructura del complejo proteico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Optimización de la secuencia del gen Bcl-2 de ratón.**

La secuencia de Bcl-2 de ratón, que abarca del residuo 1 al 211 eliminando la región C- terminal de unión a la membrana, fue utilizada para ser analizada en los servidores Gen Script (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>) e IDT DNA (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>), con el propósito de optimizar el uso de codones para su posterior expresión en células de *E. coli*, debido a que fue el sistema de expresión empleado. También, se analizó el porcentaje de GC y la distribución de frecuencia de codones, para determinar los parámetros necesarios para una correcta transcripción y traducción de la proteína de interés.

### **Clonación de la secuencia codificante del gen de Bcl-2 de ratón en el vector pET28pps**

La secuencia codificante de la proteína Bcl-2 de ratón (mBcl-2) del residuo 1 al 211, fue sintetizada por Integrated DNA Technologies (IDT), para ser clonada en el vector de expresión pET28pps. Además, se eliminó la región C- terminal que es de unión a la membrana. Para la clonación, se digirieron por separado 360 ng del vector y 80 ng del inserto con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* (New England Biolabs). La incubación con las enzimas fue a 37 °C durante 2 h y finalmente a 80° C durante 20 min. Posteriormente, se realizó una reacción de ligación con la ADN ligasa T4 (New England Biolabs), con una relación molar 1:3 (vector: inserto), la reacción se incubó a 16° C durante 16 h. La reacción de ligación fue tratada con la enzima de restricción *BamHI* (New England Biolabs) para eliminar posibles

religaciones del vector, a de 37 °C durante 1 h y posteriormente se inactivó a 65 °C durante 20 min.

La reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa *E. coli* TOP10 mediante choque térmico. Esto consistió en añadir 2 µL de la reacción de ligación al vial de las células competentes, y posteriormente se colocó en hielo durante 20 min, seguido de una incubación a 42 °C por 45 s, finalmente se colocaron en hielo por 3 min y se añadieron 300 µL de medio LB. Las células tratadas se incubaron a 37 °C durante 1 h con agitación de 180 rpm. Las bacterias se sembraron en placas de agar LB con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 h. Las colonias que crecieron se evaluaron por PCR de colonia con los oligonucleótidos T7 forward y reverse para corroborar que el inserto deseado estuviera presente. A partir de las colonias positivas, se realizó una extracción de plásmido, utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). El plásmido purificado se digirió con las enzimas *NdeI* y *HindIII* para verificar que el inserto del gen de interés estuviera correctamente ligado. Adicionalmente, el plásmido fue secuenciado por el método de Sanger, utilizando los oligonucleótidos T7 forward y reverse. La construcción se denominó pET28pps\_mBcl-2.

### **Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína mBcl-2**

Para evaluar la expresión de la proteína mBcl-2 se transformaron células competentes *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) star con la construcción pET28pps\_mBcl2 mediante choque térmico. Las células transformadas se inocularon en 5 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL) a 37 °C, 180 rpm durante 18 h. El preinóculo obtenido se utilizó para inocular 100 mL de medio LB adicionado con kanamicina a (50µg/mL). Cuando el cultivo celular alcanzó una

densidad óptica a 600 nm de entre 0.6-0.8, se indujo la expresión mediante la adición de IPTG 1 mM. Posteriormente, las células se incubaron a 16 °C y 180 rpm durante 18 h. Después, las células se recolectaron por centrifugación a 6,000 rpm durante 10 min a 4 °C y fueron almacenadas a -20 °C.

La pastilla celular se resuspendió en amortiguador de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0.5 % CHAPS, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5 % glicerol) y se sonicó a 50% de amplitud con periodos 15 s ON/45 s OFF durante 7 min 30 s a 4 °C. El lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min a 4 °C. Para el análisis de la solubilidad de la proteína, se tomaron muestras de las fracciones del lisado y del sobrenadante, y se evaluaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) a una concentración de 15%, bajo condiciones reductoras. A las muestras se les adicionó amortiguador de carga (0.5 M Tris pH 6.8, SDS 10%, glicerol 10%, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y azul de bromofenol al 1%) a una misma proporción (1:1). Las muestras se incubaron a 95 °C durante 10 min antes de cargar en el gel.

### **Purificación de la proteína recombinante mBcl-2**

La proteína mBcl-2 se expresó en un litro de cultivo de células *E. coli* BL21 (DE3) star, siguiendo las condiciones previamente mencionadas. El sobrenadante del lisado celular se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel, la columna de agarosa Ni-NTA fue equilibrada previamente con el amortiguador de lisis. La columna se lavó con 6 volúmenes de columna (CV) con el amortiguador de lisis. La elución se realizó siguiendo un gradiente escalonado de elución en aumento de concentración de imidazol (50, 250 y 500 mM) preparado en el amortiguador de lisis.

Las fracciones se recolectaron y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones donde eluyó la proteína se mezclaron y se incubaron con 5 unidades/mL de proteasa PPS a 4 °C durante toda la noche para la escisión de la etiqueta de histidinas. Se tomaron muestras antes y después de la reacción con la proteasa para ser evaluadas por SDS-PAGE.

Posteriormente, la proteína se concentró utilizando un Vivaspin Turbo 15 (Sartorius) con corte 10 kDa, para ser purificada por cromatografía de exclusión molecular mediante la columna Superdex 75 utilizando el sistema de purificación AKTA (GE Healthcare). Para ello, se realizó la corrida en el amortiguador (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5% glicerol y 0.5 mM EDTA) a un flujo de 0.6 mL/min. La elución de la proteína se monitoreó a 280 nm y se registró el cromatograma mediante el software UNICORN. Se tomaron muestras de las fracciones de elución para ser analizadas mediante SDS-PAGE. Una vez que se confirmó en cuales fracciones se encontraba la proteína purificada, se concentraron con un Vivaspin Turbo 15 (Sartorius) con corte 10 kDa. La proteína concentrada se leyó a 280 nm, utilizando el Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), el valor obtenido se empleó para obtener la concentración de la proteína mediante la ley de Beer-Lambert (Swinehart, 1962).

### **Purificación de la proteína recombinante mG0S2**

La purificación de la proteína G0S2 se optimizó como se describe a continuación. Como primer paso, en 50 mL de medio LB previamente inoculado con células *E. coli* BL21 DE3 (star) que contienen el vector para expresar a G0S2 de ratón (mG0S2), se utilizó para inocular 1 L de medio LB. Posteriormente, se indujo

la expresión con IPTG 1 mM a una temperatura de 28 °C, con una agitación de 180 rpm durante 16 horas. Después, las células se recolectaron por centrifugación a 6,000 rpm durante 10 min a 4 °C y fueron almacenadas a -20 °C.

La pastilla celular se resuspendió en amortiguador de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0.1 % CHAPS y 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) y se sonicó a 50% de amplitud con periodos 15 s ON/45 s OFF durante 7 min 30 s a 4 °C. El lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4 °C. El sobrenadante del lisado celular se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel, la columna de agarosa Ni-NTA fue equilibrada previamente con el amortiguador de lisis. La columna se lavó con 6 volúmenes de columna (CV) con el amortiguador de lisis. La elución se realizó siguiendo un gradiente escalonado de elución en aumento de concentración de imidazol (50, 250 y 500 mM) preparado en el amortiguador de lisis. Las fracciones se recolectaron y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones donde eluyó la proteína se mezclaron y se incubaron con 5 unidades/mL de proteasa PPS a 4 °C. Se tomaron muestras antes y después de la reacción con la proteasa para ser evaluadas por SDS-PAGE. Después, la proteína se desaló con una columna PD-10, para dejarla en el amortiguador (50 mM HEPES pH 7.0, 0.5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.5 mM EDTA) y se pasó por un filtro de 0.22  $\mu$ m. Seguidamente, la proteína se purificó mediante intercambio catiónico con la columna HiTrap SP HP, la elución de la proteína se realizó con el amortiguador que se utilizó anteriormente, más la adición de 1 M NaCl, en un gradiente lineal de 0-50% en 20 volúmenes de columna. Las fracciones de elución se recolectaron para ser analizadas por SDS-PAGE.

