



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

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

Tesis que presenta

Edgar Martínez García

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

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

San Luis Potosí, S.L.P., 01 de Septiembre de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Análisis funcional y estructural de la proteína Clp de *Xanthomonas campestris pv. campestris***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Edgar Martínez García** y aprobada el **nueve de diciembre del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Samuel Lara González
Director de la tesis

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de Registro 297723) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 138 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de diciembre del año 2015, se reunió a las 09:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Presidenta	IPICYT
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Secretario	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Edgar Martínez García

sobre la Tesis intitulada:

Análisis funcional y estructural de la proteína Clp de Xanthomonas campestris pv. campestris

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 10:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de diciembre de 2015.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

*A todos y todo lo que me ha permitido llegar aquí.
Esto solo es el principio.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

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

Al Dr. Samuel Lara González.

A mi comité tutorial, Dr. Braulio Gutiérrez Medina, Dr. J. Sergio Casas Flores.

A mis compañeros de Laboratorio.

A mis familiares.

A mí.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	2
Materiales y métodos	5
Materiales.....	5
Evaluación de la expresión y solubilidad de Clp.....	6
Purificación de Clp por cromatografía de afinidad a Níquel (IMAC)	6
Ensayo de estabilidad térmica	7
Dúplex de DNA para SEC-MSA.....	7
SEC-MSA del complejo Clp-DNA	8
Ensayos de cristalización.....	8
Clonación del cDNA de CAP en el vector de expresión pET28pps	9
Evaluación de la expresión, solubilidad y purificación de CAP	9
Resultados y discusión	10
Evaluación de la expresión y solubilidad de Clp.....	10
Purificación de Clp por cromatografía de afinidad a Níquel.....	10
Ensayo de estabilidad térmica	11
SEC-MSA del complejo Clp-DNA	14
Ensayos de cristalización.....	19
Clonación del cDNA de CAP en el vector de expresión pET28.....	20
Evaluación de la expresión, solubilidad y purificación de CAP	22
Conclusiones	22
Agradecimientos	24
Referencias	24

Lista de tablas

Tabla 1. Análisis de solubilidad por Thermofluor	15
--	----

Lista de figuras

Fig. 1. Expresión y purificación de Clp	12
Fig. 2. Análisis de estabilidad térmica por Thermofluor.....	13
Fig. 3. Ensayo de movilidad por filtración en gel (SEC-MSA)	17
Fig. 4. Movilidad electroforética del complejo Clp-DNA.....	18
Fig. 5. Construcción pET28pps_CAP	21
Fig. 6. Expresión y purificación de CAP	23

Abreviaturas

Xcc	Xanthomonas campestris pv. campestris
Clp	Crp-like protein
CAP	Catabolite Activator Protein
EPS	Exopolysaccharide
c-di-GMP	dinucleótido cíclico de Guanosina Monofosfato
IMAC	Immobilized Metal ion Affinity Chromatography
TCA	Tricarboxylic Acid
DSF	Small Difusible Signal Factor
rpf	Regulator pathogenicity factors
QS	Quórum Sensing
cNMP	Cyclic Nucleotide Monophosphate
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
cDNA	Coding Deoxyribunocleic Acid
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
SEC-MSA	Size Exclusion Chromatography - Movility Shift Assay
AFM	Atomic Force Microscopy
PMSF	Phenylmethyl fluoride

Resumen

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

Clp (Crp-like protein) es el factor de transcripción global de la virulencia en la bacteria Gram negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, fitopatógeno de una gran relevancia económica. A pesar de pertenecer a la superfamilia de factores de transcripción de CAP, Clp es único en su clase al no requerir de un modulador alostérico para ser capaz de unirse al DNA. De hecho, su ligando el c-di-GMP actúa como inhibidor al producir cambios alostéricos en la estructura terciaria de Clp. Estas características y la poca homología a nivel de secuencia y estructura con otros efectores de c-di-GMP hacen de Clp un factor de transcripción único. Nuestro objetivo es resolver la estructura tridimensional del complejo Clp-DNA. Como parte de nuestro diseño experimental, expresamos Clp en la cepa BL21 (DE3) Star de *Escherichia coli* utilizando el vector pET28pps. La inducción se realizó con 0.2 mM de IPTG a 37 °C por 8 horas tras un choque frío de 2 horas a 4 °C. La purificación por cromatografía de afinidad a níquel en un amortiguador optimizado con 250 mM de NaCl, 100 mM de LiCl y 20 mM de Tris a pH 8.0 presentó un rendimiento de purificación de 3mg/L. Por análisis de Thermofluor se observó que el NaCl y el LiCl aumentaron la estabilidad térmica de Clp. El ensayo de movilidad por cromatografía de exclusión molecular mostró que el tiempo de retención disminuye para el complejo Clp-DNA (12.18 min = 242391 Da) con respecto al DNA por sí solo (19.10 min = 11329 Da). Las primeras pruebas de cristalización del complejo Clp-DNA mostraron una proporción de 23.2% de precipitados. De forma paralela se logró la subclonación de CAP en el vector pET28pps, la expresión y purificación arrojó un rendimiento de 24 mg/L. Esto servirá para un análisis comparativo de la interacción con el DNA de Clp y CAP por microscopía de fuerza atómica.

PALABRAS CLAVE: Clp, CAP, análisis estructural, complejo proteína-DNA, interacción proteína-DNA, factores de transcripción, c-di-GMP.

