



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**La proteína G0S2, análisis de interacción y ensayos de
cristalización del complejo G0S2/Bcl-2**

Tesis que presenta

Ligia Vega Becerra

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Samuel Lara González

Dra. Gabriela Margarita Montero Morán

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2023



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**La proteína G0S2, análisis de interacción y ensayos de cristalización del complejo G0S2/Bcl-2**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ligia Vega Becerra** y aprobada el **23 de junio de 2023** 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
Codirector de la tesis

Dra. Gabriela Margarita Montero Morán
Codirectora de la tesis

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
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 codirección del Dr. Samuel Lara González y la Dra. Gabriela Margarita Montero Morán.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 798183) 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.

Agradecemos al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) por los servicios otorgados y por el acceso a sus instalaciones.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

Con mucho amor para mi mamá que siempre me ha apoyado en todo y aunque hemos pasado momentos muy difíciles siempre me ha impulsado a ir más lejos y superarme. Gracias por creer en mí, por darme una carrera que a pesar de las adversidades buscaste la manera de hacerlo, por nunca dejarme caer y brindarme todo tu amor y comprensión en todo momento. Esto es solo una pequeña parte de todo lo que me has enseñado y créeme cuando digo que cuando sea grande quiero ser como tú, porque siempre has buscado la manera de protegernos, guiarnos y darnos todo lo que estuvo en tus manos a mis hermanos y a mí. Eres una gran mujer, luchadora, soñadora pero nunca sin quitar los pies de la tierra, en pocas palabras me llena de orgullo poderte llamar mamá y este logro es mi forma de devolverte un poco de todo lo que me has dado.

A mis hermanos, Bismarck y Diana, por el apoyo que toda la vida me han brindado que a pesar de las diferencias siempre vieron en mí algo especial y me impulsaron a seguir mis sueños dándome los mejores ejemplos de lo que es ser un adulto responsable, amoroso, generoso y con un millón de virtudes más que no puedo enumerar. Gracias por siempre consentirme, pero dejarme muy claro que las cosas se ganan con mucho esfuerzo y dedicación. A mi cuñada y sobrinas, por siempre echarme porras de vivir en San Luis y estar conmigo.

A mis primos, Rogelio, Ulises y Diego que más que primos siempre fueron hermanos y a pesar de que no están aquí sé que estarían orgullosos de mí y celebrarían este logro como si fuera de ustedes porque realmente lo es, en especial para ti Dieguito porque este gran paso lo soñamos mucho tiempo juntos. Un abrazo hasta el cielo trio dinamita Becca.

A mi pareja y mejor amigo José, que te puedo decir, muchísimas gracias por estos 4 años 5 meses de compartir una vida juntos, hemos pasado tantas cosas a lo largo de este tiempo y es un honor tenerte hoy a mi lado en este logro tan importante para mí. Gracias por acompañarme en esta aventura en una nueva ciudad lejos de nuestras familias y amigos, por ser mi pilar y fuerza cuando sentía que ya quería rendirme en los primeros semestres, sin ti a mi lado no lo hubiera logrado, las desveladas más el estrés valió la pena y aquí está el fruto de ello. Gracias por tu paciencia, comprensión, fuerza, por creer en mi capacidad y sobretodo por tu amor incondicional y reciproco, juntos hemos logrado cosas impresionantes. Este proyecto no ha sido fácil y eres el que más ha sufrido a mi lado en todo este proceso, pero siempre estuviste motivándome y ayudándome. Eres mi equilibrio en medio del caos. Muchas gracias, amor.

A mis amigos viejos y nuevos, muchas gracias por estar conmigo en los momentos felices y complejos que hemos vivido. Siempre tendrán un lugar muy importante en mi corazón. A mis compañeros de laboratorio que hacen que las jornadas de trabajo sean mucho más ligeras y por el apoyo que me han brindado dentro del laboratorio.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías.

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

Al Dr. Samuel Lara González por darme la oportunidad y la confianza de entrar a su laboratorio a realizar la maestría y brindarme todo el apoyo para concluirla con éxito brindándome su conocimiento científico cuando me atoraba.

A la Dra. Gabriela Montero Morán, muchas gracias por el apoyo y las recomendaciones a lo largo de este tiempo, es un honor poder trabajar con usted y de verdad he aprendido muchísimo. Gracias a los dos por guiarme con paciencia y acompañarme en este camino.

Al Dr. Luis Salazar Olivo por las aportaciones a la tesis.

A la Tec. Rosa Espinosa Luna por todo el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Clonación de las proteínas SUMO_hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A.	10
Evaluación de la expresión de las proteínas.	11
Purificación de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.	11
Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 por cromatografía de exclusión molecular (SEC).	14
Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/hBcl-2 por cromatografía de exclusión molecular (SEC).	14
Experimentos de cristalización.	15
Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS).	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
Clonación de SUMO_hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO/hG0S2_R57A-D58A.	16
Expresión y purificación de las construcciones pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.	17
a. Expresión de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.	17
b. Purificación de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.	18
Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 y del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 por cromatografía de exclusión molecular (SEC).	24
a. Complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2.	24
b. Complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2.	25
Pruebas de cristalización del complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2.	27
Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS)	27

CONCLUSIÓN	
REFERENCIAS	
ANEXOS	

31
32
37

Lista de tablas

Tabla 1. Construcciones de las proteínas SUMO-hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A.	16
---	----

Lista de figuras

Figura 1. Clonación de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.	17
Figura 2. Expresión de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.	18
Figura 3. Purificación por Ni-NTA de las proteínas SUMO-hG0S2, hBcl-2 y de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A.	20
Figura 4. Purificación por exclusión molecular de las proteínas hG0S2, hBcl-2 y de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A/D58A.	23
Figura 5. Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2.	25
Figura 6. Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2.	26
Figura 7. Experimentos de DLS de las proteínas SUMO-hG0S2, hBcl-2 y de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A y los complejos SUMO-hG0S2/hBcl-2 y SUMO-hG0S2_R57A-D58A/hBcl-2.	29

Anexos

Transformación de células competentes.	37
Clonación del gBlock de SUMO-hG0S2_R57A-D58A con enzimas NEB	37
Amplificación de ADN por PCR de colonia	39
Purificación de SUMO-hG0S2	40
Preparación de amortiguadores	40
Lisis	40
Columna de afinidad a níquel	41
Digestión con PPS	41
Columna de exclusión molecular (Superdex 75 10/300)	41
Purificación de hBcl-2.	41
Preparación de amortiguadores	41
Lisis	42
Columna de afinidad a níquel	42
Digestión con PPS	42
Columna de exclusión molecular (Superdex 75 10/300)	42

Abreviaturas (por sus siglas en ingles)

ATGL.	Adipose Triglyceride Lipase
BCL-2.	B-cell lymphoma 2
CD.	Circular Dichroism
CV.	Column Volume
DLS.	Dynamic Light Scattering
DTT.	Dithiothreitol
G0S2.	(G0/G1) switch protein 2
HD.	Hydrophobic Domain
IDP.	Intrinsically Disordered Proteins
IMAC.	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG.	Isopropyl β -D-2-thiogalacopyranoside
NF-κB.	Nuclear Factor-kappaB
Ni-NTA.	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPS.	PreScission Protease
R_h.	Hydrodynamic Radius
R_s.	Stokes Radius
SEC.	Size Exclusion Chromatography
TNFα.	Tumor Necrosis Factor Alpha
TNFR1.	Tumor Necrosis Factor Receptor 1

Resumen

La proteína G0S2, análisis de interacción y ensayos de cristalización del complejo G0S2/Bcl-2.

G0S2 es una proteína que participa en múltiples procesos celulares en vertebrados. Su función más conocida es la inhibición de la enzima triglicérido lipasa de tejido adiposo, lo que resulta en la regulación negativa de la lipólisis. En este trabajo nos enfocamos en la participación de G0S2 en la apoptosis, donde al interactuar con Bcl-2 se libera la proteína Bax interrumpiendo la formación del heterodímero Bcl-2/Bax. La liberación de Bax da inicio al proceso de apoptosis inhibiendo la proliferación celular. El objetivo de este trabajo es caracterizar la interacción molecular de las proteínas hG0S2 y hBcl-2 durante la formación del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante técnicas bioquímicas, biofísicas y con dos mutantes sitio dirigidas. Para esto se realizó la clonación y expresión de las construcciones SUMO-hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A en el vector pET28pps con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. Posteriormente se continuó con la purificación de las construcciones mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA) y una segunda purificación por cromatografía por exclusión molecular (SEC), después se evaluó la interacción y formación del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante SEC y dispersión dinámica de luz (DLS). Además, se realizaron experimentos de cristalización del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Pudimos realizar exitosamente la clonación, expresión y purificación de cada una de las construcciones obteniendo 0.736 mg/ml de hG0S2, 2.4 mg/ml de Bcl-2 y 0.508 mg/ml de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A. La identidad de las proteínas fue confirmada por geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 17%. La evaluación de la interacción del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante cromatografía de exclusión molecular fue exitosa obteniendo un complejo con un peso de 48.9kDa, el cuál fue confirmado con los experimentos de DLS donde observamos un peso de 34.4 kDa. Con esta muestra se procedió a realizar pruebas de cristalización del complejo, pero aún no se han obtenido cristales. Con estos resultados concluimos que existe una interacción fuerte y estable entre las proteínas hG0S2 y hBcl-2 ya que el complejo eluye en un solo pico. Se debe mejorar la concentración del complejo y probar diferentes condiciones de cristalización.

PALABRAS CLAVE: G0S2, purificación, apoptosis, cristalización, interacción proteína-proteína.

Abstract

G0S2 protein, interaction analysis and crystallization assays of the G0S2/Bcl-2 complex.

G0S2 is a protein involved in multiple cellular processes in vertebrates. The best known function is the inhibition of the enzyme triglyceride lipase of adipose tissue, which results in the negative regulation of lipolysis. In this work we focus on the involvement of G0S2 in apoptosis, where by interaction with Bcl-2 it facilitates the release of the Bax protein by disrupting the formation of the Bcl-2/Bax heterodimer. The release of Bax initiates the apoptosis process by inhibiting cell proliferation. The aim of this work is to characterize the molecular interaction of hG0S2 and hBcl-2 proteins during the formation of the hG0S2/hBcl-2 complex using biochemical and biophysical techniques, as well as two site-directed mutations constructed in the C-terminal region of G0S2. For this purpose, SUMO-hG0S2, hBcl-2 and the double mutant SUMO-hG0S2_R57A-D58A were cloned and expressed in the pET28pps vector with the restriction enzymes *NdeI* and *HindIII*. Subsequently, the purification of the constructs was continued by nickel affinity chromatography (Ni-NTA) followed by molecular exclusion chromatography (SEC), then the formation and evaluation of the hG0S2/hBcl-2 complex interaction was performed by SEC and dynamic light scattering (DLS). In addition, crystallization experiments of the hG0S2/hBcl-2 complex were performed using the vapor sitting drop technique. We were able to successfully perform cloning, expression, and purification of each of the constructs obtaining 0.736 mg/ml of hG0S2, 2.4 mg/ml of Bcl-2 and 0.508 mg/ml of the double mutant SUMO-hG0S2_R57A-D58A. Polyacrylamide gels show that the fractions obtained from the chromatograms correspond to each protein. The evaluation of the interaction of the hG0S2/hBcl-2 complex by molecular exclusion chromatography was successful obtaining a complex with a weight of 48.9 kDa, which was confirmed by DLS experiments where we observed a weight of 34.4 kDa. With this sample we proceeded to perform crystallization tests of the complex, but crystals have not yet been obtained. Finally, with these results we can conclude that there is a strong and stable interaction between hG0S2 and hBcl-2 proteins since in the molecular exclusion chromatogram the complex elutes in a single peak. The concentration of the complex should be improved, and different crystallization conditions should be tested.

KEY WORDS. G0S2, purification, apoptosis, crystallization, protein-protein interaction.

La proteína G0S2, análisis de interacción y ensayos de cristalización del complejo G0S2/Bcl-2.

Vega-Becerra L^{1.}, Montero-Morán G.M ^{2.}, Lara-González S^{1*}.

¹ Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT. División de Biología Molecular. Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, 78216 San Luis Potosí, S.L.P. México.