Posteriormente, las fracciones que contenían a la proteína se concentraron utilizando un Vivaspin Turbo15 (Sartorius) con corte 3 kDa, para su purificación por cromatografía de exclusión molecular mediante la columna Superdex 75. Para ello, se realizó la corrida en el amortiguador (20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1 mM EDTA) a un flujo de 0.6 mL/min. La elución de la proteína se monitoreó a 280 nm y registró en un cromatograma mediante el software UNICORN. Se tomaron muestras de las fracciones de elución para ser analizadas mediante SDS-PAGE. Para obtener el dato de la concentración de la proteína, se leyó la absorbancia a 205 nm utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), empleando el valor de coeficiente de extinción ( $E_{205}^{0.1\%}$ ) de 30.23 para el caso de la proteína proveniente de ratón (Páez-Pérez et al., 2020).

### **Dispersión dinámica de luz de mBcl-2 y del complejo mG0S2/mBcl-2**

Para estudiar la interacción que se forma entre las proteínas mBcl-2 y mG0S2, se realizó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Las muestras de las proteínas se mantuvieron en un amortiguador (20 mM fosfato de potasio pH 8.0, 20 mM NaCl, 5 % glicerol) y se pasaron por un filtro de 0.02  $\mu$ m. Para determinar el radio hidrodinámico de mBcl-2, este se midió a partir de 6 concentraciones de proteína en un intervalo de 0.5 a 2.0 mg/mL en un volumen de 50  $\mu$ L, utilizando el equipo APS2000 (Malvern). De los datos obtenidos se extrapola a un valor de 0 para conocer el valor real que corresponde a mBcl-2. Para la interacción del complejo mBcl-2/mG0S2, las proteínas se incubaron a 25 ° C durante 30 min, en una relación de 1:4 (mBcl-2: mG0S2) y después se realizó la lectura utilizando el

equipo APS2000 (Malvern) para determinar el peso molecular aparente y el radio hidrodinámico.

### **Análisis de la interacción entre mBcl-2 y mG0S2 por cromatografía de exclusión molecular.**

La formación del complejo mBcl-2/mG0S2 se analizó por cromatografía de exclusión molecular. Una vez que se obtuvieron las dos proteínas purificadas como mencionamos anteriormente, estas se utilizaron para formar el complejo. A una relación de 1:1, el complejo se incubó a 25 °C durante 30 min. Después se inyectaron 100 µL del complejo en la columna Superdex 200. De igual manera, también se analizó a mBcl-2 y a mG0S2 de manera individual, se inyectaron utilizando 100 µL de cada proteína por separada en la columna Superdex 200. Para la corrida de la cromatografía se utilizó el amortiguador (20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoetanol y 1 mM EDTA) a un flujo de 0.6 mL/min. La elución de la proteína a 280 nm se registró en un cromatograma mediante el software UNICORN.

### **Ensayo de cristalización**

El complejo proteico mBcl2/mG0S2 se mantuvo en un amortiguador (20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoetanol y 1 mM EDTA), a una concentración de 3.3 mg/mL y en una relación de 1:1, para ser utilizado en el ensayo de cristalización. El ensayo se llevó a cabo mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Se utilizó el kit Cristal Screen I (Hampton Research), que cuenta con diversas condiciones de cristalización para proteínas. Para cada condición, se usaron 20 µL de precipitante, las gotas se colocaron en una proporción de 1:1 (0.8 µL de proteína y 0.8 µL de precipitante; la caja se selló y almacenó a 14 °C. Se

monitoreó la caja en el microscopio estereoscópico a las 24 h, y posteriormente cada semana, hasta la cuarta semana.

## RESULTADOS

### Optimización de la secuencia del gen *Bcl-2* de ratón.

La secuencia codificante de *Bcl-2* de ratón, se analizó mediante las herramientas de software de las compañías IDT y Gen Script. Se consideraron los siguientes parámetros para obtener un mayor éxito en la expresión de la proteína en el sistema bacteriano: índice de adaptación de codones (CAI), el cual debe ser un valor de entre 0.8-1.0; el porcentaje del contenido de citosinas y guaninas de entre 30-70%; distribución de la frecuencia de codones (CFD), con un valor menor al 30%. A partir de la secuencia del gen de *Bcl-2* de ratón (*Mus musculus*) obtenida de la base de datos de NCBI (Secuencia de referencia: NP\_033871.2), se obtuvieron los siguientes valores: para CAI fue de 0.64, el contenido de citosinas y guaninas fue de 61.10% y el CFD fue de 10%. Con base en estos datos, se procedió a realizar la optimización de la secuencia. Posteriormente, se obtuvieron los siguientes datos de la secuencia optimizada: para CAI, se obtuvo un valor de 0.85, el contenido de citosinas y guaninas de 51.85%, y el CFD con un valor del 5% (Tabla 1).

### Clonación de *Bcl-2* de ratón

La secuencia que codifica para la proteína m*Bcl-2* fue digerida con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* para ser ligada en el vector de expresión pET28pps. Una vez que se realizó la ligación, la construcción pET28pps\_m*Bcl2* (Figura 1A) se utilizó para ser transformada en células competentes de *E. coli* TOP10. Para corroborar que el inserto deseado estuviera presente, se realizó una PCR de colonia en la que se utilizaron los oligonucleótidos T7 forward y reverse, se obtuvo un producto amplificado esperado de 942 pb aproximadamente (Figura 1B).

Se realizó una miniprep para purificar el plásmido de una colonia positiva previamente identificada por PCR de colonia. El plásmido purificado se digirió con las enzimas *NdeI* y *HindIII* para verificar que el inserto del gen de interés correspondiera al tamaño esperado. Los productos obtenidos de la digestión enzimática fueron de 629 y 5369 pb que corresponden al inserto y al vector, respectivamente (Figura 1C). Para el tamaño del inserto, solamente se clonó la secuencia que codifica para los residuos 1 a 211 de mBcl-2, debido a esto se reporta un tamaño menor que el de la tabla 1. Además, se corroboró mediante secuenciación de Sanger, donde se observó que la secuencia correspondía en un 100%.

### **Expresión de Bcl-2 de ratón**

La expresión de la proteína recombinante se realizó en células *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) star, cuando el cultivo celular alcanzó una densidad óptica a 600 nm de entre 0.6 a 0.8, se indujo la expresión mediante la adición de IPTG 1 mM a 28°C y 180 rpm durante 18 h. El extracto celular se analizó mediante SDS-PAGE y se observó que cuando se añadió IPTG hubo un incremento en el grosor de la banda de 26 kDa que corresponde a mBcl-2 con respecto al extracto celular donde no se adicionó IPTG (Figura 1D). Para analizar la solubilidad de la proteína, se tomaron muestras de las fracciones del lisado y del sobrenadante. Se observó que la proteína es soluble debido a que se encuentra en el sobrenadante (Figura 1E).