Abstract

Structural and functional analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Clp protein

Crp-like protein (Clp) is the virulence global transcription factor of the Gram negative bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, phytopathogen of great economic relevance. Even though it belongs to the CAP transcription factors superfamily, Clp is unique because it does not require an allosteric modulator for the binding to DNA. In fact, its ligand, c-di-GMP acts in an inhibitory way by triggering allosteric changes on Clp tertiary structure. These characteristics and the low structure and sequence homology with others c-di-GMP effectors make of Clp a unique transcription factor. Our main goal was to obtain the Clp-DNA tertiary structure. Experimental design consist in Clp expression on the pET28pps vector using *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star cells. Expression was induced with IPTG 0.2 mM, 8h at 37 °C after a thermal shock of 2 h at 4 °C. Immobilized metal ion affinity chromatography purification on a NaCl 250 mM, LiCl 100 mM and Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 buffer showed a 3 mg/L performance. NaCl and LiCl increased Clp thermal stability as observed by Thermofluor. Size-exclusion chromatography movility shift assay (SEC-MSA) showed that the retention of the Clp-DNA complex decreased (12.18 min = 242391 Da) in accordance to the DNA by its own (19.10 min = 11329 Da). The first crystallization trials for the Clp-DNA complex showed a 23.2% precipitates proportion. CAP transcription factor was also cloned in the pET28pps vector, protein expression and purification were achieved with a 24 mg/L performance. The protein-DNA interaction of both Clp and CAP with DNA will be analyzed and compared by means of atomic force microscopy.

KEY WORDS. Clp, CAP, structural analysis, protein-DNA complex, proteinDNA interaction, transcription factor, c-di-GMP.

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

Martínez-García E¹, Lara-González S^{1*}.

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

PALABRAS CLAVE: Clp, CAP, análisis estructural, complejo proteína-DNA, interacción proteína-DNA, factores de transcripción, c-di-GMP.

*Autor para correspondencia.

Introducción

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc) es una bacteria Gram negativa, causante de la podredumbre negra en las crucíferas la cual causa pérdidas económicas significativas (Boulanger et al., 2014; Ge and He, 2008). El patógeno es capaz de producir grandes cantidades de un exopolisacárido (EPS), la goma xantana, y de secretar diversas enzimas extracelulares incluyendo proteasas, pectinasas y endoglucanasas (Akimoto-Tomiya et al., 2014; Ge and He, 2008). Estos productos extracelulares han sido considerados factores de virulencia importantes de Xcc durante mucho tiempo.

La mutación en el gen *clp* (del inglés, Crp-like protein), el cual codifica para el factor de transcripción Clp afecta de manera significativa la virulencia de Xcc (Akimoto-Tomiya et al., 2014; Boulanger et al., 2014; Ge and He, 2008). La delección de *clp* ocasiona una disminución del 82% en la producción de EPS y decrementos de 65% y 82% en las actividades de celulasa y proteasa respectivamente (Hsiao et al., 2005). En Xcc se han identificado 299 genes regulados por Clp, 39 de forma negativa y 260 positivamente. Estos genes se agrupan en trece categorías: enzimas extracelulares, síntesis de EPS, multiresistencia a fármacos y desintoxicación, síntesis flagelar y motilidad, reacciones hipersensibles y sistema de patogenicidad, captación de hierro, metabolismo de aminoácidos y proteínas, ciclo del TCA, respiración aerobia y anaerobia, reguladores transcripcionales, componentes y transportadores de membrana, metabolismo de ácidos grasos y proteínas hipotéticas (He et al., 2007).

La virulencia en Xcc es coordinada a través del DSF (del inglés, small diffusible signal factor) que ha sido caracterizado como ácido *cis*-11-metil-2 dodecanoico (de Rossi et al., 2014). El DSF modula un espectro de funciones biológicas que incluyen la dispersión de la biopelícula, la resistencia a toxinas y la supervivencia bacteriana (Guo et al., 2012). Por análisis de microarreglos se han identificado cuando menos 165 genes cuya expresión es regulada de manera significativa por señales de DSF (He et al., 2007). La delección de cualquier gen involucrado en la

generación o detección de DSF produce una reducción de 1.5 a 1.8 veces en la tasa de transcripción de *clp* (Ge and He, 2008; Hsiao et al., 2005).

La señalización por DSF es mediada por el mecanismo de QS (del inglés, quorum sensing) y por estrés por hipoxia mediante el sistema de dos componentes RavS/RavR (Tao et al., 2010). El mecanismo de QS en *Xcc* es capaz de sincronizar la expresión de los genes de virulencia cuando la densidad celular bacteriana alcanza cierto umbral (Zhang, 2010). El mecanismo comprende el DSF y los productos de varios genes *rpf* (del inglés, regulation pathogenicity factors). El gen *rpfF* codifica una enoil-CoA hidratasa que participa en la síntesis de DSF, mientras que los productos de *rpfC* y *rpfG* constituyen un sistema regulatorio de dos componentes (He et al., 2007). RpfC es una cinasa que detecta el DSF y fosforila a RpfG. RpfG activado es una fosfodiesterasa del dinucleótido cíclico de guanosina monofosfato (c-di-GMP, por sus siglas en inglés), que al ser degradado produce GMP (Rott et al., 2013).

La molécula c-di-GMP ha emergido recientemente como un segundo mensajero ampliamente conservado e implicado en la regulación de diversas funciones biológicas en las bacterias (Gomelsky and Galperin, 2013). Entre las funciones reguladas por c-di-GMP se encuentran: la biosíntesis de celulosa, la motilidad bacteriana, la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia extracelulares (Boulanger et al., 2014; Leduc and Roberts, 2009; Zhang, 2010). La identificación de Clp como un regulador sensible a c-di-GMP ha añadido un nuevo miembro a la familia en expansión de efectores de c-di-GMP (Lu et al., 2012). Entre los que se encuentran PilZ, PleD, PeiD, LapD y FleQ (Zhang, 2010). Clp interactúa con el c-di-GMP con gran afinidad ($K_d = 0.161 \mu\text{M}$), lo cual induce cambios conformacionales alostéricos importantes en Clp que inhiben su unión al DNA (Gomelsky, 2009; Hsiao et al., 2008; Leduc and Roberts, 2009). El aumento de la concentración intracelular de c-di-GMP regula negativamente la expresión de los genes de virulencia y atenúa la virulencia bacteriana (Tao et al., 2010).