² Gabriela M. Montero-Morán – Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78210, México.
Email: gabriela.montero@uaslp.mx

* Autor de correspondencia: Samuel Lara-González – IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México; orcid.org/0000-0002-3313-0165.
Email: samuel.lara@ipicyt.edu.mx

RESUMEN

G0S2 es una proteína que participa en múltiples procesos celulares en vertebrados. Su función más conocida es la inhibición de la enzima triglicérido lipasa de tejido adiposo, lo que resulta en la regulación negativa de la lipólisis. En este trabajo nos enfocamos en la participación de G0S2 en la apoptosis, donde al interactuar con Bcl-2 se libera la proteína Bax interrumpiendo la formación del heterodímero Bcl-2/Bax. La liberación de Bax da inicio al proceso de apoptosis inhibiendo la proliferación celular. El objetivo de este trabajo es caracterizar la interacción molecular de las proteínas hG0S2 y hBcl-2 durante la formación del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante técnicas bioquímicas, biofísicas y con dos mutantes sitio dirigidas. Para esto se realizó la clonación y expresión de las construcciones SUMO-hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A en el vector pET28pps con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. Posteriormente se continuó con la purificación de las construcciones mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA) y una segunda purificación por cromatografía por exclusión molecular (SEC), después se evaluó la interacción y formación del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante SEC y dispersión dinámica de luz (DLS). Además, se realizaron experimentos de cristalización del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Pudimos realizar exitosamente la clonación, expresión y purificación de cada una de las construcciones obteniendo 0.736 mg/ml de hG0S2, 2.4 mg/ml de Bcl-2 y 0.508 mg/ml de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A. La identidad de las proteínas fue confirmada por geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 17%. La evaluación de la interacción del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante cromatografía de exclusión molecular fue exitosa obteniendo un complejo con un peso de 48.9kDa, el cuál fue confirmado con los experimentos de DLS donde observamos un peso de 34.4 kDa. Con esta muestra se procedió a realizar pruebas de cristalización del complejo, pero aún no se han obtenido cristales. Con estos resultados concluimos que existe una interacción fuerte y estable entre las proteínas hG0S2 y hBcl-2 ya que el complejo eluye en un solo pico. Se debe mejorar la concentración del complejo y probar diferentes condiciones de cristalización.

PALABRAS CLAVE: G0S2, purificación, apoptosis, cristalización, interacción proteína-proteína.

INTRODUCCIÓN

G0S2 es una proteína de 103 aminoácidos descrita por primera vez en células mononucleares donde se expresó de forma diferencial durante la transición del ciclo celular inducido por fármacos desde la fase G0 a la G1 (Russell y Forsdyke 1991). Se ha descrito la expresión de G0S2 en diversos tejidos humanos y murinos, encontrándose en mayores niveles en tejido adiposo e hígado, seguidos por el músculo, ovario y riñón. (Yang et al. 2010; Welch et al. 2009). Esta proteína solo se ha identificado en vertebrados y está altamente conservada entre las especies de ratón y humano con un 78% de identidad global. (Cerk et al. 2018; Páez et al. 2020).

Un análisis *in silico* determinó que las proteínas G0S2 de humano y ratón tienen un dominio hidrofóbico (HD) el cual se presume es la región más estructurada y abarca los residuos 27-42, así mismo se logró identificar que las regiones N- y C-terminal tienden a tener una estructura desordenada (Páez et al. 2020). El análisis detallado de la secuencia de G0S2 humana muestra que está sustancialmente desprovista de aminoácidos promotores del orden, mostrando pocos residuos de leucina y significativamente enriquecida con glutamina y otros residuos promotores al desorden como lisina, arginina, glicina y alanina. Al graficar las propiedades de hidropatía y carga neta media por residuo, un análisis que permite diferenciar proteínas globulares de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP por sus siglas en inglés), se encontró que G0S2 de humano y de ratón se agrupan con las IDPs (Uversky 2002). Esto sugirió la presencia de una región C-terminal desordenada en la proteína de G0S2 humana. (Páez et al. 2020).

El carácter desordenado de G0S2 se confirmó experimentalmente, demostrando que se comporta como IDP del tipo PMG-like. Las primeras evidencias experimentales que se obtuvieron sobre el carácter desordenado de G0S2 se observaron en experimentos de cromatografía de exclusión molecular (SEC) y dispersión dinámica de luz (DLS) donde se demostró que la proteína tiene estructura más abierta y alargada. En el experimento de SEC, el valor de radio de Stokes (R_s) experimental fue de 18.8 Å el cual es 1.1 veces mayor al valor teórico de 17.5 Å con lo que se puede calcular que G0S2 en humano tiene una estructura

globular y un peso molecular de 11.3 kDa. Para obtener más información sobre la estructura de la proteína G0S2 humana, realizaron experimentos de DLS para calcular el radio hidrodinámico (R_h) de esta proteína. Curiosamente, el R_h obtenido fue menor que el valor calculado de R_s , lo que indica que esta proteína difunde como una proteína más pequeña en solución con un tamaño aparente de 8kDa (Páez et al. 2020). El análisis de la estructura secundaria mediante dicroísmo circular (CD) mostró que G0S2 presenta, en solución, 55% de secuencia sin estructura, 25% hebras betas, 19% de giros beta y prácticamente ninguna alfa-hélice, lo que reafirma su carácter desordenado (Páez et al. 2020). A partir de estos estudios se determinó que la proteína G0S2 humana y de ratón son desordenadas del tipo PMG-like, muy similares, donde la de ratón es un poco más globular que la de humano, la cual es más alargada (Páez et al. 2020).

Las IDPs son dinámicas y flexibles y contienen elementos estructurales residuales necesarios para una función adecuada. Esta flexibilidad les permite interactuar con múltiples proteínas mediante una interacción molecular directa, cuando la IDP interacciona con su proteína diana inhibiendo o activando su función se le conoce como “efector”. (Habchi et al. 2014). Además, la exposición y flexibilidad que presentan los residuos en las IDPs es un factor clave que facilita las modificaciones postraduccionales (Habchi et al. 2014). Con estos antecedentes se sugirió que el carácter no estructurado de G0S2 le permite interactuar como efector con múltiples proteínas con funciones reguladoras como sucede en la lipólisis donde inhibe a ATGL (Russell y Forsdyke 1991). Al activar la apoptosis por interacción con Bcl-2 (Russell y Forsdyke 1991; Welch et al. 2009). O al inhibir la proliferación celular por interacción y retención de la nucleolina en el citosol (Yamada et al. 2014).

Por otro lado, el gen Bcl-2 (linfoma de células B2) codifica para la proteína Bcl-2 la cual define y pertenece a la familia de proteínas de Bcl-2, se localiza en la membrana externa mitocondrial, en la envoltura nuclear y en el retículo endoplasmático de las células (Teni 2002; Loro 2003). Bcl-2 regula la liberación de proteínas de la mitocondria que inducen la apoptosis (Bertazza y Mocellin 2008). La familia de proteínas Bcl-2 está conformada tanto por factores antiapoptóticos

como proapoptóticos, que en su secuencia comparten regiones homologas conservadas que se conocen como dominios de homología Bcl-2 (Letai 2008). La función principal de estas proteínas es regular los procesos de permeabilización mitocondrial en la vía intrínseca de la apoptosis celular. Además, tienen otras funciones como lo son la dimerización, actividad de formación del poro y la interacción proteína-proteína (Labi et al. 2008). Este grupo de proteínas se caracteriza por la presencia de uno o hasta cuatro dominios de homología estructuralmente conservados, conocidos como BH1, BH2, BH3 y BH4. Los dominios BH1, BH2 y BH3 se requieren para la interacción entre miembros de la familia Bcl-2, mientras que el dominio BH4 media las funciones de control del ciclo celular (Welch et al. 2009).

La familia de proteínas Bcl-2 se compone de tres grupos basados en su estructura y función:

- a) Las proteínas antiapoptóticas, que contienen por lo general los cuatro dominios de homología. Dentro de este grupo se encuentra Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1 y A1 que contrarrestan el proceso apoptótico a través de la unión directa a las proteínas con dominio único BH3. MCL-1 y Bcl- XL interaccionan con Bak, una vez liberada esta proteína se induce la apoptosis (Ying et al. 2007; Fletcher y Huang 2006).
- b) Las proteínas proapoptóticas Bax/Bak o proteínas efectoras multidominio, comparten homología en los dominios BH1, BH2 y BH3. Bax, presente como monómero en el citosol se somete a un cambio conformacional que junto con Bak, presente al interior de la mitocondria, permiten la liberación del citocromo c de la mitocondria para generar la muerte celular programada (Fletcher y Huang 2006).
- c) Las proteínas de dominio único BH3 que comparten homología únicamente en el dominio BH3, vigilan el bienestar de la célula y se activan en respuesta a señales de estrés. Dentro de este grupo se encuentran Bid, Bad, Bik, Bim, BMF, HRK, NOXA y PUMA (Puthalakath et al. 2007; Shamas et al. 2011).

Las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas forman heterodímeros en los cuales se inhibe la actividad de la proteína proapoptótica. Esta dimerización se ve

influenciada por la fosforilación de los residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal de los miembros proapoptóticos BAX, BAK y BIK. El nivel de expresión de cada proteína de la familia Bcl-2 está controlado a nivel transcripcional, por heterodimerización y por ubiquitinación. La fosforilación de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 inhibe la unión de estas proteínas y promueve su ubiquitinación. La apoptosis está, por tanto, profundamente asociada a la fosforilación de las proteínas de la familia Bcl-2. (Li et al. 2004). Bad es un ejemplo de la regulación de la actividad por fosforilación, cuando está desfosforilada se asocia a Bcl-XL en la mitocondria y promueve la apoptosis, en cambio, al ser fosforilada se encuentra en el citoplasma asociada a la proteína chaperona 14-3-3, perdiendo su capacidad de interactuar con Bcl-XL (Fleischer et al. 2004).

G0S2 y su interacción con Bcl-2 en la apoptosis

Las proteínas Bcl-2 regulan la liberación de proteínas de la mitocondria que inducen a la apoptosis. El FNT- α promueve la apoptosis a través de la unión a su receptor de superficie celular, TNFR1, lo que lleva a la activación de las vías de transducción de señales posteriores. La señalización a través del TNFR1 provoca la rápida activación de dos importantes factores de transcripción heterodiméricos, la proteína activadora-1 y el NF- κ B. El NF- κ B puede inhibir o inducir la apoptosis dependiendo del tipo de célula, el grado de activación del NF- κ B y la naturaleza de la señal apoptótica. NF- κ B tiene la capacidad de presentar actividades tanto proapoptóticas como antiapoptóticas (Dutta et al. 2006).

G0S2 es inducido por FNT- α a través de la activación de NF- κ B. Esto se describió con ensayos con microarreglos de cDNA de alta densidad donde compararon los perfiles de expresión de PFF humanos tratados en presencia o ausencia de FNT- α . Así mismo, determinaron su localización subcelular y confirmaron que G0S2 está presente en las mitocondrias (Welch et al. 2009). Para comprobar si G0S2 interactúa con algún otro miembro de la familia Bcl-2 se cotransfectaron células renales embrionarias (HEK293) con plásmidos que expresaban G0S2-HA y un miembro de la familia Bcl-2 marcado con FLAG. G0S2-HA se inmunoprecipitó con el anticuerpo α -HA y el inmunoprecipitado del miembro de la familia Bcl-2 se analizó mediante inmunotransferencia con un anticuerpo α -FLAG. Este estudio

mostró que de las proteínas analizadas solo Bcl-2 era detectable en el inmunoprecipitado de G0S2. Para confirmar la asociación entre G0S2 y Bcl-2, se infectaron células HeLa con Ad-G0S2, G0S2 se inmunoprecipitó de la fracción mitocondrial utilizando un anticuerpo α -HA y el inmunoprecipitado se analizó en busca de Bcl-2 endógena utilizando un anticuerpo α -Bcl-2. Con esto se demostró que Bcl-2 estaba presente en el inmunoprecipitado de las células infectadas con Ad-G0S2, pero no de las células de control infectadas con Ad-LacZ. Los ensayos de GST pull-down de Bcl-2 purificada marcada con GST y G0S2 marcada con [35S]metionina confirmaron que la interacción entre G0S2 y Bcl-2 es directa. En este mismo estudio determinaron que G0S2 interactúa directamente con Bcl-2 in vivo, usando plásmidos que expresaban ECFP fusionada al COOH terminal de Bcl-2 o Bad (Bcl-2-ECFP o Bad-ECFP, respectivamente) y EYFP fusionada al COOH terminal de G0S2 (G0S2-EYFP). Estas construcciones se transfectaron transitoriamente en células colorrectales HCT116 en combinaciones de pares, y las líneas celulares se analizaron mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia donde se observó una señal de transferencia de energía en las células que expresaban Bcl-2-ECFP y G0S2-EYFP, pero no en células que expresan Bad-ECFP y G0S2-EYFP. Todos estos resultados indican que G0S2 interactúa directamente con Bcl-2 tanto in vitro como in vivo (Welch et al. 2009). Con los hallazgos anteriores se planteó la posibilidad de que G0S2 puede tener actividad proapoptótica o antiapoptótica. Por lo tanto, se probó si la expresión ectópica de G0S2 podía inducir apoptosis en células H1299 y HCT116 que fueron infectadas con Ad-G0S2 o Ad-LacZ y posteriormente se tiñeron con un conjugado de anexina (Annexin V-PE), en ambas líneas celulares, la expresión de Ad-G0S2 indujo una apoptosis pronunciada, mientras que en Ad-LacZ se observó poca o ninguna muerte celular. Después, se examinó si la capacidad de G0S2 de inducir la apoptosis e interactuar con Bcl-2 son actividades relacionadas, para esto se generaron mutantes de G0S2 que tuvieran afectada la capacidad de interactuar con Bcl-2. Esto se hizo determinando la región de G0S2 necesaria para la interacción con Bcl-2 usando mutantes de delección de G0S2 en los que fragmentos donde G0S2 se fusiona con el extremo COOH de la GFP. Los experimentos de coimmunoprecipitación mostraron que sólo las construcciones