### **Purificación de Bcl-2 de ratón**

El sobrenadante del lisado celular fue purificado por cromatografía de afinidad a níquel, siguiendo un gradiente escalonado de elución en aumento de concentración de imidazol. Mediante SDS-PAGE, se observó que la proteína eluyó mayormente en una concentración de 50 y 250 mM de imidazol (Figura 2A). Las fracciones donde eluyó la proteína se recolectaron para ser digeridas con la proteasa PPS para eliminar la etiqueta de histidinas. El siguiente paso para purificar a mBcl-2 consistió en realizar una cromatografía por exclusión molecular. Se observó que la proteína pura eluyó en las fracciones correspondientes al volumen de 12 a 15 mL (Figura 2B y 2C). Para calcular el rendimiento de la proteína, se cuantificaron las fracciones donde se obtuvo a la proteína, previamente concentradas con un tubo de corte de 10 Kda. Se midió la absorbancia a 280 nm utilizando el Nanodrop 1000 y mediante la ley de Beer-Lambert se estimó que el rendimiento fue de 9 mg/L de cultivo.

### **Purificación de G0S2 de ratón**

La fracción del sobrenadante del extracto celular se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel. La proteína eluyó en las fracciones de 250 mM de imidazol (Figura 3A). Las fracciones de elución se recolectaron y se incubaron con la proteasa PPS para escindir a la etiqueta de histidinas y a la proteína de fusión SUMO. Seguidamente, la proteína se purificó mediante intercambio catiónico con la columna HiTrap SP HP. La proteína eluyó mayormente en las fracciones 10 a 12 correspondientes al volumen 44 a 53 mL (Figura 3B). Las fracciones se recolectaron y se concentraron para ser purificadas por exclusión molecular. En la Figura 3C se observa a la proteína ya purificada por exclusión molecular, obtenida en el volumen

de elución de 14 a 16 mL. Para determinar la concentración de la proteína, se leyó la absorbancia a 205 nm utilizando el Nanodrop 2000 y se obtuvo un rendimiento de 0.25 mg/L de cultivo.

### **Análisis mediante dispersión dinámica de luz de mBcl-2 y del complejo mG0S2/mBcl2**

Mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) se midió el radio hidrodinámico de mBcl-2 en 6 diferentes concentraciones de la proteína en un intervalo de 0.5 a 2.0 mg/mL. Al realizar la extrapolación a un valor de 0, el radio hidrodinámico obtuvo un valor de 2.711 nm (Figura 4A). Al hacer una comparación con otras proteínas ya estandarizadas en cuanto a la relación de su radio hidrodinámico y su peso molecular, para el caso de mBcl-2, corresponde a 41 kDa aproximadamente; por lo tanto, esta proteína se encuentra conformada como dímero en solución. La interpretación respecto a la conformación de mBcl-2 también fue corroborada mediante el análisis del perfil completo por DLS. Se realizó una lectura a una concentración de 1 mg/mL de mBcl-2, en el perfil completo de DLS de dicha lectura se observó que el tamaño que tuvo una mayor intensidad fue de un aproximado de 43 kDa (Figura 4B). En el caso de la interacción del complejo mBcl-2/mG0S2, las proteínas se incubaron en una relación de 1:4 (mBcl-2: mG0S2), para saturar a la proteína mBcl-2 y así tener una mayor probabilidad de obtener el complejo; con ello, se determinó el peso molecular aparente y el radio hidrodinámico. Se observó en el perfil completo de DLS que se forma un complejo cuyo peso molecular es de alrededor de 32 kDa (Figura 4C). Estos resultados sugieren que cuando mBcl-2 interactúa con mG0S2, se disocia el homodímero de mBcl-2, ocasionando que mG0S2 y mBcl-2 formen un heterodímero. Los pesos

moleculares de mBcl-2 y mG0S2 corresponden a 26 y 11 kDa respectivamente. Al sumar ambos pesos moleculares, se obtiene un valor de 37 kDa, que es un valor cercano al obtenido por la medición mediante DLS que fue de 32 kDa.

### **Análisis de la interacción del complejo proteico mediante cromatografía de exclusión molecular**

El complejo proteico mBcl-2/mG0S2, en una relación 1:1, se inyectó en la columna utilizada para cromatografía de exclusión molecular, con el propósito de observar la estabilidad de la interacción. Se observó que el complejo eluyó enteramente en un solo pico, lo cual sugiere que la interacción es fuerte y que la constante de disociación probablemente es baja (Figura 5). El pico de elución en el complejo proteico ocurre en el volumen de 16.69 mL, mientras que el de mBcl-2 a los 16.03 mL y el de mG0S2 a los 19.75 mL (Figura 5). La diferencia del volumen de elución entre mBcl-2 y el complejo es de 0.66 mL, esto nos indica que poseen diferentes pesos moleculares, mBcl-2 tendría un peso mayor que a comparación del complejo. Se podría deducir que se observó lo mismo que por DLS, mBcl-2 tendría un peso alrededor de 43 kDa, mientras que el complejo de 37 kDa.

### **Ensayos de cristalización**

Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada, se probaron 48 condiciones que corresponden al kit de cristalización Cristal Screen I. La placa donde se montaron las condiciones se examinó periódicamente con un microscopio estereoscópico. De las 48 condiciones evaluadas, no se obtuvo algún cristal. Sin embargo, la condición D7 (30% polietilenglicol 1500 P/V) podría dar lugar a la formación de cristales del

complejo proteico mBcl-2/mG0S2, debido a que se observó el posible crecimiento de un cristal muy pequeño (Figura 6). Es necesario incrementar la concentración del complejo o ajustar las condiciones del kit para obtener éxito en la obtención de cristales del complejo.

## DISCUSIÓN

La proteína G0S2 ha sido estudiada previamente en el proceso de la apoptosis, y se conoce por el momento que tiene un papel proapoptótico al interactuar con Bcl-2 y formar con esta un heterodímero para dar lugar a la muerte celular (Welch et al., 2009). Sin embargo, no se ha estudiado a mayor profundidad la interacción entre las proteínas mG0S2 y mBcl-2.

Primeramente, la clonación y expresión de Bcl-2 ratón fue a partir de la secuencia del gen que codifica para los 236 residuos de aminoácido, solo se consideró la secuencia de nucleótidos que codifican para los residuos 1 al 211, eliminando los residuos 212 al 236 del C-terminal que participan en la unión a membrana. La solubilidad de la proteína a expresar en *E. coli*, se vería comprometida si la construcción incluyera regiones de unión a membrana o transmembranales (Francis & Page, 2010). La secuencia se analizó con las herramientas disponibles en los servidores de Gen Script (rare codon analysis tool) y IDT (codon optimization tool), para conocer los parámetros importantes para su posterior expresión de manera recombinante en un sistema bacteriano. Los parámetros como el CAI, el contenido de guaninas y citosinas, y el CFD, nos dan un indicio sobre la expresión de la proteína en el organismo huésped. El CAI, es una medida del sesgo del uso de codones sinónimos para una secuencia de ADN o ARN con base en la frecuencia de uso de codones del organismo a emplear (Puigbò et al., 2008). Un valor de CAI cercano a 1.0 se considera ideal para una mayor expresión de la proteína, mientras más bajo sea el valor, es más probable

que haya una pobre expresión. El contenido de guaninas y citosinas junto con el CFD, aportan una estimación sobre la efectividad de la transcripción y la traducción (Darabi et al., 2013). En comparación con la secuencia reportada en la base de datos de NCBI (NP\_033871.2), la secuencia optimizada tiene valores óptimos de CAI, contenido de guaninas y citosinas y de CFD. La expresión que se obtuvo del gen optimizado sugiere que el proceso de optimización fue el adecuado. (Figura 2).