Clp pertenece a la familia de factores de transcripción Crp/Fnr, los cuales poseen un dominio de unión a DNA y un dominio de unión a nucleótidos monofosfato cíclicos (cNMP, por sus siglas en inglés). Tal como se observa en los receptores

de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés) CAP (del inglés, Catabolite Activator Protein) de *Escherichia coli* y Vfr (del inglés, virulence factor regulator) de *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales han sido ampliamente caracterizados (Dong and Ebright, 1992). Las proteínas de la familia de Crp tienen cuando menos dos funciones distintas: 1) son receptores de cAMP y 2) son efectores de c-di-GMP. Los receptores de cAMP comparten a la serina (S) como residuo conservado en la posición 88 (de acuerdo con CAP), mientras que los receptores de c-di-GMP comparten el ácido glutámico (E) como residuo conservado en la posición 99 (de acuerdo a Clp) (Tao et al., 2010). El reemplazo del aminoácido E99 con S en Clp lo priva por completo de su habilidad de unirse a c-di-GMP *in vitro*, resultando en una pérdida de sensibilidad a la inhibición por c-di-GMP bajo condiciones *in vivo* (Zhang, 2010).

La comparación de CAP y Clp muestra que todos los residuos de aminoácidos involucrados en las interacciones de unión al DNA están conservados. La estructura primaria de los aminoácidos 26 a 230 de Clp es homóloga a la estructura primaria de CAP: 45% de aminoácidos idénticos y 73% de aminoácidos idénticos o sustituidos conservativamente (He et al., 2007). El motivo hélice-vuelta-hélice del dominio de unión al DNA de CAP se encuentra conservado en Clp. Por ello, es probable que la estructura tridimensional global del complejo Clp-DNA sea extremadamente similar a la estructura tridimensional del complejo CAP-DNA (Chin et al., 2010). De hecho, Clp reconoce el mismo sitio de unión al DNA conservado que CAP (TGTTGA-N6-TCACA) y puede sustituir a CAP en la activación de la transcripción en el promotor *lac* de *Escherichia coli in vivo* (de Crecy-Lagard et al., 1990; Dong and Ebright, 1992). Ya que no se han detectado genes que codifiquen para la adenilato ciclasa o CAP en los genomas de *Xanthomonas* spp., el par c-di-GMP/Clp en lugar del par cAMP/CAP debe jugar el papel principal en la regulación de la expresión génica en este organismo (Chen et al., 2010).

Clp es un caso único en la superfamilia Crp/Fnr, ya que está adaptado intrínsecamente para unirse a DNA sin la necesidad de ningún ligando (Gomelsky, 2009). Clp adopta una estructura dimérica similar a los otros miembros en la

familia Crp/Fnr. Cada subunidad comprende un dominio de barril beta en el N-terminal (residuos 21-127) y un dominio de unión a DNA en el C-terminal (residuos 158-230) unidos por una interfaz de dimerización (residuos 128-157) consistente en una larga hélice alfa (Chin et al., 2010). Dado que la identidad de secuencia es relativamente alta, se utilizó CAP en su conformación activa con cAMP para resolver la estructura de Clp por reemplazo molecular. A pesar de que las estructuras son similares, los residuos K173 (lisina 173), E174, E176, el residuo de arginina (R) terminal y los primeros 21 residuos del N-terminal no se ajustaron en el refinamiento (Chin et al., 2010). Por análisis *in silico* de la interacción entre Clp y el c-di-GMP (docking), se identificó el posible sitio de unión al segundo mensajero en el extremo N-terminal. Sin embargo, esto necesita ser corroborado experimentalmente mediante análisis estructurales del complejo Clp-c-di-GMP. Nuestro objetivo es obtener la estructura tridimensional del complejo Clp-DNA por medio de cristalización de proteínas y difracción de rayos X. Para ello se evaluó la expresión, purificación y solubilidad de la construcción pET28pps_Clp. La caracterización funcional de la proteína recombinante se realizó analizando la interacción con DNA por SEC-MSA. Esta caracterización funcional servirá para análisis comparativos de Clp con otros factores de transcripción de la familia Crp/Fnr.

Materiales y métodos

Materiales

La Taq DNA Polimerasa, las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa fueron compradas a New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). Las células competentes BL21 Star (DE3) son de Stratagene (La Jolla, CA, USA), los antibióticos, el inhibidor de proteasas PMSF (del inglés, phenylmethyl fluoride) y detergentes son de Gold Biotechnology Inc (St. Louis, MO, USA). Las sales utilizadas para Thermofluor son de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La construcción pET28pps_Clp fue proporcionada por el Instituto de Biotecnología, UNAM.