que albergan la región central de G0S2 (aminoácidos 33-67) interactuaban con Bcl-2. A continuación construyeron una serie de mutantes puntuales en la región central mutando pares de aminoácidos por alanina. Se observó que las mutaciones en los aminoácidos 35 a 46 conservaron la asociación con Bcl-2 a un nivel comparable al de la proteína G0S2 de tipo silvestre. Sin embargo, las mutaciones de los aminoácidos 50 a 58 redujeron la interacción con Bcl-2; en específico, en el derivado mutante de G0S2 donde la arginina 57 y el ácido aspártico 58 estaban mutados (R57A, D58A) se redujo drásticamente la interacción con Bcl-2. Para comprobar si la mutante G0S2(R57A, D58A) tenía actividad apoptótica se transfectaron células H2119 con un adenovirus que expresaba G0S2 de tipo silvestre o el mutante G0S2(R57A, D58A), con esto se observó que la capacidad que tiene G0S2(R57A, D58A) de inducir la apoptosis se reduce significativamente en comparación con la proteína de tipo silvestre. Estos resultados indican que la interacción con Bcl-2 es necesaria para que G0S2 induzca la apoptosis.

A pesar de que se ha demostrado que G0S2 activa la apoptosis al interactuar directamente con Bcl-2 a nivel celular, aún quedan varias preguntas por resolver a nivel proteína. Por ejemplo, no se han descrito cuales son los residuos de Bcl-2 que interactúan con G0S2, tampoco se ha descrito el cambio conformacional de Bcl-2 provocado por G0S2 que permite la disociación del complejo Bax/Bcl-2, tampoco se ha descrito cual es la señal que permite que G0S2 se exprese y permita la disociación del heterodímero. Además, es probable que G0S2, que es una proteína intrínsecamente desordenada, adquiera estructura secundaria al interactuar con Bcl-2. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue sentar las bases para la caracterización molecular de la interacción entre G0S2 y Bcl-2 mediante técnicas bioquímicas, biofísicas y con mutantes sitio dirigidas. Para ello, expresamos y purificamos a Bcl-2, a G0S2, una doble mutante de G0S2 que se ha propuesto inhibe la interacción con Bcl-2 de humano. Hasta el momento hemos conseguido demostrar que las proteínas silvestres interactúan fuertemente formando un complejo que hemos caracterizado por SEC y DLS. Además, mediante los ensayos de SEC se confirmó que la interacción entre las proteínas

nativas es muy estable ya que en el cromatograma observamos que el complejo eluye en un solo pico con un peso de 48.9 kDa. Por otro lado, los ensayos de DLS demostraron que tanto las proteínas nativas, la doble mutante y el complejo presentan una masa monodispersa. Con estos resultados pudimos concluir que para montar nuevas pruebas de cristalización es necesario aumentar la concentración de proteína para lograr formar algún cristal y probar más condiciones de cristalización. Finalmente, aún queda pendiente dilucidar cual es la región donde se realiza la interacción proteína-proteína por lo cual se continuará con los ensayos de caracterización de la doble mutante de G0S2. Esto nos permitirá a largo plazo responder algunas de las preguntas planteadas y probablemente obtener la estructura cristalográfica del complejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación de las proteínas SUMO_hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A.

En el laboratorio ya se contaba con las construcciones SUMO_hG0S2 y hBcl-2, esta última fue optimizada anteriormente por mi compañera de laboratorio Liliana Gómez para su trabajo de tesis de maestría en el año 2022. Se clonaron en el vector de expresión pET28 modificado (pET28pps); donde se incluyó una etiqueta de histidinas y se intercambié el sitio de trombina por un sitio de corte para la proteasa PreScission Pretease (PPS). SUMO_hG0S2 expresa la etiqueta 6XHis, seguida de SUMO, luego la etiqueta de PPS y al final hG0S2. hBcl-2 expresa la etiqueta 6XHis, después la etiqueta de PPS y al final hBcl-2. Por otro lado, para la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A, el gen de la doble mutante se optimizó para su expresión en bacterias, se adaptó el uso de codones para *E.coli* y se modificó el %GC entre 30-70%, los oligos T7 forward y reverse y el gen optimizado se adquirieron de la empresa UNIPARTS SA DE CV, estos se utilizaron para la obtención de la doble mutante R57A/D58A. El primer paso para la clonación del gblock de G0S2_R57A-D58A fue la digestión y desfosforilación del gblock de G0S2_R57A-D58A en el vector específico pET28-pps, usando las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. Las reacciones se dejaron incubar por 1 hora a 37°C en el termociclador y se desactivaron a 80°C por 30 minutos. Posteriormente se continuó con las reacciones de ligación con la DNA ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) esta reacción se hizo con una concentración del vector de 50 ng y 15 ng del inserto. Se marcaron dos tubos para PCR, uno positivo que contenía pET28pps AP/*NdeI*/*HindIII*, gblock G0S2_R57A-D58A *NdeI*/*HindIII*, buffer de la DNA ligasa T4, agua y la DNA ligasa T4; el segundo tubo se marcó como negativo, el cual no contenía la construcción del gblock G0S2_R57A-D58A *NdeI*/*HindIII*. Se incubaron por 20 minutos a 25°C. Se transformaron en células Top-10 y la identificación de la clona positiva se realizó mediante PCR en colonia y ensayos de restricción enzimática. Las construcciones se confirmaron por secuenciación en el LANBAMA y se comprobó que la secuencia era idéntica.

Evaluación de la expresión de las proteínas.

Para evaluar la expresión de cada una de las proteínas se realizó por separado la transformación por choque térmico a la cepa BL21 (DE3) Star de *E.coli*. Las células transformadas se incubaron en 50 ml de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina durante toda la noche a 28°C; 25 ml de este cultivo se tomaron para inocular 500 ml de medio LB suplementado con 500 µg/ml de kanamicina; el cual se dejó incubar hasta que alcanzara una densidad óptica entre 0.6-0.8 a 600 nm. La expresión de las proteínas se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM. Después, el cultivo celular de pETSUMO/hG0S2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A se incubaron 18 hrs a 28°C, mientras que pET28/hBcl-2 se incubó a 16°C por 18 hrs. Las células se recolectaron por centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se almacenaron a -20°C. Se tomaron muestras de 1ml a las células inducidas y sin inducir para evaluarlas por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15% y 17% respectivamente.

Purificación de las proteínas.

La biomasa obtenida de la expresión de 500 ml de células BL21 (DE3) Star transformadas con las construcciones pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A se purificaron por separado.

Purificación de pETSUMO/hG0S2. La biomasa de pETSUMO/hG0S2 se suspendió en el amortiguador de lisis (50mM TRIS pH8, 300mM NaCl y 10mM imidazol). Las células se lisaron por sonicación durante 30 ciclos de 15 seg ON/45 seg OFF con una amplitud del 50%, en baño de hielo. Posteriormente el lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó la fracción soluble y se filtró con membrana de 0.45 µm para transferirlo a una columna de agarosa Ni-NTA JENA de 3 ml que se equilibró previamente con 10 volúmenes de columna (CV) del amortiguador de lisis. El frente de la inyección se recolectó y se etiquetó como “no unido”, se realizó el primer lavado con 10 CV del amortiguador de lisis que tenía una concentración de imidazol de 10 mM recolectando 10 ml en el tubo 1 y otros 10 ml en el tubo 2. La elución de la proteína se realizó con un

gradiente escalonado con 50, 250 y 500 mM de imidazol preparado en amortiguador de lisis. Las fracciones eluidas se recolectaron y analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15%. Las fracciones donde eluyó mayormente la proteína SUMO-hG0S2 se juntaron y se sometieron a digestión con 5 unidades de la enzima PPS por mililitro durante toda la noche a 4°C, posteriormente se desalaron en columnas PD-10. Una vez que la proteína se desalo se procedió a concentrarla por microfiltración en un vivaspin 15 turbo con una membrana de retención de 3 kDa (Sartorius). La muestra se filtró en una membrana de 0.22 μm y se inyectó en el equipo FPLC AKTA con la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). Se realizaron dos inyecciones de 500 μl de muestra, con un flujo de 0.8 ml/min con el amortiguador (20mM TRIS pH8, 300mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT) y un volumen de elución de 1.5 CV. Por último, el cromatograma obtenido de la purificación se analizó en el software UNICORN versión 5.31 y las fracciones correspondientes a los picos se analizaron mediante geles de SDS-poliacrilamida al 15%.

Purificación de pET28/hBcl-2. La biomasa de pET28/hBcl-2 se resuspendió con el amortiguador de lisis (40mM TRIS pH8, 110mM NaCl, 1mM DTT, 2.2mM KCl, 5% glicerol, 2% CHAPS y 10mM imidazol). Las células se lisaron por sonicación durante 30 ciclos de 15 seg ON/45 seg OFF con una amplitud del 50%, en baño de hielo. Posteriormente el lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fracción soluble recolectada se filtró con una membrana 0.45 μm y se transfirió a una columna de agarosa Ni-NTA JENA de 3 ml que se equilibró previamente con 10 CV del amortiguador de lisis. El frente de la inyección se recolectó y se etiquetó como “no unido”, el primer lavado se realizó con 10 CV del amortiguador de lisis que tenía una concentración de imidazol de 10 mM recolectando 10 ml en el tubo 1 y otros 10 ml en el tubo 2. La elución de la proteína se realizó con un gradiente escalonado con 50, 250 y 500 mM de imidazol preparado en amortiguador de lisis. Las fracciones eluidas se recolectaron y analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 17%. Las fracciones donde eluyó mayormente la proteína pET28/hBcl-2 se juntaron y se sometieron a digestión con 5 unidades de la enzima PPS por mililitro durante toda la noche a 4°C, posteriormente se desalaron en columnas PD-10. Una vez que la

proteína se desalo se procedió a concentrarla por microfiltración en un concentrador vivaspin 15 turbo con una membrana de retención de 10 kDa. La muestra se filtró en una membrana de 0.22 μm y se inyectó en el equipo FPLC AKTA con la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). Se realizaron dos inyecciones de 500 μl de muestra, con un flujo de 0.8 ml/min con el amortiguador (20mM TRIS pH8, 300mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT) y un volumen de elución de 1.5 CV. Finalmente, el cromatograma obtenido de la purificación se analizó en el software UNICORN 5.31 y las fracciones correspondientes a los picos se analizaron mediante geles de SDS-poliacrilamida al 17%.

Purificación de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A. La biomasa de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A se resuspendió con el amortiguador de lisis (50mM TRIS pH8, 300mM NaCl y 10mM imidazol). Las células se lisaron por sonicación durante 30 ciclos de 15 seg ON/45 seg OFF con una amplitud del 50%, en baño de hielo. Posteriormente el lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fracción soluble se recolectó y filtró con una membrana de 0.45 μm para transferirla a una columna de agarosa Ni-NTA JENA de 3 ml que se equilibró previamente con 10 CV del amortiguador de lisis. El frente de la inyección se recolectó y se etiquetó como “no unido”, el primer lavado se realizó con 10 CV del amortiguador de lisis que tenía una concentración de imidazol de 10 mM recolectando 10 ml en el tubo 1 y otros 10 ml en el tubo 2. La elución de la proteína se realizó con un gradiente escalonado con 50, 250 y 500 mM de imidazol preparado en amortiguador de lisis. Las fracciones se recolectaron y analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15%. Las fracciones donde eluyó mayormente la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A se juntaron y concentraron por microfiltración en un vivaspin 15 turbo con una membrana de retención de 3 kDa. La muestra se filtró en una membrana de 0.22 μm y se inyectó en el equipo FPLC AKTA con la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). Se realizaron dos inyecciones de 500 μl de muestra, con un flujo de 0.8 ml/min con el amortiguador (20mM TRIS pH8, 300mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT) y un volumen de elución de 1.5 CV. Por último, el cromatograma obtenido de la purificación se

analizó en el software UNICORN 5.31 y las fracciones correspondientes a los picos se analizaron mediante geles de SDS-poliacrilamida al 15%.

Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Se purificaron las proteínas SUMO-hG0S2 y hBcl-2 con el protocolo descrito anteriormente sin cortar con PPS, por lo que obtuvimos a las proteínas SUMO-hG0S2 y a hBcl-2 con la etiqueta 6XHis. El complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 se formó al mezclar ambas proteínas en una relación equimolar 1.3:1.0, el complejo se concentró por microfiltración en un concentrador vivaspin con una membrana de retención de 3 kDa hasta alcanzar una concentración final de 1.44 mg/ml. La muestra (1ml) se filtró en una membrana de 0.22 μ m y se inyectó en el equipo FPLC AKTA con la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). Se realizaron dos inyecciones de 500 μ l de muestra, con un flujo de 0.8 ml/min con el amortiguador (20mM TRIS pH8, 300mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT) y un volumen de elución de 1.5 CV. El cromatograma se analizó con el software UNICORN 5.31 y las fracciones correspondientes a los picos se analizaron mediante geles de poliacrilamida al 17%.

Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/hBcl-2 por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Se purificaron las proteínas SUMO-hG0S2_R57A-D58A y hBcl-2 con el protocolo descrito anteriormente sin cortar con PPS, por lo que obtuvimos a las proteínas SUMO-hG0S2_R57A-D58A y a hBcl-2 con la etiqueta 6XHis. El complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 se formó al mezclar ambas proteínas en una relación equimolar 1.3:1.0, el complejo se concentró por microfiltración en un concentrador vivaspin con una membrana de retención de 3 kDa hasta alcanzar una concentración final de 2.03 mg/ml. La muestra (1ml) se filtró en una membrana de 0.22 μ m y se inyectó en el equipo FPLC AKTA con la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). Se realizaron dos inyecciones de 500 μ l de muestra, con un flujo de 0.8 ml/min con el amortiguador (20mM TRIS pH8, 300mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT) y un volumen de elución de 1.5 CV. El

cromatograma se analizó con el software UNICORN 5.31 y las fracciones correspondientes a los picos se analizaron mediante geles de SDS-poliacrilamida al 17%.

Experimentos de cristalización.

Para los ensayos de cristalización se utilizaron los complejos purificados en las secciones anteriores, los cuales se concentraron en un concentrador vivaspin con una membrana de retención de 3kDa y posteriormente se ultrafiltró la muestra con una membrana AmiconUltra-0.5 (Millipore). Se montaron gotas 1:1 (0.9 μ l proteína y 0.9 μ l precipitante) usando la técnica de cristalización por difusión de vapor en gota sentada con placas de 98 pocillos. El volumen en el pozo del precipitante fue de 50 μ l y el volumen de la gota de cristalización fue de 2 μ l. Se exploraron 89 condiciones de cristalización del kit de cristalización Crystal Screen I y II de Hampton Research. La placa se selló e incubó a 16°C. El experimento de cristalización se monitoreó periódicamente en el microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168)

Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS).

El peso molecular de cada proteína y de los complejos se estimó a partir de las mediciones del radio hidrodinámico (Rh) que se realizaron en el equipo Zetasizer APS (Malvern Instruments) con el software Malvern Zetasizer. Para cada proteína se tomaron 80 μ l de volumen final de reacción, y se corrieron por separado donde la proteína SUMO-hG0S2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A tenían una concentración de 1 mg/ml, hBcl-2 tenía una concentración final de 0.5 mg/ml y los complejos SUMO-hG0S2/hBcl-2 y SUMO-hG0S2-R57A-D58A/Bcl-2 tenían una concentración de 1 mg/ml, cada muestra se incubó en el amortiguador 20 mM Tris pH8, 300 mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT. El equipo fue programado para que realizara un correlograma con 12 lecturas por muestra cada 20 minutos por dos horas a una temperatura de 25°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación de SUMO_hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO/hG0S2_R57A-D58A.

Se realizó la clonación de las proteínas SUMO_hG0S2 y hBcl-2 y de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A (Tabla 1) con el fin de obtener a las proteínas puras y solubles para su caracterización. En el laboratorio ya se contaba con las construcciones de las proteínas SUMO_hG0S2 y hBcl-2. Se obtuvo la construcción de la doble mutante de G0S2 la cual se nombró como pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A que contiene el gen de interés en el vector específico pET28pps, entre los sitios de corte *NdeI* y *HindIII*, se identificó el inserto esperado de 925 pb (Figura 1), el cuál fue comprobado por ensayos de restricción. Por último, se secuenció la clona en LANBAMA y se verificó la integridad de la secuencia, concluyendo que la clonación fue exitosa.

Tabla 1. Construcciones de las proteínas hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante G0S2_R57A-D58A.

	Construcción		Vector	Residuos	Expresada	Purificada
1	G0S2	Humano	pET28-SUMO-PPS	1-103	Si	Si
2	Bcl-2Δ212-239	Humano	pET28-PPS	1-211	Si	Si
Este proyecto:						
3	R57A G0S2	Humano	pET28-SUMO-PPS	1-103	En proceso	En proceso
4	D58A G0S2	Humano	pET28-SUMO-PPS	1-103	En proceso	En proceso
5	R57A/D58A G0S2	Humano	pET28-SUMO-PPS	1-103	Si	Si

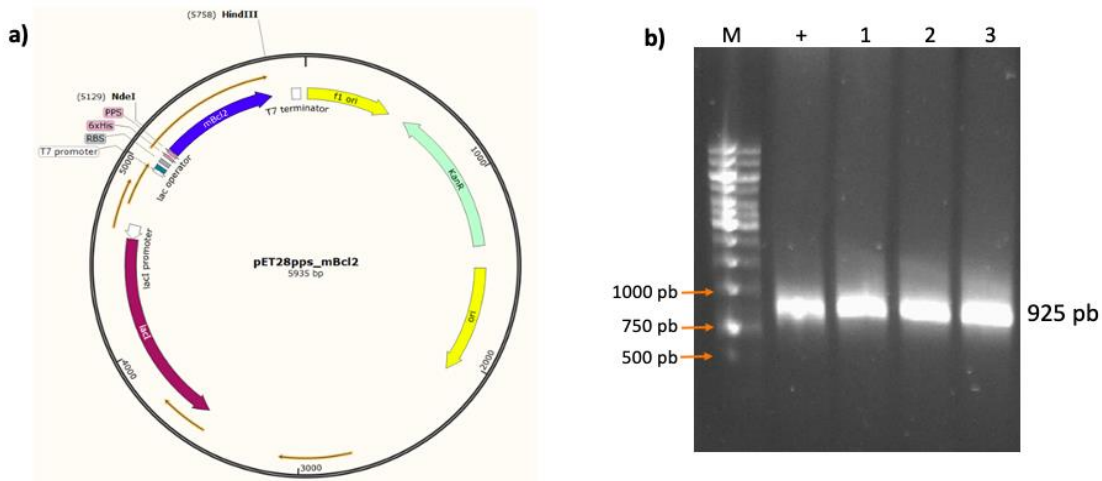


Figura 1. Clonación de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.

- a) Vector específico de clonación pET28pps para las construcciones generadas.
- b) Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de las colonias positivas identificadas por PCR de colonia con los oligos externos T7 forward y reverse. Donde **M**: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. **Carril +**: control positivo. **Carril 1, 2 y 3**: el inserto esperado con un peso de 925 pb de acuerdo con el control positivo.

Expresión y purificación de las construcciones pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.

a. Expresión de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.

Las construcciones de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A se expresaron en la cepa BL21 (DE3) Star de *E.coli* en medio LB suplementado con kanamicina. La expresión se indujo con IPTG a una concentración final de 1mM. Las construcciones de las proteínas pETSUMO/hG0S2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A se incubaron por 18 hrs a 28°C mientras que la construcción pET28/hBcl-2 se incubo por 18 hrs a 16°C. Las muestras tomadas de cada construcción antes y después de inducir la expresión se analizaron por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15% para pETSUMO/hG0S2 y la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A y en geles de poliacrilamida al 17% para

pET28/hBcl-2 (Figura 2). En la figura 2a se puede observar en el carril 2 una banda diferencial con un peso de 25.6 kDa que corresponde a la proteína SUMO-hG0S2, en el carril 2 de la figura 2b se logra observar una banda diferencial con un peso de 23.3 kDa que corresponde a la proteína hBcl-2 y finalmente, en el carril 3 de la figura 2c se puede observar una banda diferencial con un peso de 25 kDa que corresponde a la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A.

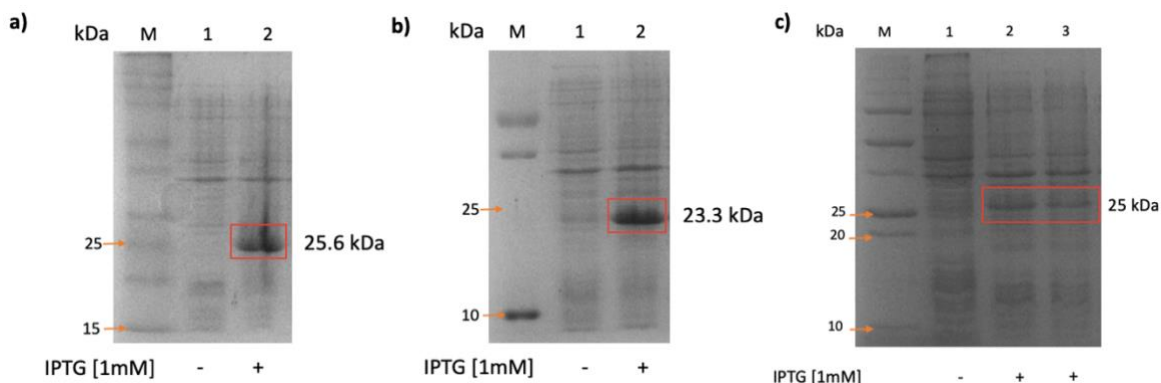


Figura 2. Expresión de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.

a) Gel de poliacrilamida 15% de la expresión de la proteína SUMO-hG0S2, donde **M**: marcador; **1**: tiempo antes de inducir la expresión; **2**: 18 hrs después de inducir la expresión a 28°C. **b)** Gel de poliacrilamida 17% de la expresión de la proteína hBcl-2, donde **M**: marcador; **1**: tiempo antes de inducir la expresión; **2**: 18 hrs después de inducir la expresión a 16°C. **c)** Gel de poliacrilamida 15% de la expresión de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A, donde **M**: marcador; **1**: tiempo antes de inducir la expresión; **2**: 18 hrs después de inducir la expresión a 28°C; **3**: 18 hrs después de inducir la expresión a 28°C.

b. Purificación de las proteínas pETSUMO/hG0S2, pET28/hBcl-2 y de la doble mutante pETSUMO/hG0S2_R57A-D58A.

En la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) se utiliza la afinidad diferencial que algunos grupos funcionales tienen en la superficie de las proteínas por los iones metálicos inmovilizados para realizar su separación. Esta afinidad diferencial se debe a los enlaces covalentes coordinados que se forman entre los iones metálicos inmovilizados y las cadenas laterales de aminoácidos

situados en la superficie de las proteínas (Arnold 1991; Chaga 2001). Algunos aminoácidos como la histidina tienen en sus cadenas laterales átomos donadores de electrones, mientras que los iones metálicos como el Ni^{2+} presentan uno o varios centros de coordinación accesibles; el ion metálico se encuentra complejado por la presencia de un agente quelante que lo inmoviliza, estabiliza y permite su interacción (Arnold 1991). El ácido nitrilotriacético (NTA) es un agente quelante mejorado para la purificación de proteínas recombinantes modificadas genéticamente para generar polipéptidos con extensión de oligohistidina (etiquetados con His); la introducción de este ácido representó la aplicación más importante en la cromatografía IMAC (Block et al. 2009).