Decidimos producir las proteínas recombinantes provenientes de ratón mBcl-2 y mG0S2, para tener una cantidad considerable y así poder ejecutar los ensayos previstos para evaluar la interacción que hay entre ambas. Se ha reportado que la producción de Bcl-2 recombinante en un sistema bacteriano favorece el rendimiento con una producción de 3 mg/L (Ádén et al., 2020). En dicho trabajo utilizaron el medio mínimo M9, sin embargo, este es mayormente utilizado para seleccionar bacterias que produzcan aminoácidos esenciales o para propagar células resistentes a fagos. La producción que tuvimos en el laboratorio de la proteína mBcl-2 en un sistema bacteriano, tuvo un gran rendimiento ya que obtuvimos alrededor de 9 mg/L de cultivo. El método que planteamos para producir mBcl-2, consistió en utilizar medio LB adicionado previamente con kanamicina, una vez que el cultivo alcanzó la densidad óptica requerida, se indujo la expresión añadiendo IPTG a una concentración 1 mM, en consecuencia, la concentración del reactivo que induce la expresión es clave para un óptimo rendimiento de proteína producida (Briand et al., 2016). Por lo tanto, podemos deducir que nuestra estrategia de optimización del gen y de producción de proteínas recombinantes, específicamente en Bcl-2 tiene un adecuado rendimiento de producción.

En el caso de la producción de G0S2, se obtuvo un bajo rendimiento, con 0.25 mg/L de cultivo. Esto podría deberse a la formación de cuerpos de inclusión, o toxicidad; sin embargo, las proteínas de fusión (como SUMO), ayudan a erradicar estos problemas al mejorar la solubilidad de las proteínas o aumentar el rendimiento al mejorar la expresión y disminuir la degradación (Bell et al., 2013). La estrategia de producir de manera recombinante a G0S2, con la ayuda de una proteína de fusión como SUMO ha sido exitosa en el caso de la proteína humana (Cerk et al., 2014), aunque no ocurre lo mismo con la proteína de ratón (Páez-Pérez et al., 2020). En un trabajo previo, se utilizó la estrategia de la proteína de fusión GST para la producción de mG0S2; sin embargo, no se observó una expresión exitosa de la proteína (Páez-Pérez, Tesis de Maestría, 2016). Una posible solución al bajo rendimiento de producción, podría ser utilizar una proteína de fusión diferente o cambiar los pasos de purificación. Es difícil determinar qué proteínas de fusión serían las candidatas ideales de acuerdo a la aplicación que se desea llevar a cabo. Se estima que alrededor del 20-40% de las proteínas eucariotas no se pueden expresar en sistemas procariontes en forma soluble (Bell et al., 2013).

Mediante la técnica de DLS, se determinó que el radio hidrodinámico de mBcl-2 es de un valor de 2.711 nm que indica que tiene un peso molecular aproximado de 41 kDa, de acuerdo a proteínas estandarizadas previamente reportadas (La Verde et al., 2017). En el perfil completo obtenido por DLS a una concentración de 1 mg/mL se determinó que el valor de su peso molecular corresponde a 43 kDa. Por lo tanto, se puede deducir que mBcl-2 se encuentra como dímero en solución. El resultado que obtuvimos se corrobora con trabajos

previamente reportados donde determinan que Bcl-2 se encuentra como homodímero (Zhang et al., 2004). Al analizar la interacción del complejo mBcl-2/mG0S2, se observó en el perfil completo de DLS que se forma una molécula de un peso molecular de 32 kDa, aproximadamente. Nuestros resultados sugieren que mBcl-2 se encuentra como homodímero, pero este se disocia al momento de interaccionar con mG0S2, originando el heterodímero mBcl-2/mG0S2 (Figura 4). Previamente se ha reportado que la interacción de Bcl-2 con Bax ocurre de manera similar a la que nosotros encontramos con G0S2 (Zhang et al., 2004). En ambos casos la formación del homodímero de Bcl-2 es inhibida al interaccionar con otra proteína (con Bax o con G0S2) probablemente porque la afinidad de interacción es mayor. Sin embargo, en el caso del complejo Bcl-2/Bax se ha visto que se disocia con la presencia de G0S2 (Welch et al., 2009). Por lo tanto la afinidad que existe entre Bcl-2 y G0S2 podría ser aún mayor que con la de otros factores proapoptóticos como Bax. Un punto importante a conocer, sería el investigar la constante de disociación entre el complejo mBcl-2/mG0S2, que nos ayudaría a entender que tan afín es su interacción.

La estabilidad del complejo proteico mBcl-2/mG0S2 se examinó por cromatografía de exclusión molecular. El complejo eluyó únicamente en un solo pico, a un volumen mayor que el pico del homodímero mBcl-2. Esto nos podría ser de gran utilidad, ya que la purificación de mG0S2 es un proceso en el que se obtiene muy poca proteína, al purificarla con el complejo, podría verse incrementado el rendimiento de esta proteína. Además, se ha reportado que la estabilidad de un complejo proteico a través de la columna, implica que las proteínas se equilibraron

de manera rápida e interactuando entre ellas, logrando así formar un complejo que es estable en minutos o incluso horas (Mayer et al., 2009). En este trabajo se observó que el complejo mBcl-2/mG0S2 se mantuvo estable al eluir de la columna.

La estructura de la proteína G0S2 se desconoce, el descifrar la estructura de la proteína facilitaría el estudio de la interacción que da lugar con Bcl-2 en la apoptosis. Las proteínas que utilizamos provienen de ratón debido a que el C-terminal de G0S2 tiene una conformación globular y por lo tanto podría aumentar la probabilidad del éxito de cristalización (Páez-Pérez et al., 2020). Sin embargo, para los ensayos de cristalización del complejo mBcl-2/mG0S2, solamente se probaron 48 condiciones, de las cuales no se obtuvo la formación de cristales. Se sugiere que para posteriores ensayos de cristalización se incremente la concentración del complejo, ya que favorece la formación de cristales. Otra alternativa sería evaluar otras condiciones precipitantes diferentes a las evaluadas en este trabajo. Además, se ha reportado un gran número de casos de cristalización con la proteína de fusión intacta, algunos ejemplos son con GST, MBP, lisozima y SUMO. La etiqueta de fusión ayudaría particularmente cuando la proteína de interés es de un bajo peso molecular. Otro aspecto importante es que las proteínas de fusión pueden ser utilizadas como modelos de búsqueda para resolver el problema de la fase de cristalización (Bell et al., 2013).