Evaluación de la expresión y solubilidad de Clp

Se observó la expresión de Clp en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star y GroEL/GroES. Se expresó la proteína a diferentes tiempos de inducción (4, 6, 8 y 16 horas) y temperaturas de incubación (18, 28 y 37 °C) con diferentes concentraciones de IPTG (0.2, 0.5 y 1.0 mM). El protocolo de expresión seleccionado comienza por hacer un preinoculo de 40 ml en medio LB líquido con Kanamicina a partir de gliceroles de células BL21 (DE3) Star transformadas con la construcción pET28pps_Clp. El pre-inoculo se incubó a 37 °C por 12 h a 190 rpm (revoluciones por minuto) y se utilizó para inocular medio LB fresco (dilución 1:25), el cual se incubó hasta alcanzar una Densidad Óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0.6-0.8. Una vez alcanzada la densidad óptica se aplicó un choque térmico y se incubó por 2 h a 4 °C. Después se indujo la producción de proteína con 0.2 mM de IPTG (del inglés, Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside) y se incubó a 37 °C durante 4 h a 190 rpm. Para evaluar la expresión se tomaron alícuotas de 1 ml antes y después de la inducción, y se evaluó en geles de acrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12%. El cultivo celular se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Las células se resuspendieron en 50 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 250 mM, LiCl 100 mM, Imidazol 5 mM, PMSF 1 mM, pH 8.0) y las bacterias se lisaron por sonicación (15 ciclos 20s ON/30s OFF a 45% amp). La solubilidad se evaluó por centrifugación del lisado celular a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. Las fracciones del sobrenadante y del pellet fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 12%. Las muestras para electroforesis fueron mezcladas con amortiguador de carga (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 23%, mercaptoetanol 0.64 M y azul de bromofenol 0.022%), se calentaron a 95 °C por 9 min y se corrieron en geles SDS-PAGE al 12%, los cuales se tiñeron con coomassie R-250.

Purificación de Clp por cromatografía de afinidad a Níquel (IMAC)

Para purificar Clp el sobrenadante del extracto celular obtenido por sonicación se transfirió a la columna de agarosa Ni-NTA de Qiagen equilibrada previamente con

5 volúmenes de columna de amortiguador (20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 100 mM LiCl, pH 8.0). La elución se realizó con un gradiente escalonado de concentraciones de imidazol de 30, 300 y 500 mM en el amortiguador de unión. Las fracciones eluidas fueron colectadas, se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Ernst and Zor, 2010), y se verificaron por SDS-PAGE al 12%. Esta etapa también se realizó en presencia de los detergentes Octil glucósido y CHAPS a una concentración de 1% en el amortiguador de lisis. Las fracciones donde eluyó la proteína recombinante fueron concentradas por microfiltración y desaladas por filtración en gel con una columna PD-10 (GE HealthCare) para el análisis de estabilidad térmica, o mezcladas equimolarmente con DNA para inyectarlas a filtración en gel o realizar un análisis de dispersión dinámica de luz (DLS).

Ensayo de estabilidad térmica

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron mediante fluorimetría diferencial de barrido (Thermofluor). El experimento se realizó en una placa de PCR de 96 pozos y se utilizó una máquina de RT-PCR 7500 Fast (Applied Biosystems). Se utilizó una concentración de proteína de 0.05 mg/ml en un volumen final de 40 μ L de amortiguador Tris 20 mM, pH 8.0. A estas condiciones iniciales se añadió el fluoróforo Sypro Orange a una concentración 5x para observar el cambio en la temperatura media de desnaturalización (T_m). El control del tiempo/temperatura de la máquina de PCR fue programado en 70 ciclos, con un incremento de 1 °C en un rango de 25 a 95 °C y 30 s de incubación por ciclo. La fluorescencia emitida fue capturada en cada ciclo y fue graficada en la hoja de cálculo de Excel (Microsoft® Office:Mac 2011). El valor de T_m se obtuvo por regresión no lineal utilizando la ecuación de Boltzmann en las secciones sigmoideas de los espectros de fluorescencia con el complemento Solver de Excel (Fogolari et al., 2002).

Dúplex de DNA para SEC-MSA

El dúplex de DNA de 38 pb (pares de bases) se realizó utilizando la secuencia consenso para el dominio de unión a DNA de CAP. Se cuenta con dos secuencias

de DNA (Integrated DNA Technologies), 17-mer (5' ATTTTCGAAAATTGTGAT) y 19-mer (5' CTAGATCACAATTTTCGAAAT), las cuales se ensamblan formando un palíndromo. El alineamiento de las secuencias se realiza en un termociclador utilizando una rampa de disminución de temperatura de 0.1 °C/s. La temperatura inicial de 95 °C se reduce a 20 °C y el protocolo se realiza por duplicado.

SEC-MSA del complejo Clp-DNA

El ensayo de movilidad se realizó mezclando una concentración equimolar de Clp y DNA (4 µM) que fue incubada a 4 °C toda la noche. El complejo Clp-DNA o bien únicamente el DNA (4 µM) se filtró utilizando una membrana de 0.2 µm de poro (Sartorius Stedim Biotech) y se inyectó en el equipo AKTA purifier (GE HealthCare) y se hace pasar a través de una columna Superdex 75 a un flujo de 0.8 ml/min y con seguimiento a 260 nm. Se comparó el tiempo de retención por filtración en gel y la movilidad electroforética de la mezcla Clp-DNA con respecto a la misma concentración de DNA sin proteína. Las fracciones en las que eluyó la muestra son concentradas hasta desecación utilizando el equipo Vacufuge plus (Eppendorf) y se resuspendieron en 50 µl de amortiguador. La movilidad electroforética se evaluó en geles de agarosa al 1%. Los pesos moleculares se obtuvieron a partir de una curva de calibración utilizando a las proteínas tiroglobulina (670000 Da), gamma globulina (158000 Da), ovoalbúmina (44000 Da), mioglobulina (17000 Da) y cobalamina (1350 Da).

Ensayos de cristalización

La proteína purificada por IMAC fue mezclada con una concentración equimolar de DNA e incubada 12 h a 4 °C. La muestra fue concentrada en un amicon Ultra-15 con membrana de retención de 10 kDa (Millipore). Se montaron los ensayos de cristalización mediante el método de difusión de vapor en gota sentada utilizando una concentración del complejo Clp-DNA de 5 mg/ml. Se utilizaron los kits Crystal Screen y Crystal Screen 2 (Hampton Research). En la placa se colocó 1 µl de precipitante y 1 µl de proteína en la gota y 150 µl de precipitante en el pozo. Con

una proporción de proteína y precipitante 1:1 se probaron 96 condiciones diferentes de cristalización por duplicado. También se probaron 24 condiciones con una proporción de proteína:precipitante 2:1. Las cajas se revisaron cada quince días durante dos meses antes de almacenarlas a 4 °C.