De esta manera, se produce el enlace covalente coordinado en el que las cadenas laterales donadoras de electrones presentes en los aminoácidos comparten sus electrones con el ion metálico inmovilizado. Las proteínas enlazadas a los metales quelados eluyen utilizando bases de Lewis, como el imidazol, este se asemeja a la cadena lateral de la histidina que compete con las proteínas etiquetadas con His y las desplaza de la columna (Arnold 1991; Ueda et al. 2003).

Otro punto importante es el pH ya que la adsorción de las proteínas se lleva a cabo a un pH donde los grupos donantes de electrones presentes en la superficie de la proteína estén parcialmente protonados. En general, se sabe que un intervalo de pH de 6 a 8 favorece la retención de proteínas mediante sus histidinas y cisteínas superficiales, y que cuando el valor del pH se encuentra por encima de 8 se favorece la coordinación con grupos amino, lo que disminuye la selectividad (Ueda et al. 2003; Wong et al. 1991).

El proceso de purificación comenzó con la cromatografía de afinidad a níquel de las proteínas SUMO-hG0S2, hBcl-2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A. Estas son proteínas de fusión que contienen en su extremo N-terminal una etiqueta de histidinas (6xHis) que se une de manera eficiente a la columna de Agarosa Ni-NTA y esto permite que se eliminen una gran cantidad de proteínas contaminantes en esta primera etapa de purificación (Figura 3). Para la elución de cada proteína se realizaron lavados con un gradiente creciente de imidazol. Las fracciones eluidas de cada proteína se recolectaron y analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% y 17% (Figura 3a, 3b y 3c). En el gel de

poliacrilamida al 15% observamos que la proteína SUMO-hG0S2 comienza a eluir desde la primera fracción de 50mM de imidazol, pero la concentración de la proteína es mayor en la primera y segunda fracción de 250mM de imidazol (Figura 3a). Por otro lado, en el gel de poliacrilamida al 17% de las fracciones recolectadas de la proteína hBcl-2 observamos que la proteína comienza a eluir en la primera fracción de 50mM de imidazol, sin embargo, la concentración de la proteína es mucho mayor a partir de la primera fracción de 250mM de imidazol (Figura 3b). Finalmente, en el gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones recolectadas de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A observamos que comienza a eluir desde la primera fracción de 250mM de imidazol, pero la mayor concentración de proteína eluye a partir de la tercera fracción de 250mM de imidazol (Figura 3c).

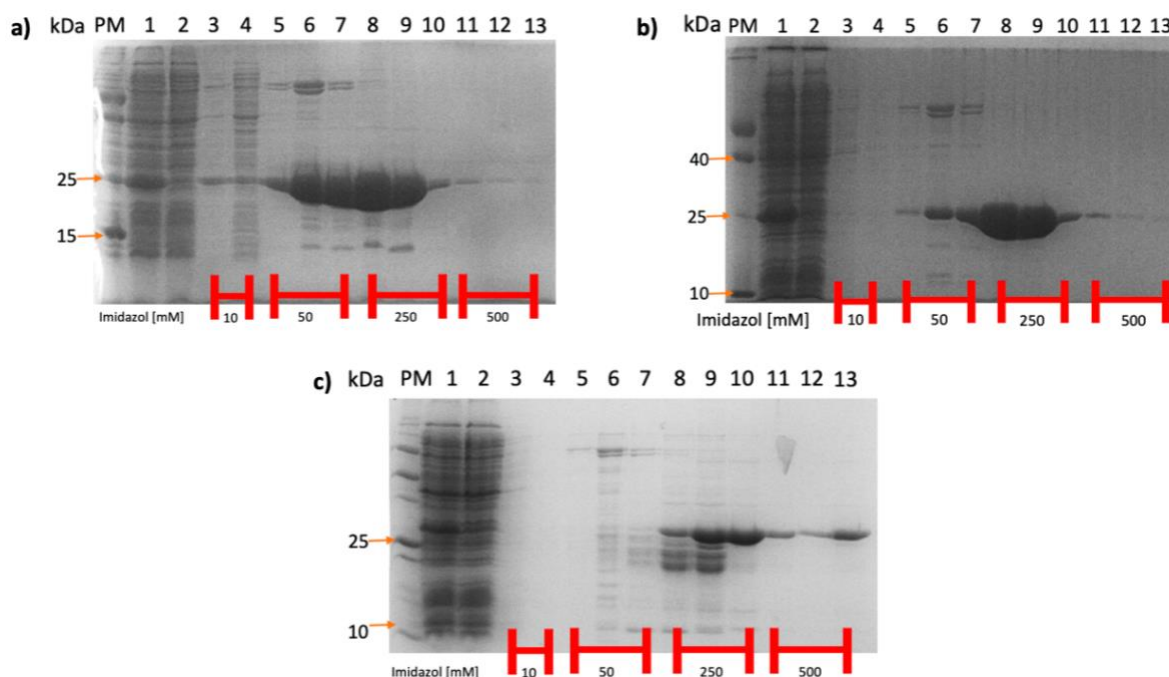


Figura 3. Purificación por Ni-NTA de las proteínas SUMO-hG0S2, hBcl-2 y de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A.

a) Gel de poliacrilamida 15% de la purificación de SUMO-hG0S2 por cromatografía de afinidad a níquel, donde **PM**: marcador; **1**: sobrenadante del extracto celular; **2**: proteína no unida; **3 y 4**: elución con 10 mM de imidazol; **5, 6 y 7**: elución con 50 mM de imidazol; **8, 9 y 10**: elución con 250 mM de imidazol; **11, 12 y 13**: elución con 500 mM de imidazol. **b)** Gel de poliacrilamida 17% de la

purificación de hBcl-2 por cromatografía de afinidad a níquel, donde **PM**: marcador; **1**: sobrenadante del extracto celular; **2**: proteína no unida; **3 y 4**: elución con 10 mM de imidazol; **5, 6 y 7**: elución con 50 mM de imidazol; **8, 9 y 10**: elución con 250 mM de imidazol; **11, 12 y 13**: elución con 500 mM de imidazol. **c)** Gel de poliacrilamida 15% de la purificación de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A por cromatografía de afinidad a níquel, donde **PM**: marcador; **1**: sobrenadante del extracto celular; **2**: proteína no unida; **3 y 4**: elución con 10 mM de imidazol; **5, 6 y 7**: elución con 50 mM de imidazol; **8, 9 y 10**: elución con 250 mM de imidazol; **11, 12 y 13**: elución con 500 mM de imidazol.

Las fracciones enriquecidas en la proteína SUMO-hG0S2 se trataron con la proteasa PPS para eliminar la etiqueta de histidinas y posteriormente se desalaron en una columna PD-10. La muestra desalada se concentró por microfiltración en un concentrador de 3 kDa, obteniendo un rendimiento de 0.27 mg de proteína/L de cultivo. Este mismo procedimiento se siguió con la proteína hBcl-2 donde después de someterla a digestión con PPS, se desaló y se concentró por microfiltración en un concentrador de 10 kDa, obteniendo un rendimiento de 19.71 mg de proteína/L de cultivo. La doble mutante hG0S2_R57A-D58A no se cortó con PPS por lo que el peso estimado en filtración en gel corresponde a la proteína de fusión SUMO-G0S2_R57A-D58A, las fracciones donde eluyó mayormente la proteína se juntaron y concentraron por microfiltración en un concentrador de 3 kDa, obteniendo un rendimiento de 1.86 mg de proteína/L de cultivo.

La cromatografía de exclusión por tamaño o exclusión molecular (SEC) es el proceso de separación de moléculas en función de su tamaño cuando una solución fluye a través de una cama de empaquetamiento porosa (Kostanski et al. 2004). Idealmente, la separación por tamaños se consigue por permeación diferencial de los poros. (Kostanski et al. 2004). El tiempo de retención depende de la capacidad de cada proteína para acceder a los poros de la matriz. Las moléculas grandes permanecen en el volumen externo a las microesferas, ya que no pueden entrar en los poros. El trayecto de flujo resultante es más corto, por lo que atraviesan la columna con relativa rapidez y emergen antes. Las moléculas pequeñas que pueden acceder al líquido dentro de los poros de las microesferas

se retienen durante más tiempo y, por lo tanto, pasan más lentamente a través de la columna (Cutler 2004). La SEC se suele utilizar al final de un esquema de purificación cuando el número de impurezas es bajo y la proteína objetivo se ha purificado y concentrado mediante pasos cromatográficos previos.

Para los ensayos purificación por cromatografía de exclusión molecular, las muestras previamente concentradas de cada proteína se filtraron por separado en una membrana de 0.22 μm , para ser inyectadas en la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences) usando el equipo FPLC AKTA. Los cromatogramas obtenidos de la purificación por cromatografía de exclusión molecular se analizaron mediante el software UNICORN (Figura 4). La figura 4a muestra el cromatograma de la proteína SUMO-hG0S2 y vemos que la proteína eluye en un volumen de retención de 15 ml, se tomaron muestras desde el volumen de retención 13 ml al 17 ml y mediante una electroforesis de poliacrilamida al 15% (Figura 4b) pudimos comprobar que efectivamente la proteína se encontraba ahí con un peso de 11.3 kDa con un rendimiento de 0736 mg/ml. En la figura 4b se observa el cromatograma obtenido de la proteína hBcl-2 y vemos que esta eluye en un volumen de retención de 12 ml, se tomaron muestras desde el volumen de retención 11 ml al 14 ml y mediante una electroforesis de poliacrilamida al 17% (Figura 4d) pudimos comprobar que efectivamente la proteína se encontraba ahí con un peso de 23.3 kDa con un rendimiento de 2.4 mg/ml. Para el caso del cromatograma la doble mutante SUMO/hG0S2_R57A-D58A (Figura e) podemos observar que eluye en un solo pico con un volumen de retención de 14 ml, se tomaron muestras desde el volumen de retención 11 ml al 17 ml y mediante una electroforesis de poliacrilamida al 15% (Figura 4f) pudimos comprobar que efectivamente la proteína se encontraba ahí con un peso de 25 kDa con un rendimiento de 0.508 mg/ml.

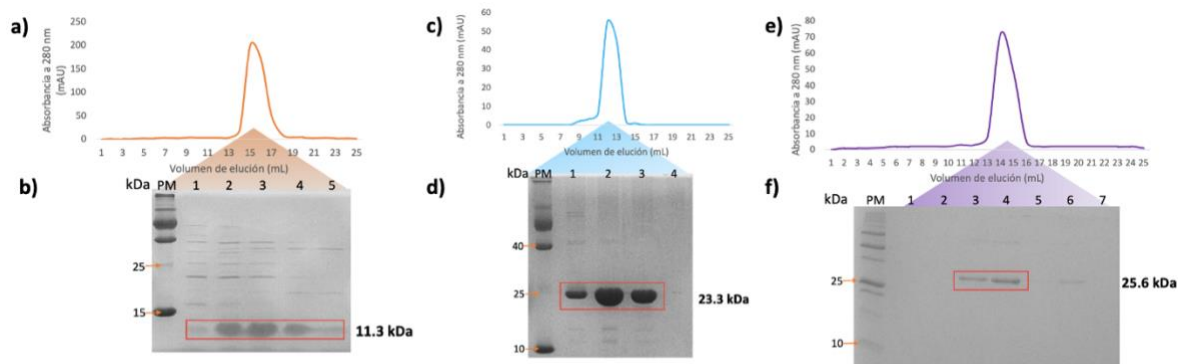


Figura 4. Purificación por exclusión molecular de las proteínas hG0S2, hBcl-2 y de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A.

a) Cromatograma de la purificación de hG0S2 por exclusión molecular. La proteína eluye mayormente en el volumen de retención 15ml. **b)** Gel de poliacrilamida 15% de las fracciones obtenidas por exclusión molecular (inciso a), donde **PM**: marcador; **1**: volumen de retención 13 ml; **2**: volumen de retención 14 ml; **3**: volumen de retención 15 ml; **4**: volumen de retención 16 ml; **5**: volumen de retención 17 ml, el recuadro rojo señala a la proteína hG0S2 que tiene un peso de 11.3 kDa. **c)** Cromatograma de la purificación de hBcl-2 por exclusión molecular. La proteína eluye mayormente en el volumen de retención 12 ml. **d)** Gel de poliacrilamida 17% de las fracciones obtenidas por exclusión molecular (inciso c), **PM**: marcador; **1**: volumen de retención 11 ml; **2**: volumen de retención 12 ml; **3**: volumen de retención 13 ml; **4**: volumen de retención 14 ml; el recuadro rojo señala a la proteína hBcl-2 que tiene un peso de 23.3kDa. **e)** Cromatograma de la purificación de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A por exclusión molecular. La proteína eluye mayormente en el volumen de retención 14 ml. **f)** Gel de poliacrilamida 15% de las fracciones obtenidas por exclusión molecular (inciso e), donde **PM**: marcador; **1**: volumen de retención 11 ml; **2**: volumen de retención 12 ml; **3**: volumen de retención 13 ml; **4**: volumen de retención 14 ml; **5**: volumen de retención 15 ml, **6**: volumen de retención 16 ml, **7**: volumen de retención 17 ml; el recuadro rojo señala la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A que tiene un peso de 25.6 kDa.

Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 y del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

a. Complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2.

Las proteínas hG0S2 y hBcl-2 se volvieron a purificar por separado pero esta vez sin cortarlas con PPS, por lo que obtuvimos a las proteínas SUMO-hG0S2 y a hBcl-2 con la etiqueta 6XHis. El complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 se formó al mezclar ambas proteínas en una relación equimolar 1.3:1.0, el complejo se concentró por microfiltración en un concentrador vivaspin con una membrana de retención de 3 kDa hasta alcanzar una concentración final de 1.44 mg/ml. La muestra (1ml) se filtró en una membrana de 0.22 μm y se inyectó en el equipo FPLC AKTA con la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). El cromatograma obtenido (Figura 5) muestra que el complejo eluye en un volumen de retención de 12ml. Las fracciones del pico obtenido en el cromatograma se analizaron en un gel de poliacrilamida 17%. El gel muestra que podemos purificar el complejo ya que podemos observar que SUMO-G0S2 y Bcl-2 eluyen en el mismo pico.

Se realizaron corridas independientes para la purificación de SUMO-hG0S2, hBcl-2 y del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2. La figura 5 muestra cada uno de los cromatogramas obtenidos de la purificación por exclusión molecular donde el color naranja corresponde al pico de la proteína SUMO-hG0S2, el color azul corresponde la proteína hBcl-2 y el pico color verde corresponde al complejo formado de las purificaciones anteriores (Figura 5a). Las fracciones de los volúmenes de retención de cada una de las proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida 17% y podemos observar que la proteína SUMO-hG0S2 eluyó en el volumen de retención 15ml y 16ml con un peso de 25.6 kDa, la proteína hBcl-2 eluyó en el volumen de retención 11ml y 12ml con un peso de 46.6 kDa y el complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2 eluyó en un volumen de retención 12ml y 13ml con un peso de 48.9 kDa. Todos estos datos nos llevan a concluir que efectivamente existe una interacción fuerte entre las proteínas SUMO-hG0S2 y hBcl-2.

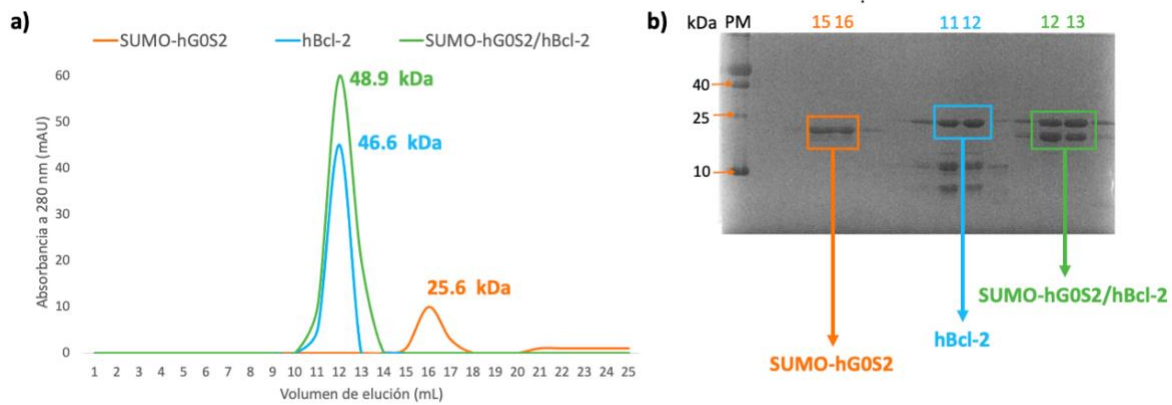


Figura 3. Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2.

a) Cromatograma de la purificación por separado de las proteínas SUMO-hG0S2 y Bcl-2, en color naranja logramos observar el pico correspondiente a la proteína SUMO-hG0S2, el pico en color azul corresponde a la proteína Bcl-2, mientras que el pico color verde corresponde al complejo formado de las purificaciones anteriores. **b)** Gel de poliacrilamida 17% de las fracciones obtenidas anteriormente, donde **PM**: marcador; **15 y 16**: pico de la proteína SUMO-hG0S2; **11 y 12**: pico de la proteína Bcl-2; **12 y 13**: pico del complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2.

b. Complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2.

El ensayo de la evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 se realizó para comprobar si efectivamente la proteína SUMO-hG0S2_R57A-D58A inhibía la interacción con hBcl-2. Las proteínas SUMO-hG0S2_R57A-D58A y hBcl-2 se volvieron a purificar por separado sin cortarlas con PPS. El complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 se formó al mezclar ambas proteínas en una relación equimolar 1.3:1.0, el complejo se concentró por microfiltración en un concentrador vivaspin con una membrana de retención de 3 kDa hasta alcanzar una concentración final de 2.03 mg/ml. La muestra (1ml) se filtró en una membrana de 0.22 μm y se inyectó en el equipo FPLC AKTA con la columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). El cromatograma obtenido (Figura 6) muestra que el complejo eluye en los volúmenes de retención de 8ml y 9ml. Las fracciones del pico obtenido en el cromatograma se analizaron en un gel de poliacrilamida 17%. El gel muestra que al purificar el complejo solo se marca la banda que corresponde para la proteína SUMO-hG0S2_R57A-D58A lo

que nos hace pensar que la interacción podría estar en algún otro aminoácido de la región C-terminal de la proteína ya que observamos un solo pico en el cromatograma.

La figura 6 muestra los cromatogramas obtenidos de la purificación por exclusión molecular donde el color morado corresponde al pico de la proteína SUMO-hG0S2_R57A-D58A, el color azul corresponde la proteína hBcl-2 y el pico color amarillo corresponde al complejo formado de las purificaciones anteriores (Figura 6a). Las fracciones de los volúmenes de retención de cada una de las proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida 17% y podemos observar que la proteína SUMO-hG0S2_R57A-D58A eluyó en el volumen de retención 16 ml con un peso de 25.6 kDa, el complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A /Bcl-2 eluyó en un volumen de retención 8 ml y 9 ml con un peso de 48.9 kDa. Para el caso de la proteína hBcl-2 observamos en el cromatograma que hay un pico en el volumen de retención de 11 ml y 12 ml que corresponde a esta proteína, pero al momento de correr el gel notamos que la proteína se había degradado lo que puede ser una explicación de siga habiendo algún tipo de interacción entre ambas proteínas. Se deben volver a purificar ambas proteínas y formar el complejo para poder evaluar esta interacción.

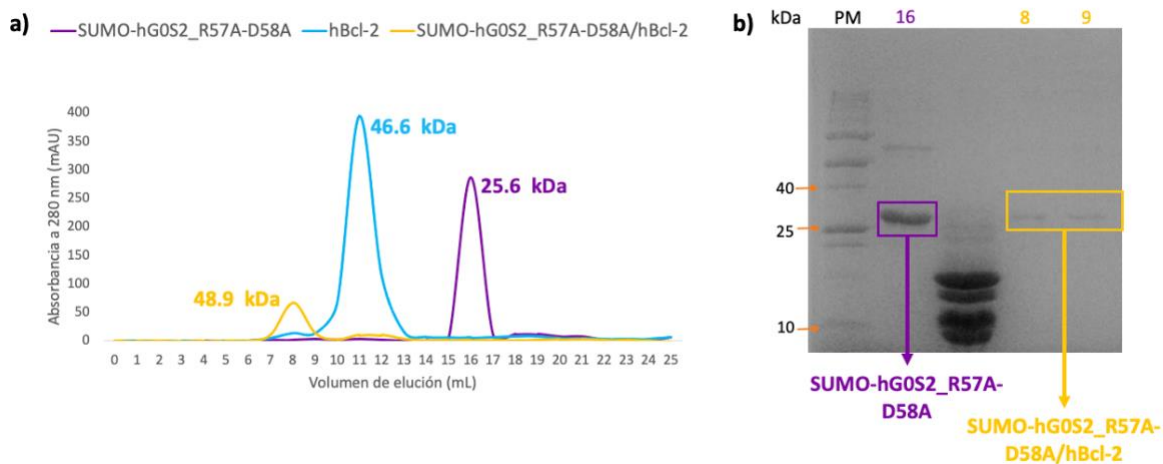


Figura 6. Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2.

a) Cromatograma de la purificación por separado de las proteínas SUMO-hG0S2_R57A-D58A y Bcl-2, en color morado logramos observar el pico

correspondiente a la proteína SUMO-hG0S2_R57A-D58A, el pico en color azul corresponde a la proteína Bcl-2, mientras que el pico color amarillo corresponde al complejo formado de las purificaciones anteriores. **b)** Gel de poliacrilamida 17% de las fracciones obtenidas anteriormente, donde **PM**: marcador; **16**: pico de la proteína SUMO-hG0S2_R57A-D58A; **8 y 9**: pico del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2.

Pruebas de cristalización del complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2.

Una proteína sólo permanece en solución hasta una determinada concentración, cuando se alcanza esta concentración límite, la solución deja de ser homogénea y aparece un nuevo estado o fase. Este fenómeno constituye la base de todos los experimentos de cristalización de proteínas. Al cambiar las condiciones de la solución, se intenta superar el límite de solubilidad de la proteína para producir cristales (Asherie 2004). Las fracciones del complejo formado anteriormente, se volvieron a concentrar en un concentrador vivaspin con una membrana de retención de 3kDa para después ultrafiltrar la muestra con una membrana AmiconUltra-0.5 (Millipore). Se logró alcanzar una concentración de 4.50 mg/ml del complejo en un volumen de 124 μ l, se montaron gotas 1:1 (0.9 μ l proteína y 0.9 μ l precipitante) usando la técnica de cristalización por difusión de vapor en gota sentada con placas de 98 pocillos. El volumen en el pozo del precipitante fue de 50 μ l y el volumen de la gota de cristalización fue de 2 μ l. Se exploraron 89 condiciones de cristalización del kit de cristalización Crystal Screen I y II de Hampton Research. La placa se selló e incubó a 16°C. El experimento de cristalización se monitoreó periódicamente en el microscopio estereoscópico y logramos observar que el 48% de las condiciones presentan un precipitado. Hasta la fecha no hemos obtenido ningún cristal por lo cual se deben de probar más condiciones y aumentar la concentración de 4.50 mg/ml del complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2 y volver a montar pruebas de cristalización.

Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS).

La DLS es una técnica usada para determinación de la distribución de tamaños de partículas o macromoléculas en suspensión (Foord et al. 1970). Cuando la luz

laser alcanza las partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones y se miden las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por las partículas presentes en el soluto. Estas fluctuaciones son el resultado de la dispersión coherente de las partículas en movimiento browniano. Este método se utiliza para evaluar la probabilidad de cristalización de proteínas, así como para detectar la formación de un complejo proteico (Proteau 2010). Se ha demostrado que la relación entre la monodispersidad de la solución proteica y la probabilidad de obtener cristales es una condición necesaria pero insuficiente para el éxito en la cristalización. Por lo tanto, aunque no se puede considerar que un buen comportamiento en DLS garantice el éxito de la cristalización, sí se debe tener en cuenta como herramienta para evaluar la cristalización y, lo que es más importante, como herramienta para mejorar el comportamiento de las proteínas en solución modificando las condiciones y examinando el efecto de diversos aditivos. (Niesen et al. 2008; Price et al. 2009; Proteau 2010).

Los ensayos de DLS se realizaron para comprobar que las proteínas purificadas fueran monodispersas y que se encontraran como monómero en el caso de las construcciones de SUMO-hG0S2 y la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A, como dímero en el caso de hBcl-2 y la presencia de un complejo 1:1 de SUMO-hG0S2/hBcl-2 y del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2. Puesto que estas características favorecen la cristalización. Estos ensayos se realizaron en el equipo Zetasizer APS (Malvern Instruments). Para cada proteína se tomaron 80 μ l de volumen final de reacción, y se corrieron por separado donde la proteína SUMO-hG0S2, la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A y los complejos SUMO-hG0S2/hBcl-2 y SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 tenían una concentración de 1 mg/ml mientras que hBcl-2 tenía una concentración final de 0.5 mg/ml, cada muestra se incubó en el amortiguador 20 mM Tris pH8, 300 mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT. El equipo fue programado para que realizara un correlograma con 12 lecturas por muestra cada 20 minutos durante dos horas a una temperatura de 25°C.

Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes (Figura 7): la proteína SUMO-hG0S2 tiene una masa monodispersa 22.77 ± 18.24 kDa (Figura 7a). El homodímero de la proteína Bcl-2 presenta una masa monodispersa de $45.6 \pm$

1.457 kDa (Figura 7b). La doble mutante presenta una masa monodispersa de 28.718 ± 3.60 kDa (Figura 7c). El complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 presenta una masa monodispersa con un peso molecular de 34.39 ± 1.045 kDa, el cual es muy cercano a la masa teórica (Figura 7d). El complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/hBcl-2 tiene un peso molecular 37.27 ± 1.096 kDa, pero presenta una masa polidispersa (Figura 7e).

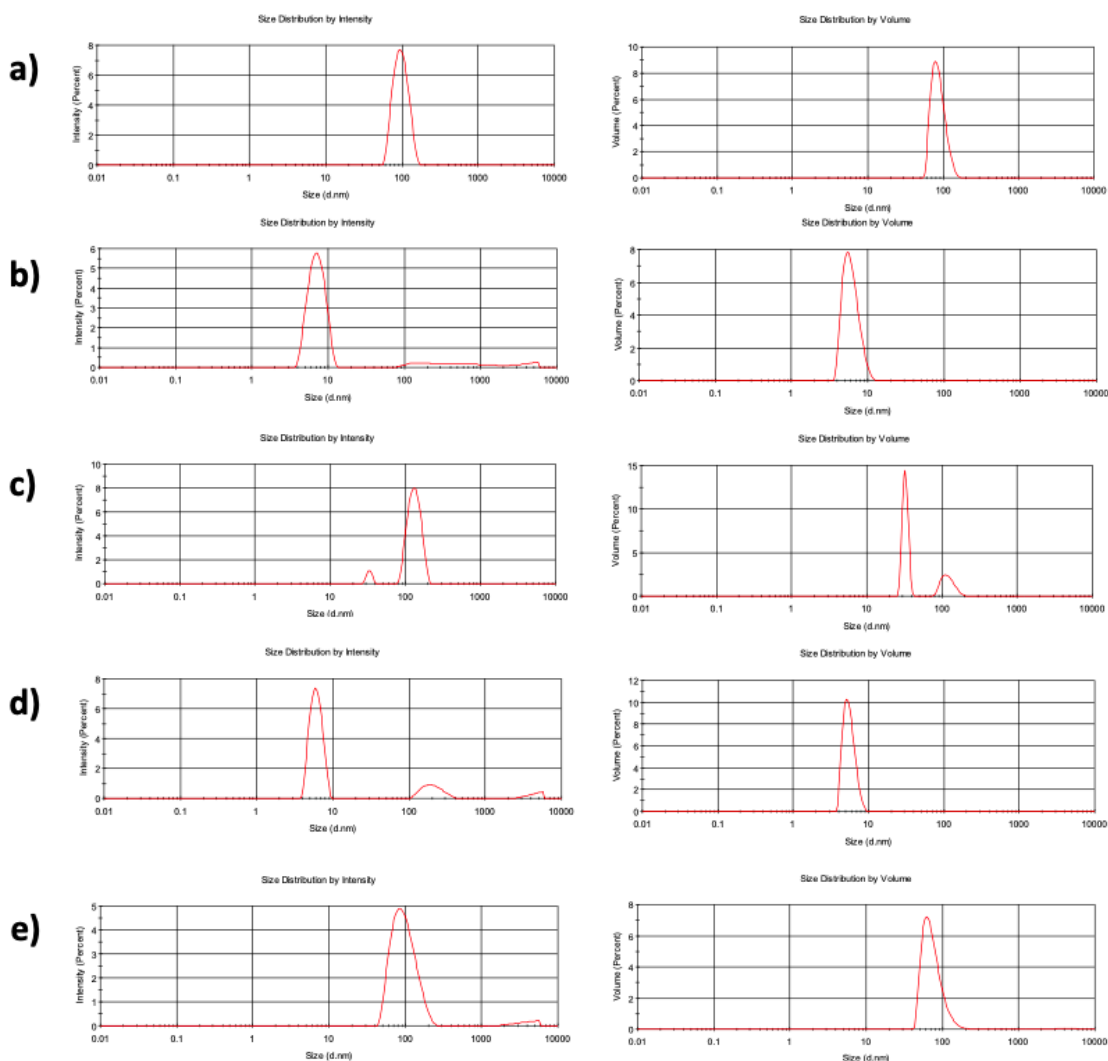


Figura 7. Experimentos de DLS de las proteínas SUMO-hG0S2, hBcl-2, la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A y de los complejos SUMO-hG0S2/hBcl-2, SUMO-hG0S2_R57A-D58A/hBcl-2.

El ensayo se realizó con el amortiguador 20 mM Tris pH8, 300 mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT; con una concentración final de SUMO-hG0S2 de 1mg/ml, 0.5mg/ml de hBcl-2, 1 mg/ml de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A y

para los complejos SUMO-hG0S2/hBcl-2 y SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 de 1mg/ml respectivamente. El eje de las abscisas representa el tamaño del diámetro de la partícula en nanómetros y el eje de las ordenadas representa el porcentaje de volumen de la partícula en la mezcla. A partir del tamaño de partícula se calcula el peso aproximado de la partícula (kDa). a) Histograma de la proteína SUMO-hG0S2 con un peso aproximado de 22.77 ± 18.24 kDa. b) Histograma de Bcl-2 con un peso aproximado de 45.6 ± 1.457 kDa. c) Histograma de la doble mutante SUMO-hG0S2_R57A-D58A con un peso aproximado de 48.718 ± 23.60 kDa. d) Histograma del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 con un peso aproximado de 34.39 ± 1.045 kDa. e) Histograma del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/Bcl-2 con un peso aproximado de 37.27 ± 1.096 kDa.

CONCLUSIÓN

Las proteínas hG0S2 y hBcl-2 fueron expresadas exitosamente y se optimizó la purificación de ambas donde se logró obtener un rendimiento 0.736 mg/ml y 2.4 mg/ml respectivamente de producción total de proteína en 1 L de cultivo. Por otro lado, se obtuvo la construcción de la proteína SUMO-hG0S2_R57A-D58A en el vector pET28PPS, se expresó y purificó exitosamente obteniendo un rendimiento de 0.508 mg/ml de producción total de proteína en 1L de cultivo. El complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 se puede purificar por exclusión molecular y eluye en un solo pico lo que indica que la interacción entre ambas proteínas es estable. Para el caso del complejo SUMO-hG0S2_R57A-D58A/hBcl-2 aun logramos ver que eluye en un solo pico por lo cual se deben ajustar los parámetros de formación del complejo y repetir los ensayos para comprobar que la interacción entre ambas proteínas se inhibe parcial o totalmente. Los experimentos de cristalización del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 a una concentración final de 4.5 mg/ml con 89 condiciones montadas, no han formado cristales, esto sugiere que hay que evaluar concentraciones superiores del complejo, así como expandir la matriz de condiciones de cristalización. Los resultados obtenidos mediante los ensayos de dispersión dinámica de luz confirman que las proteínas SUMO-hG0S2, hBcl-2, SUMO-hG0S2_R57A-D58A y el complejo SUMO-hG0S2/Bcl-2 son monodispersas, también se comprobó que las proteínas SUMO-hG0S2 y SUMO-hG0S2_R57A-D58A se comportan como monómero, mientras que Bcl-2 se comporta como dímero.

REFERENCIAS

- 1) Arnold F. H. (1991). Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9(2), 151–156. <https://doi.org/10.1038/nbt0291-151>
- 2) Asherie N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods (San Diego, Calif.)*, 34(3), 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.028>
- 3) Bertazza, L., & Mocellin, S. (2008). Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 2736–2743. <https://doi.org/10.2741/2881>
- 4) Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., & Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in enzymology*, 463, 439–473. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5)
- 5) Cerk, I. K., Wechselberger, L., & Oberer, M. (2018). Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview. *Current protein & peptide science*, 19(2), 221–233. <https://doi.org/10.2174/1389203718666170918160110>
- 6) Chaga G. S. (2001). Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 313–334. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(01)00206-8)
- 7) Cutler P. (2004). Size-exclusion chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 244, 239–252. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-x:239>
- 8) Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology*, 10(9), 369–377. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01803-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01803-1)
- 9) Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*, 43(W1), W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
- 10) Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., & Gélinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*, 25(51), 6800–6816. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209938>

- 11) Fletcher, J. I., & Huang, D. C. (2006). BH3-only proteins: orchestrating cell death. *Cell death and differentiation*, 13(8), 1268–1271. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401995>
- 12) Foord, R., Jakeman, E., Oliver, C. J., Pike, E. R., Blagrove, R. J., Wood, E., & Peacocke, A. R. (1970). Determination of diffusion coefficients of haemocyanin at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light. *Nature*, 227(5255), 242–245. <https://doi.org/10.1038/227242a0>
- 13) Habchi, J., Tompa, P., Longhi, S., & Uversky, V. N. (2014). Introducing protein intrinsic disorder. *Chemical reviews*, 114(13), 6561–6588. <https://doi.org/10.1021/cr400514h>
- 14) Hengartner M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–776. <https://doi.org/10.1038/35037710>
- 15) Jacobson, M. D., & Raff, M. C. (1995). Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*, 374(6525), 814–816. <https://doi.org/10.1038/374814a0>
- 16) Kostanski, L. K., Keller, D. M., & Hamielec, A. E. (2004). Size-exclusion chromatography—a review of calibration methodologies. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 58(2), 159–186. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.10.001>
- 17) Kroemer, G., Dallaporta, B., & Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual review of physiology*, 60, 619–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.619>
- 18) Labi, V., Grespi, F., Baumgartner, F., & Villunger, A. (2008). Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy?. *Cell death and differentiation*, 15(6), 977–987. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.37>
- 19) Letai A. G. (2008). Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature reviews. Cancer*, 8(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrc2297>
- 20) Li, D., Ueta, E., Kimura, T., Yamamoto, T., & Osaki, T. (2004). Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer science*, 95(8), 644–650. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03323.x>

- 21) Loro, L. L., Vintermyr, O. K., & Johannessen, A. C. (2003). Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 32(3), 125–138. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2003.00052.x>
- 22) Niesen, F. H., Koch, A., Lenski, U., Harttig, U., Roske, Y., Heinemann, U., & Hofmann, K. P. (2008). An approach to quality management in structural biology: biophysical selection of proteins for successful crystallization. *Journal of structural biology*, 162(3), 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.03.007>
- 23) 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(40), 25841–25847. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03171>
- 24) Piovesan, D., Walsh, I., Minervini, G., & Tosatto, S. C. E. (2017). FELLs: fast estimator of latent local structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(12), 1889–1891. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx085>
- 25) Price II, W., Chen, Y., Handelman, S. S.K., Neely, H., Manor, P., Karlin, R., Nair, R., Liu, J., Baran, M., Everett, J., Tong, S.N., Forouhar, F., Swaminathan, S.S., Acton, T., Xiao, R., Luft, J.R., Lauricella, A., DeTitta, G.T., Rost, B., Montelione, G.T., and Hunt, J.F. (2009). Understanding the physical properties that control protein crystallization by analysis of large-scale experimental data. *Nat Biotechnol* 27, 51–57. <https://doi.org/10.1038/nbt.1514>
- 26) Proteau, A., Shi, R., & Cygler, M. (2010). Application of dynamic light scattering in protein crystallization. *Current protocols in protein science, Chapter 17*, 17.10.1–17.10.9. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1710s61>
- 27) Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., & Strasser, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129(7), 1337–1349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>
- 28) 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 and cell biology*, 10(8), 581–591. <https://doi.org/10.1089/dna.1991.10.581>
- 29) Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., & Andrews, D. W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4), 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.024>
- 30) Teni, T., Pawar, S., Sanghvi, V., & Saranath, D. (2002). Expression of bcl-2 and bax in chewing tobacco-induced oral cancers and oral lesions from India. *Pathol. Oncol. Res.* 8, 109–114. <https://doi.org/10.1007/BF03033719>
- 31) Teunissen, B. E., Smeets, P. J., Willemsen, P. H., De Windt, L. J., Van der Vusse, G. J., & Van Bilsen, M. (2007). Activation of PPARdelta inhibits cardiac fibroblast proliferation and the transdifferentiation into myofibroblasts. *Cardiovascular research*, 75(3), 519–529. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.026>
- 32) Tokumaru, Y., Yamashita, K., Osada, M., Nomoto, S., Sun, D. I., Xiao, Y., Hoque, M. O., Westra, W. H., Califano, J. A., & Sidransky, D. (2004). Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. *Cancer Research*, 64(17), 5982-5987. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0993>
- 33) Ueda, E. K., Gout, P. W., & Morganti, L. (2003). Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of chromatography. A*, 988(1), 1–23. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)02057-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)02057-5)
- 34) Uversky V. N. (2002). What does it mean to be natively unfolded?. *European journal of biochemistry*, 269(1), 2–12. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02649.x>
- 35) 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 research*, 69(17), 6782–6789. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0128>
- 36) Wong, J.W., Albright, R.L., & Wang, N.L. (1991). Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) Chemistry and Bioseparation Applications. *Separation and Purification Methods*, 20, 49-106. <https://doi.org/10.1080/03602549108021408>