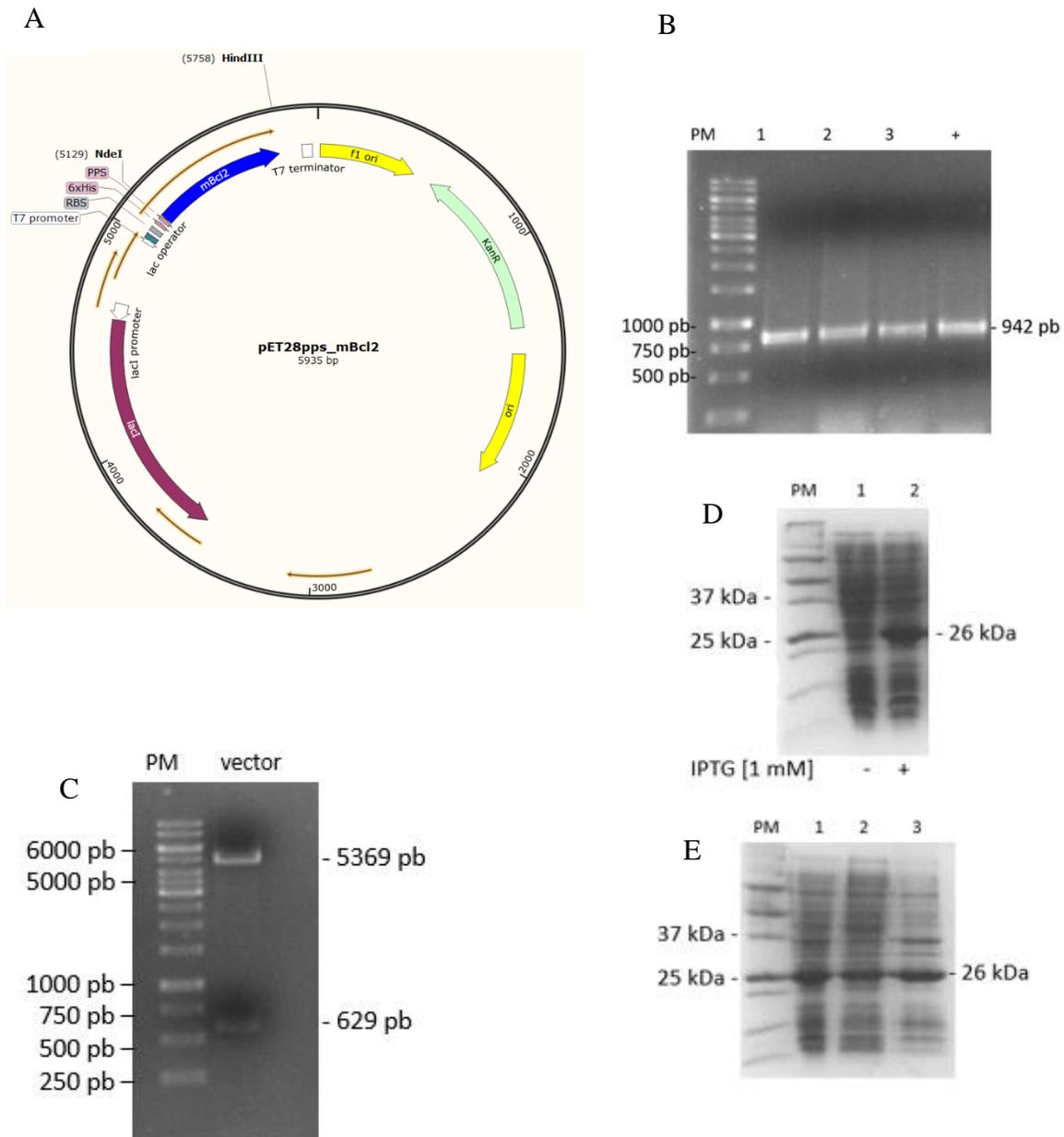
## CONCLUSIÓN

La proteína Bcl-2 de ratón, se expresó en células de *E. coli* BL21 (DE3 star) mediante la inducción con IPTG a 1mM y se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel y exclusión molecular obteniendo un rendimiento de 9 mg/L de cultivo. El radio hidrodinámico de mBcl-2 corresponde a un peso molecular de aproximadamente 41 kDa, lo que sugiere que la proteína se encuentra conformada como dímero en solución. El rendimiento obtenido en la purificación de mG0S2 fue de 0.25 mg/L de cultivo, por lo que se busca optimizar las condiciones del proceso para obtener un mayor rendimiento. La formación del complejo mBcl-2/mG0S2 medida por dispersión dinámica de luz indica que cuando mG0S2 interacciona con mBcl-2, se disocia el homodímero formado por mBcl-2 para poder interaccionar con mG0S2 y formar el heterodímero mBcl-2/mG0S2. En cuanto a la cristalización del complejo proteico mBcl-2/mG0S2, es necesario evaluar diferentes condiciones y concentraciones para poder obtener un cristal que pueda ser difractado. Además, se deduce que la afinidad del complejo es bastante fuerte, ya que eluyó en un solo pico en la cromatografía de exclusión molecular.

La resolución de la estructura cristalográfica del complejo mBcl-2/mG0S2 ayudará a entender la interacción de ambas proteínas. El conocimiento que se genere sobre la interacción es esencial para una comprensión más amplia sobre el papel de G0S2 en la apoptosis, la cual podría ser utilizada como una posible estrategia para fines terapéuticos, para patologías derivadas de una apoptosis alterada como es el caso del cáncer.

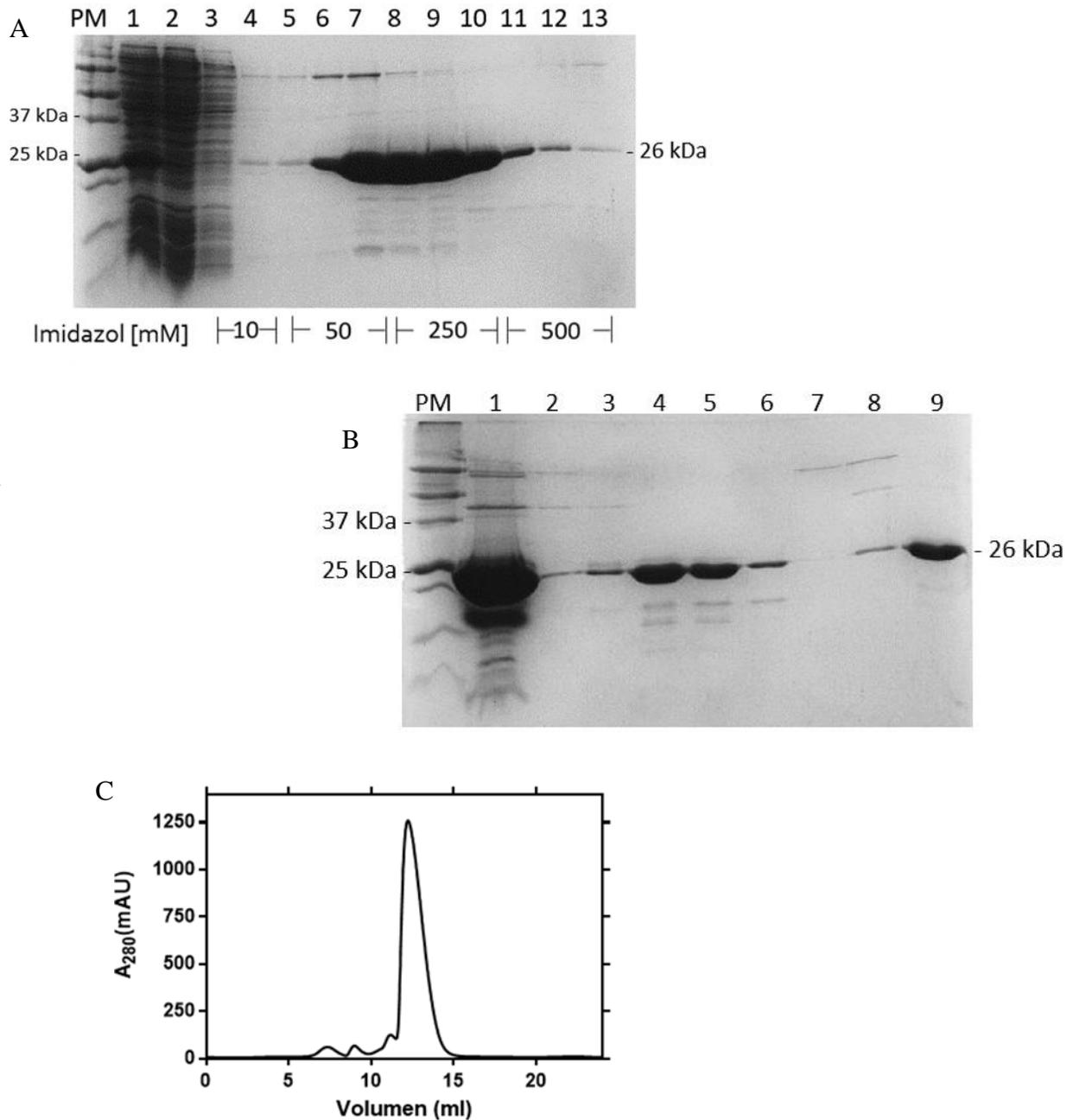
**Tabla 1. Parámetros de optimización de la secuencia de Bcl-2 de ratón.**