Clonación del cDNA de CAP en el vector de expresión pET28pps

La secuencia de cDNA de CAP fue sintetizada por la empresa Integrated DNA Technologies. El vector de expresión que se seleccionó para subclonar y expresar al gen de CAP es un pET28 modificado en el que el sitio de corte corresponde a la proteasa Prescission (pET28pps). CAP_wt_gBlock fue amplificado con los oligonucleótidos Forward 5' GGGAATTCCATATGGTGCTTGGCC y Reverse 5' CGCGGATCCAAGCTTTTAACGAGTG. El producto de amplificación fue purificado, digerido con las enzimas *Hind* III y *Nde* I y subclonado en el vector pET28 usando la ligasa DNA T4, obteniendo la construcción pET28pps_CAP. La construcción fue secuenciada con el método de dideoxinucleótidos marcados en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA). Se utilizaron los oligonucleótidos del promotor y el terminador T7.

Evaluación de la expresión, solubilidad y purificación de CAP

La cepa BL21 (DE3) Star fue transformada con la construcción pET28/CAP por choque térmico y sembrada en medio LB con Kanamicina (50 µg/ml). Se seleccionaron colonias individuales para crecer un pre-inoculo de 40 ml en medio LB líquido con Kanamicina que se incubó a 37 °C por 12 h a 190 rpm. Se realizaron glicerolos para expresión mezclando 800 µl de pre-inoculo con 200 µl de glicerol al 80%, los glicerolos se almacenan a -70 °C. El preinoculo se utilizó para hacer glicerolos. Dado que ya se disponía de protocolos óptimos para la expresión, solubilidad y purificación de Clp, se decidió partir de ellos modificándolos un poco para CAP. La expresión se realizó por 4h a 37 °C con una inducción con 0.2 mM de IPTG. El amortiguador de lisis y las condiciones de

purificación fueron los mismos. La proteína se incubó a -20 °C para su uso posterior.

Resultados y discusión

Evaluación de la expresión y solubilidad de Clp

Para obtener proteína pura para ensayos funcionales y estructurales, de las diferentes condiciones utilizadas el protocolo de expresión seleccionado se realizó en la cepa BL21 Star de *E. coli* con 0.2 mM de IPTG a 37 °C por 8 horas tras un choque frío de 2 horas a 4 °C. La disminución de la cantidad de IPTG utilizado no afectó la cantidad de proteína obtenida, a diferencia de la variación en el tiempo de incubación. Esto podría ser debido a que la proteína no es fácil de expresar para *E. coli*, ya sea debido a que el gen *clp* presenta codones poco frecuentes o porque la proteína es tóxica para la bacteria (Francis y Page, 2010). De esta manera se realizó un análisis *in silico* en el servidor RaCC (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>), para determinar la presencia de codones poco frecuentes para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La proteína presenta cinco codones poco frecuentes en el gen que codifica para 260 aminoácidos. Sin embargo, la presencia de codones poco frecuentes sólo es determinante cuando se presentan en gran número y de forma consecutiva (Kim et al., 2011), por lo que concluimos que el gen que codifica para Clp no tiene problemas para su expresión recombinante en *E. coli*.

Purificación de Clp por cromatografía de afinidad a Níquel

El rendimiento de la purificación obtenido con el amortiguador de 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 fue de 0.5 mg/l. Esta cantidad no es idónea para ensayos de cristalización ya que no se encuentra en las condiciones sobresaturadas de proteína necesarias para favorecer la formación de cristales (Asherie, 2004; Kim et al., 2011). Dada la necesidad de aumentar la cantidad de proteína se optó por abordar el problema de dos formas distintas. En primer lugar, tratamos de encontrar el amortiguador en el cuál la proteína fuera lo más soluble posible. Para ello se realizó un análisis de

Thermofluor, ya que la fluorimetría de barrido permite mejorar las probabilidades de cristalización encontrando el amortiguador idóneo (Phillips y de la Peña, 2011). En segundo lugar, tratamos de aumentar la cantidad de proteína soluble adicionando detergentes en el proceso de purificación, ya que se ha demostrado que los detergentes pueden tener un papel importante en la solubilidad, purificación y cristalización de las proteínas (Tulumello and Deber, 2012). Los detergentes utilizados comprenden CHAPS (3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano) y octil-glucósido, ya que se encuentran entre los detergentes más utilizados en los amortiguadores para la obtención de cristales (Nazari et al., 2012; Ramya et al., 2011). La purificación con un amortiguador optimizado aumentó el rendimiento de purificación a 3 mg/l. (Figura 1). La purificación en presencia de CHAPS arrojó un rendimiento ligeramente mayor de 3.5 mg/l. Sin embargo, la pureza de la muestra después de la purificación por IMAC fue menor, ya que el detergente solubilizaba otras proteínas adicionales a Clp (datos no mostrados).

Ensayo de estabilidad térmica

A fin de optimizar el amortiguador de lisis se realizó el ensayo de Thermofluor, el cual consiste en aumentar gradualmente la temperatura a una solución que contiene nuestra proteína en presencia de un agente fluorescente. El aumento de temperatura producirá el eventual desplegamiento de la estructura terciaria de la proteína, con lo cual quedaran expuestas zonas hidrófobas con las que interactuará el agente fluorescente produciendo un aumento de la señal captada. El punto crucial del experimento consiste en ver el efecto de diversos compuestos sobre la temperatura media de desnaturalización de la proteína (Boivin et al., 2013; Reinhard et al., 2013) (Figura 2). Se utilizó el fluoróforo Sypro Orange ya que tiene una longitud de onda de excitación próxima a 500 nm y una longitud de onda de emisión de 600 nm, lo que permite realizar el experimento en un equipo de PCR tiempo real. Esta característica lo hace más práctico para el análisis que el altamente utilizado ANS (ácido 8-anilino-naftaleno sulfónico), cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son 350 y 492 nm respectivamente (Hawe et al., 2008; Niesen et al., 2007).