- 37) 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. *Leukemia research*, 38(2), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.10.006>
- 38) 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 metabolism*, 11(3), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.003>
- 39) Ying, S., Pettengill, M., Ojcius, D. M., & Häcker, G. (2007). Host-Cell Survival and Death During Chlamydia Infection. *Current immunology reviews*, 3(1), 31–40. <https://doi.org/10.2174/157339507779802179>

ANEXOS

Transformación de células competentes:

1. Descongelar las células competentes de -80°C en hielo.
2. Incubar en hielo durante 10 minutos.
3. Agregar $2\ \mu\text{l}$ de DNA purificado y agitar suavemente con la punta de la micropipeta.
4. Incubar en hielo 20 minutos.
5. Dar choque térmico a 42°C por 45 segundos.
6. Incubar en hielo 2 minutos.
7. Agregar $500\ \mu\text{l}$ de medio LB
8. Incubar a 37°C por 1 hora en agitación (190 rpm)
9. Centrifugar el tubo a 5000 o 6000 rpm por 5 minutos
10. Quitar $450\ \mu\text{l}$ y en los $100\ \mu\text{l}$ restantes resuspender el pellet.
11. Sembrar en cajas con Agar LB con kanamicina.
12. Incubar a 37°C por 16 horas.

Clonación del gBlock de SUMO-hG0S2_R57A-D58A con enzimas NEB:

NOTA: antes de abrir el gBlock, centrifugarlo con 1 spin y diluir con $50\ \mu\text{l}$ de TE.

Digestión y desfosforilación:

1. Descongelar el vector pET28PPS en hielo y agitar suavemente.

gBlock		[final]
H ₂ O	3	
rCutSmart 10X	2	1X
gblock (10 ng/ μl)	8	80 ng totales
<i>Nde</i> 20U/ μl	1	20 U
<i>Hind</i> III-HF 20U/ μl	1	20 U
V _t	15 ul	

pET28pps		[final]
H ₂ O	11.2	
rCutSmart 10X	2	1X
ADN (35.3 ng/ μL)	3.8	140 ng totales
<i>Nde</i> 20U/ μL	1	20 U
<i>Hind</i> III-HF 20U/ μL	1	20 U
AP 1U/ μL	1	1 U
V _t 1	20 ul	

Tenemos:

- 80 ng de gblock en $15\ \mu\text{l}$ ($5.3\ \text{ng}/\mu\text{l}$)
- 140 ng de pET28pps en $20\ \mu\text{l}$ ($7\ \text{ng}/\mu\text{l}$)

2. Centrifugar por 1 minutos a 5000 rpm antes de pipetear. Hacer cálculos para poner 140 ng/μl en 20 μl.
3. Incubar por 1 hora a 37°C en el termociclador.
4. Inactivar a 80°C por 20 minutos en el termociclador. Poner en hielo y continuar con la ligación o guardar en congelación
5. Ligación:
 - a. Calcular la concentración de inserto que se usara para ligar con la siguiente relación, donde la concentración recomendada de vector es de 50 ng, pero puede variar de 50-100 ng:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{pb inserto} \times \text{relación} \times \text{relación-molar inserto:vector}}{\text{kb vector}}$$

$$\text{ng inserto} = \frac{50\text{ng PET28} \times 710\text{pb} \times 3 \text{ (usar la relación 3:1)}}{5400 \text{ pb PET28}}$$

En este caso se redondeó a 20 ng de inserto y 50 ng de vector.

6. Preparar reacción de ligación. Marcar dos tubos de PCR como positivo y negativo y pipetear reactivos según la tabla, añadir la ligasa al último:

Reacción de ligación			
Reactivos	Positivo	Negativo (re-ligado)	[Final]
pET28pps AP/NdeI/HindIII [7 ng/ μl]	7.2 μl	7.2 μl	50 ng
gBlock NdeI/HindIII [5.3 ng/ μl]	3.8 μl	NA	20 ng
buffer T4 DNA ligasa	2 μl	2 μl	1X
H2O estéril	6 μl	9.8 μl	Vt= 20 μl
T4 DNA Ligase NEB	1.0 μl	1.0 μl	5 U
Agitar muy bien con pipeta			

7. Incubar 20 minutos a 25°C o toda la noche a 16°C.
8. Transformar 2 μl de cada muestra en células Top-10 y platear cada una en una placa separada y rotular usando los mismos nombres de la tabla: positivo (nombre construcción) y negativo (re-ligado). Evaluar los resultados una vez que crezcan las colonias.

9. Guardar los 4 tubos con la mezcla de reacción que no se transformó en congelador. Etiquetar con nombre, fecha, iniciales.

Amplificación de ADN por PCR de colonia

1. Preparar los tubos eppendorf necesarios para el numero de colonias con 40 μ l de agua estéril o TE.
 - Picar colonia y disolverla en los 40 μ l. Repetir con cada colonia en un tubo individual.
 - Si son muchas colonias, preparar muestras en pull de 3 colonias. Picar colonia y disolver en 40 μ l, picar otra colonia y disolver en el mismo tubo, picar otra colonia y disolver en el mismo tubo. Deben ser 3 colonias por tubo.
2. Incubar 10 minutos a 96°C en el termociclador.
3. Centrifugar el tubo a 10,000 rpm por 5 minutos.
4. Usar 2 μ l de cada tubo para la reacción de PCR.
5. Preparar la "master mix" para amplificación por PCR, volumen total de reacción de 20 μ l. Mezclar suavemente. Agregar al último la Taq polimerasa.

	1 tubo	X6	[final]
10X buffer with MgCl₂	2	12	1X
10 mM dNTP mix	0.4	2.4	200 μ M
Oligo Forward 10μM	1	6	0.5 μ M
Oligo Reverso 10μM	1	6	0.5 μ M
plásmido-DNA	-	-	ND
Taq pol 5U/μl	0.2	1.2	1 U
H₂O	13.4	80.4	
V_t	18	108	

6. Rotular los tubos de PCR y uno más para el control positivo (+).
7. Dispensar 18 μ l del "master mix" en cada tubo de PCR.
8. Agregar a cada tubo 2 μ L de cada muestra de las colonias a cada tubo correspondiente.

Para el tubo del control positivo poner 2 μ L del stock a 100 ng/ μ L de plásmido pET28_SUMO-PPS-G0S2 silvestre en TE guardado en congelador. (Preparar

un stock de 50 μl del plásmido pET28_SUMO-PPS-G0S2 silvestre o de pET28pps-Clp a una concentración final de 100 ng/ μl en TE, de este stock poner 2 μl al tubo del control positivo. El plásmido stock se guarda en congelación para su uso en reacciones posteriores, rotular correctamente y marcar la concentración.)

- Colocar los tubos PCR que contienen las muestras en el termociclador e iniciar la PCR con las siguientes condiciones:

Paso inicial	5 mins a 95°C
30 ciclos:	30 segundos a 95°C
	30 segundos a 55°C
	1 minuto a 72°C
Extensión	5 minutos a 72°C
final	∞ 16°C

- Mezclar 5 μl de cada reacción con 1 μl de buffer de carga y correr las muestras en un gel de agarosa 1% a 60-65 V.

Purificación de SUMO-hG0S2

Preparación de amortiguadores:

Amortiguador de lisis: 50mM Tris pH 8, 300mM NaCl y 10mM imidazol.

Amortiguador de exclusión molecular: 20mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT.

Lisis:

- Descongelar la biomasa en hielo.
- Resuspender la biomasa (de 1 L de cultivo) en 30 ml del amortiguador de lisis, trabajar en hielo.
- Lisar las células por sonicación:
Sonicar por 7:30 minutos con una amplitud del 50%, longitud del pulso: 15 segundos, longitud de la pausa: 45 segundos durante 30 ciclos. Trabajar en hielo.
- Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Separar el sobrenadante y desechar el pellet formado.
- Continuar con la purificación en la columna de afinidad a níquel.

Columna de afinidad a níquel:

1. Equilibrar la columna de afinidad a níquel con 10 CV del amortiguador de lisis.
2. Filtrar el sobrenadante con una membrana de 0.45 μm .
3. Cargar el lisado a la columna.
4. Recolectar lo no unido.
5. Lavar la columna con 10 CV del amortiguador de lisis con 10mM de imidazol.
6. Recolectar el frente.
7. Eluir con 3 CV del amortiguador de lisis con concentraciones crecientes de imidazol (50mM, 250mM y 500mM).
8. Analizar las fracciones recolectadas por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%.
9. Juntar las fracciones donde la proteína SUMO-hGOS2 eluye.

Digestión con PPS:

1. Juntar las fracciones anteriores donde eluyó la proteína e incubar con 5 unidades de PPS por ml de muestra a 4°C por 16 horas.
2. Concentrar por microfiltración en un concentrado de 3 kDa.

Columna de exclusión molecular (Superdex 75 10/300):

1. Equilibrar la columna Superdex 75 con 3 CV del amortiguador con un flujo de 0.8ml/min.
2. Inyectar 500 μl de la proteína para realizar la separación de proteínas con un flujo de 0.8ml/min en un volumen de elución de 1.5 CV. Hacer las inyecciones necesarias si el volumen de la muestra es mayor a 500 μl .
3. Recolectar las fracciones
4. Analizar las fracciones donde la proteína eluye por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 15%.

Purificación de hBcl-2:

Preparación de amortiguadores:

Amortiguador de lisis: 40mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 1mM DTT, 2.2mM KCl, Chaps 2%, glicerol 5% y 10mM imidazol.

Amortiguador de exclusión molecular: 20mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 0.5mM EDTA y 1mM DTT.

Lisis:

1. Descongelar la biomasa en hielo.
2. Resuspender la biomasa (de 1 L de cultivo) en 30 ml del amortiguador de lisis, trabajar en hielo.
3. Lisar las células por sonicación:
4. Sonicar por 7:30 minutos con una amplitud del 50%, longitud del pulso: 15 segundos, longitud de la pausa: 45 segundos durante 30 ciclos. Trabajar en hielo.
5. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
6. Separar el sobrenadante y desechar el pellet formado.
7. Continuar con la purificación en la columna de afinidad a níquel.

Columna de afinidad a níquel:

1. Equilibrar la columna de afinidad a níquel con 10 CV del amortiguador de lisis.
2. Filtrar el sobrenadante con una membrana de 0.45 μm .
3. Cargar el lisado a la columna.
4. Recolectar lo no unido.
5. Lavar la columna con 10 CV del amortiguador de lisis con 10mM de imidazol.
6. Recolectar el frente.
7. Eluir con 3 CV del amortiguador de lisis con concentraciones crecientes de imidazol (50mM, 250mM y 500mM).
8. Analizar las fracciones recolectadas por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 17%.
9. Juntar las fracciones donde la proteína hBcl-2 eluye.

Digestión con PPS:

1. Juntar las fracciones anteriores donde eluyó la proteína e incubar con 5 unidades de PPS por ml de muestra a 4°C por 16 horas.
2. Concentrar por microfiltración en un concentrado de 10 kDa.

Columna de exclusión molecular (Superdex 75 10/300):

1. Equilibrar la columna Superdex 75 con 3 CV del amortiguador con un flujo de 0.8ml/min.

2. Inyectar 500 μ l de la proteína para realizar la separación de proteínas con un flujo de 0.8ml/min en un volumen de elución de 1.5 CV. Hacer las inyecciones necesarias si el volumen de la muestra es mayor a 500 μ l.
3. Recolectar las fracciones
4. Analizar las fracciones donde la proteína eluye por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 17%.