<b>Secuencia no optimizada</b>	<b>Secuencia optimizada</b>
Nucleótidos: 627 pb CAI: 0.64 Contenido de GC: 61.10% CFD: 10% Proteína: 211 aminoácidos	Nucleótidos: 627 pb CAI: 0.85 Contenido de GC: 51.85% CFD: 5% Proteína: 211 aminoácidos
<b>Parámetros óptimos:</b>	
Índice de adaptación de codones (CAI): 0.8 – 1.0	
Contenido de guaninas y citosinas (GC%): 30 – 70%	
Distribución de la frecuencia de codones (CFD): <30%	



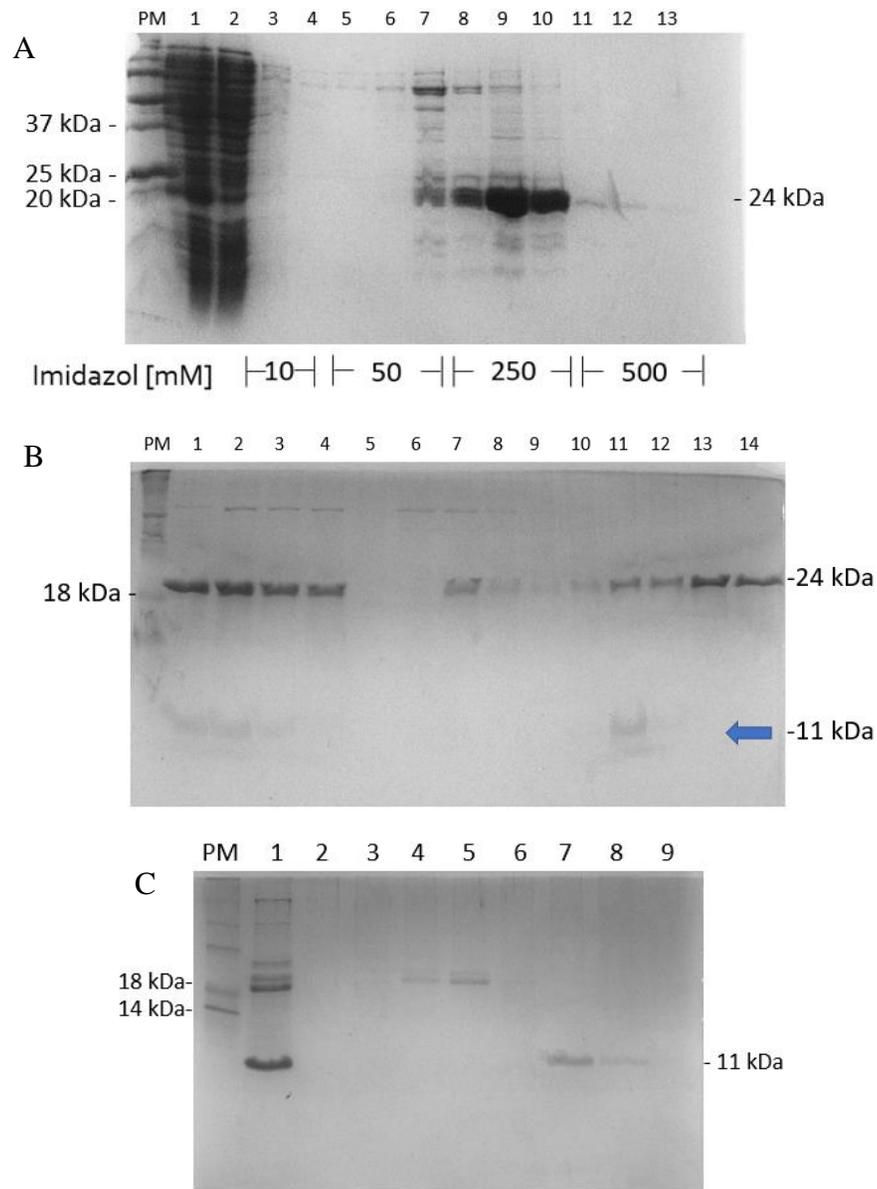
**Fig. 1. Clonación y expresión de la secuencia codificante del gen Bcl-2 de ratón.**

A) Mapa del vector construido para expresar a mBcl-2. B) PCR de colonia de células transformadas con el vector pET28pps\_mBcl2; PM: peso molecular; 1-3: colonias transformantes; +: control positivo. C) Digestión enzimática del vector con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. D) Pruebas de expresión al inducir con IPTG 1 mM. 1: sin adición de IPTG; 2: con inducción de IPTG. E) Análisis de la solubilidad de la proteína expresada. 1: extracto celular; 2: sobrenadante; 3: pellet celular. Las muestras de proteínas fueron resueltas en un gel SDS-PAGE al 15%, teñido con azul de coomassie.