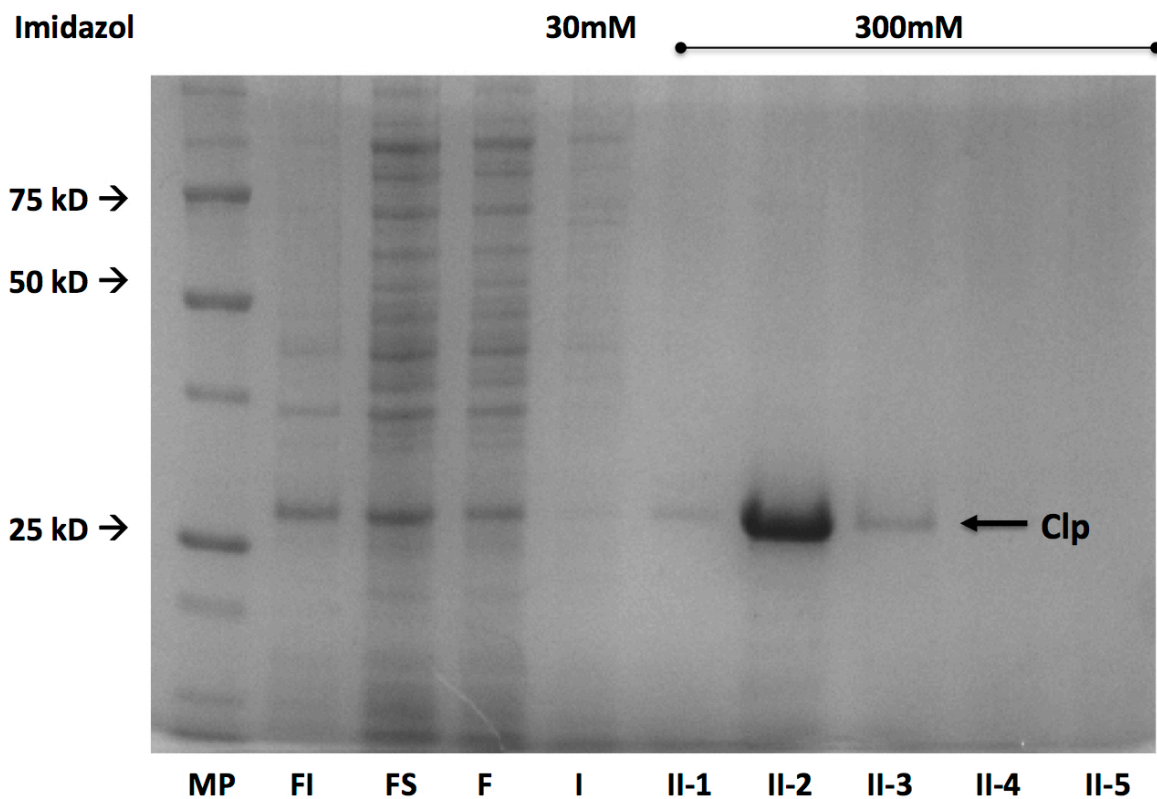


Fig. 1. Expresión y purificación de Clp

SDS-PAGE de la expresión de Clp en la cepa BL21 (DE3) Star de *E. coli*. La muestra se sonicó en el amortiguador optimizado (20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 100 mM LiCl, pH 8.0). La purificación se realizó por IMAC con dos eluciones de diferente concentración de imidazol. Con una flecha se señala la ubicación de la proteína en el gel. Marcador de peso molecular (MP), fracción insoluble (FI), fracción soluble (FS), frente (F), primera elución con 30 mM de imidazol (I), fracciones de la segunda elución con 300 mM de imidazol (II-n).

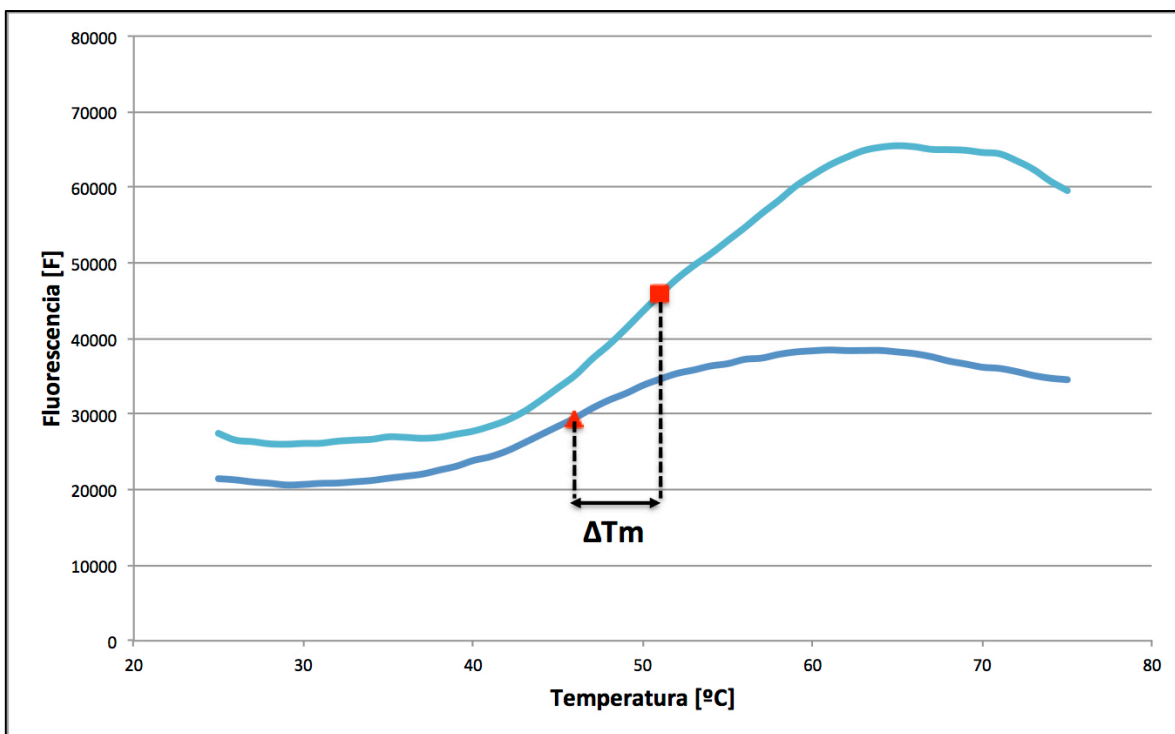


Fig. 2. Análisis de estabilidad térmica por Thermofluor

Ejemplo de las curvas de fluorescencia obtenidas del análisis de Thermofluor. Se muestran las curvas para Clp en las condiciones iniciales, Tris 20 mM pH 8.0 (en color azul), y para Clp con MOPS 50 mM pH 7.5 (en color verde). En color rojo se observan las T_m de cada curva obtenidas por medio de la ecuación de Boltzmann. También se muestra el diferencial de T_m (5.3 °C).

Los compuestos probados se decidieron en base a trabajos previos de otros grupos de investigación (Chin et al., 2010; de Crecy-Lagard et al., 1990; Hsiao et al., 2005; Lu et al., 2012). Se incluyeron polioles, glicerol y metales, compuestos capaces de estabilizar a las proteínas (Niesen et al., 2007; Sousa, 1995). La T_m de Clp en el amortiguador de Tris 20 mM pH 8.0 es 46.0 °C. La T_m se vio aumentada por diversos compuestos, siendo los más significativos NaCl (100 mM), Glicina (10 mM), Glicerol (2%) y Tween (10%), los cuales aumentaron la T_m a 60.0 °C. (Tabla 1).

Dado que una concentración mínima de 100 mM de NaCl es necesaria para aumentar la solubilidad de Clp, la purificación se realizó en presencia constante de sal. El LiCl se añadió al amortiguador en referencia a trabajos de otros grupos de investigación (Chin et al., 2010; Hsiao et al., 2005). La estabilidad conferida por el NaCl y el LiCl es tal, que si desalamos durante el proceso de purificación no es posible concentrar la proteína. Por ello, a pesar que los resultados de T_m no indiquen un aumento de la solubilidad de Clp por parte del LiCl, de alguna manera el catión metálico estabiliza a la proteína. Una manera de observar el efecto del LiCl sería repetir el experimento de Thermofluor utilizando una concentración mayor de Clp. El amortiguador optimizado tras el análisis de estabilidad térmica consiste en 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 100 mM LiCl, pH 8.0.

SEC-MSA del complejo Clp-DNA

Previo a realizar ensayos de cristalización, es necesario un análisis funcional de nuestra proteína. Dado que Clp es un factor de transcripción, la mejor forma de evaluar su función es mediante su interacción con DNA. El DNA para el experimento consiste en un dúplex que contiene la secuencia consenso para CAP (Tebbutt et al., 2002; Zhang et al., 1991). Se utilizó la secuencia consenso en lugar de un promotor nativo ya que CAP presenta una afinidad 450 veces mayor por su secuencia consenso que por su sitio de unión en el operón *lac* (Ebright et al., 1989), quedando pendiente medir la afinidad para Clp por la secuencia consenso y algún promotor nativo de *Xcc* para Clp.

Tabla 1. Análisis de solubilidad por Thermofluor

	10 mM [°C]	50 mM [°C]	100 mM [°C]
NaCl	47.1	46.4	60.0
CaCl ₂	46.7	45.6	45.4
LiCl	47.1	47.0	47.1
MgCl ₂	46.0	47.5	46.2
Glucosamina	48.2	49.6	49.7
MES	46.4	46.6	47.4
MOPS	48.2	51.3	45.8
HEPES	47.6	49.4	49.9
	1 mM [°C]	5 mM [°C]	10 mM [°C]
EDTA	47.8	48.5	49.2
Glicina	46.6	47.1	60.0

Valores de T_m obtenidos por análisis de Thermofluor para distintos compuestos. El valor de T_m para Clp en amortiguador de Tris 20 mM pH 8.0 (46.0 °C) fue utilizado como referencia. Además de los expuestos en la tabla, se obtuvieron los valores de T_m para Clp en el amortiguador de Tris 20 mM pH 8.0 adicionado con PEG 400 5%, PEG 1000 4%, PEG 4000 5%, Glicerol 2%, Tween 20 10%, PEI 2%, Tritón 2%, y Trehalosa 100 mM. Los valores de T_m fueron 48.6, 49.8, 47.6, 60.0, 60.0, 41.9, 46.8 y 47.1 °C respectivamente.