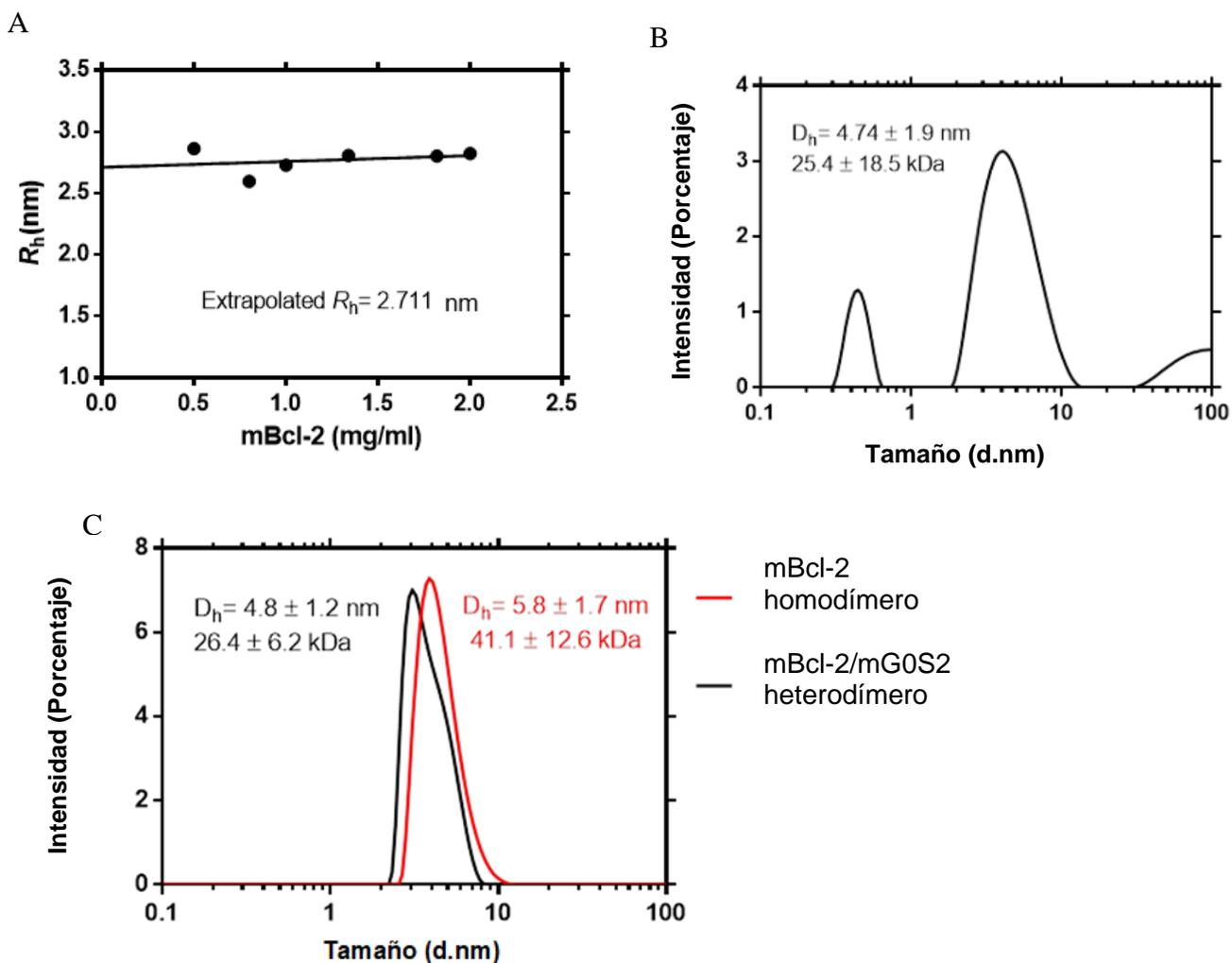
**Fig. 2. Purificación de mBcl-2.**

A) Purificación de mBcl-2 por cromatografía de afinidad a níquel. PM: peso molecular; 1: fracción del sobrenadante; 2: fracción no unida; 3-4: fracción de lavado con 10 mM imidazol; 5-7: fracción de elución con 50 mM imidazol; 8-10: fracción de elución con 250 mM imidazol; 11-13: fracción de elución con 500 mM imidazol. B) Purificación de mBcl-2 por exclusión molecular. 1: proteína concentrada; 2: fracción 10; 3: fracción 11; 4: fracción 12; 5: fracción 13; 6: fracción 14; 7: fracción 10-11; 8: fracción: 12-13; 9: fracción: 13-15. C) Cromatograma de la purificación de mBcl-2 por exclusión molecular, usando la columna Superdex 75 (GE), a un flujo de 0.6 mL/min. El volumen de la proteína inyectada fue de 0.5 mL y el volumen de elución de la proteína pura fue de 3 mL. Las muestras fueron resueltas en un gel SDS-PAGE al 15%, teñido con azul de coomassie.



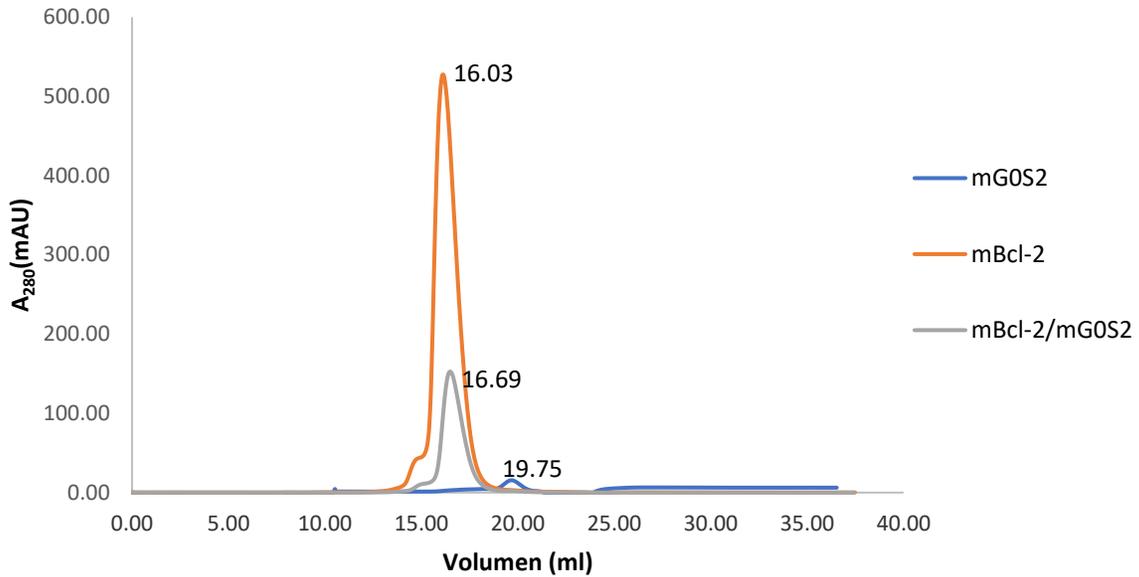
**Fig. 3. Purificación de mGOS2.**

A) Purificación de SUMOmGOS2 por afinidad a níquel. PM: peso molecular; 1: sobrenadante; 2: fracción no unida; 3-4: fracción de lavado con 10 mM imidazol; 5-7: fracción de elución con 50 mM imidazol; 8-10: fracción de elución con 250 mM imidazol; 11-13: fracción de elución con 500 mM imidazol. B) Purificación de mGOS2 por intercambio catiónico. 1: antes de digestión con PPS; 2: después de digestión con PPS; 3: proteína desalada; 4: proteína filtrada; 5: proteína no unida; 6-14: fracciones de elución de los tubos 6-14 correspondientes al volumen 32-59 ml de elución. La proteína se monitoreo a 280 nm, la flecha azul señala la banda de la proteína mGOS2 purificada. C) Purificación de mGOS2 por exclusión molecular. 1: proteína concentrada; 2-9: fracciones de elución 9-16. La proteína se monitoreo a 280 nm. Las muestras fueron resueltas en un gel SDS-PAGE al 17%, teñido con azul de coomassie.



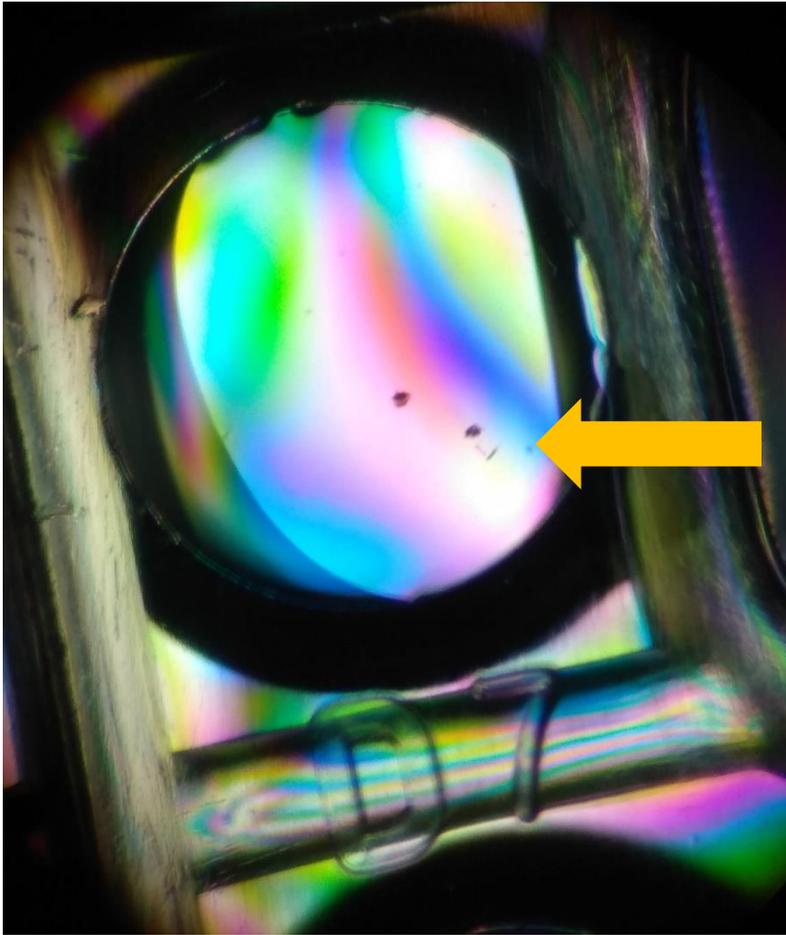
**Fig. 4. Análisis de mBcl-2 y su interacción con mG0S2 mediante DLS.**

A) Medición del radio hidrodinámico de mBcl-2, en un intervalo de concentración de 0.5 a 2.5 mg/mL de proteína. La proteína se mantuvo en un amortiguador de 20 mM fosfato de potasio pH 8.0, 20 mM NaCl, 5 % glicerol. B) Perfil completo de DLS de mBcl-2 a 1mg/mL. C) Análisis del complejo mBcl-2/mG0S2 a una concentración de 1 mg/mL, previamente pasado en un filtro de 0.02  $\mu$ m. El complejo se mantuvo en un amortiguador de 20 mM fosfato de potasio pH 8.0, 20 mM NaCl, 5 % glicerol.



**Fig. 5. Análisis de la interacción del complejo mBcl-2/mG0S2 mediante cromatografía de exclusión molecular.**

El complejo proteico mBcl-2/mG0S2 (1:1) se inyectó en la columna Superdex 200 (GE), y presentó un único pico de elución en el volumen de 16.69 ml (curva gris). Además, también se inyectaron las proteínas mBcl-2 (curva naranja) y mG0S2 (curva azul). Las proteínas se mantuvieron en el amortiguador (20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1 mM EDTA). El volumen de la proteína inyectada fue de 0.1 mL, la corrida se realizó a un flujo de 0.6 mL/min y al eluir se recolectó 1 mL por fracción. La elución de la proteína se monitoreó en 280 nm.



**Fig. 6. Formación de un posible crecimiento de cristales del complejo mBcl-2/mG0S2**

A una concentración de 3.3 mg/mL del complejo mBcl-2/mG0S2 en amortiguador (20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1 mM EDTA), la condición D7 (30% polietilenglicol 1500 P/V) del kit Crystal Screen I, podría favorecer la formación de cristales, la flecha indica los pequeños posibles cristales.

## REFERENCIAS

- Adams, J.M., Cory, S., (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 488–496.
- Ádén, J., Mushtaq, A. U., Dingeldein, A., Wallgren, M., & Gröbner, G. (2020). A novel recombinant expression and purification approach for the full-length anti-apoptotic membrane protein Bcl-2. *Protein Expr. Purif.* 172, 105628.
- Bell, M. R., Engleka, M. J., Malik, A., & Strickler, J. E. (2013). To fuse or not to fuse: what is your purpose? *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 22(11), 1466–1477.
- Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R., & Neiers, F. (2016). A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 6, 33037.
- Cang, S., Iragavarapu, C., Savooji, J., Song, Y., Liu, D., (2015) ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J. Hematol. Oncol.* 8: 129.
- Cerk, I. K., Salzburger, B., Boeszoermenyi, A., Heier, C., Pillip, C., Romauch, M., Schweiger, M., Cornaciu, I., Lass, A., Zimmermann, R., Zechner, R., & Oberer, M. (2014). A peptide derived from G0/G1 switch gene 2 acts as noncompetitive inhibitor of adipose triglyceride lipase. *J. Biol. Chem.* 289(47), 32559–32570.
- Danial, N.N., (2007) BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin. Cancer Res.* 13: 7254-7263.
- Darabi, P., Galehdari, H., Khatami, S. R., Shahbazian, N., Shafeei, M., Jalali, A., & Khodadadi, A. (2013). Codon Optimization, Cloning and Expression of the Human Leukemia Inhibitory Factor (hLIF) in *E. coli*. *Iran. J. of Biotechnol.* 11(1), 47–53.

- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 5(1), Unit 5.24.1-29.
- Fulda, S., Debatin, K.-M., (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798–4811.
- Heckmann, B.L., Zhang, X., Xie, X., Liu, J., (2013) The G0/G1 switch gene 2 (G0S2): regulating metabolism and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1831: 276–281.
- Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W., (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 25: 65–80.
- 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., 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: 273–278.
- La Verde, V., Dominici, P., & Astegno, A. (2017). Determination of Hydrodynamic Radius of Proteins by Size Exclusion Chromatography. *Bio-Protocol*, 7(8), e2230.
- Mayer, C. L., Snyder, W. K., Swietlicka, M. A., VanSchoiack, A. D., Austin, C. R., & McFarland, B. J. (2009). Size-exclusion chromatography can identify faster-associating protein complexes and evaluate design strategies. *BMC Res. Notes.* 2(1).
- Páez-Pérez, E. D., Llamas-García, M. L., Benítez-Cardoza, C. G., Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., (2020) Bioinformatic Analysis and Biophysical Characterization Reveal Structural Disorder in G0S2 Protein. *ACS Omega.* 5: 25841–25847.

- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T., Fesik, S.W., (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 3012–3017.
- Pfeffer, C.M., Singh, A.T.K., (2018) Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 448.
- Puigbò, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol. Direct.* 3, 38.
- Rager, J. E. (2015). Chapter 8 - The Role of Apoptosis-Associated Pathways as Responders to Contaminants and in Disease Progression. In *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*, Rebecca C. Fry (ed) pp 187–205. Academic Press: Boston.
- Rong, Y.-P., Barr, P., Yee, V.C., Distelhorst, C.W., (2009) Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793: 971–978.
- Russell, L., 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.
- Swinehart, D. F. (1962). The Beer-Lambert Law. *J. Chem. Educ.* 39(7), 333.
- Tzifi, F. Economopoulou, C. Gourgiotis, D. Ardavanis, A. Papageorgiou, S. Scorilas, A. (2012) The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol.* 2012: 524308.
- Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Y., & Zhang, P. (2015). Lipolytic inhibitor G0/G1 switch gene 2 inhibits reactive oxygen species production and apoptosis in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308(6), C496–C504.

- Welch, C., Santra, M.K., El-Assaad, W., Zhu, X., Huber, W.E., Keys, R.A., Teodoro, J.G., Green, M.R., (2009) Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2. *Cancer Res.* 69: 6782–6789.
- Yamada, T., Park, C.S., Shen, Y., Rabin, K.R., Lacorazza, H.D., (2014) G0S2 inhibits the proliferation of K562 cells by interacting with nucleolin in the cytosol. *Leuk. Res.* 38: 210–217.
- Yang, X., Lu, X., Lombès, M., Rha, G.B., Chi, Y.-I., Guerin, T.M., Smart, E.J., Liu, J., (2010) The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab.* 11: 194–205.
- Zhang, Z., Lapolla, S. M., Annis, M. G., Truscott, M., Roberts, G. J., Miao, Y., Shao, Y., Tan, C., Peng, J., Johnson, A. E., Zhang, X. C., Andrews, D. W., & Lin, J. (2004). Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J. Biol. Chem.* 279(42), 43920–43928.