El tiempo de retención en la columna Superdex 75 disminuye en el caso del complejo Clp-DNA (12.18 min = 242391 Da) con respecto al DNA por sí solo (19.10 min = 11329 Da). (Figura 3). Esto fue corroborado por electroforesis en agarosa al 1% de las fracciones colectadas en cada caso (Figura 4). Ya que el dúplex de DNA migra a un peso de 11329 Da y el peso molecular reportado de cada subunidad de Clp es de 26000 Da, el peso molecular del complejo activo (consistente en un dímero de Clp y un dúplex de DNA) esperado era cercano a 63000 Da. Sin embargo, el peso molecular de 242391 Da obtenido para el complejo Clp-DNA es casi cuatro veces mayor al esperado, una posible explicación de este comportamiento sería la presencia de agregados en solución. Como parte de la caracterización de Clp se han realizado experimentos de dispersión dinámica de luz (datos no mostrados) que corroboran lo anterior. Dichos experimentos se realizaron con una concentración de proteína de 0.5 mg/ml, y los resultados, a pesar de no presentar uniformidad, arrojaban tamaños de partícula extremadamente grandes (100-1000 nm). Esto resultó exclusivo para Clp, ya que al realizar ensayos con BSA, lisozima u otras proteínas de estudio en el laboratorio, los tamaños de partícula arrojados eran coherentes de acuerdo a la proteína. Así mismo, como parte del proceso de purificación de Clp se han realizado cromatografías posteriores a la IMAC, como intercambio iónico y SEC, resultando en la pérdida de la proteína. De hecho, puede observarse la presencia de proteína en el frente (F) del SDS-PAGE de la Figura 1. Estos resultados en conjunto nos parecen una evidencia clara de problemas de agregación, lo cual explicaría la pérdida de la proteína por purificaciones posteriores y la presencia de proteína en el frente de la IMAC. Debido a ello, no ha sido posible obtener Clp con un grado mayor de pureza, por lo que la caracterización se ha realizado con la muestra obtenida de IMAC.

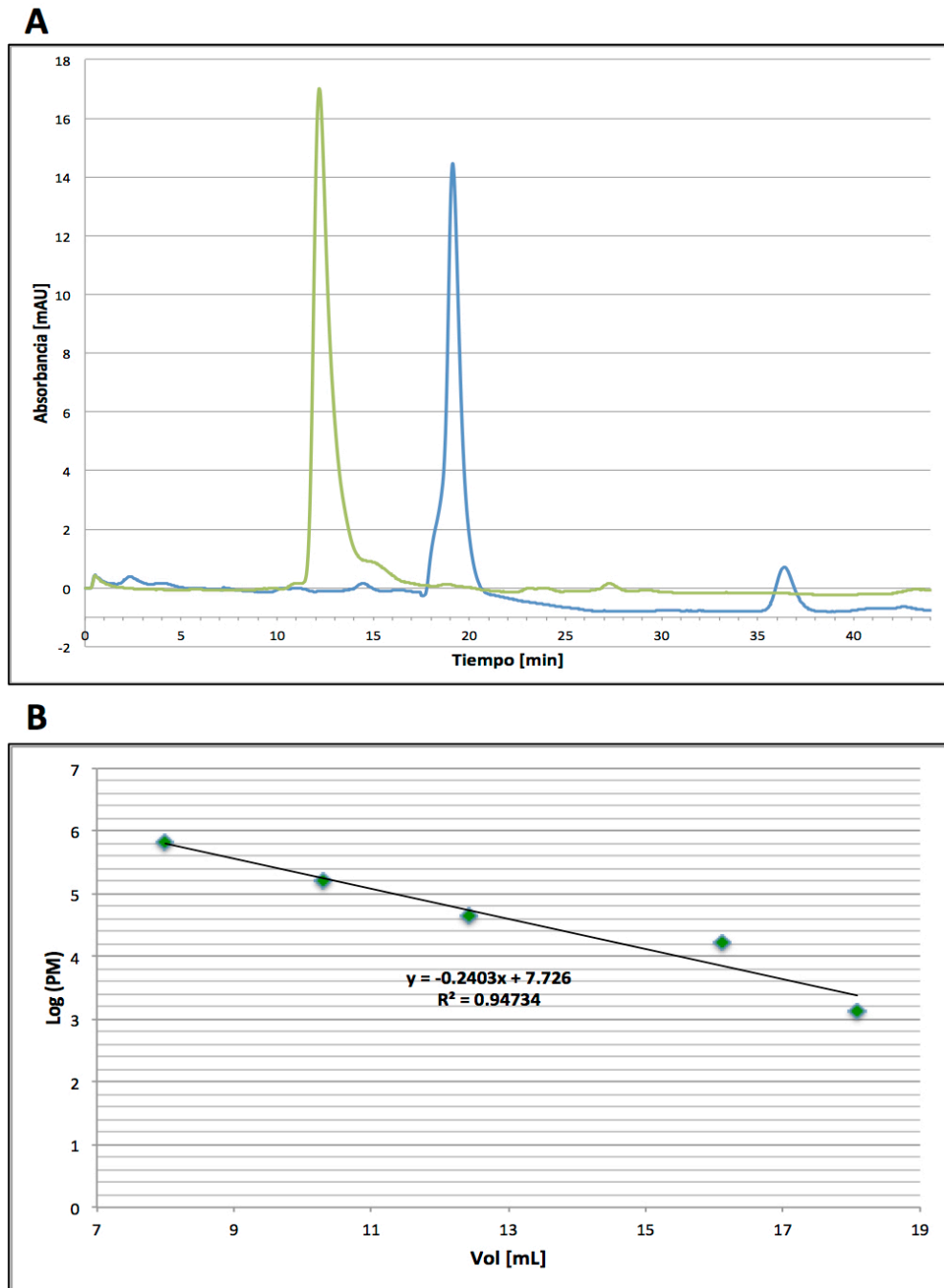


Fig. 3. Ensayo de movilidad por filtración en gel (SEC-MSA)

A) Cromatogramas de filtración en gel de DNA (en color azul) y de Clp+DNA (en color verde). El flujo de columna para el experimento fue de 0.8 ml/min, el seguimiento fue a 260 nm y se tomaron fracciones cada mililitro. El tiempo de retención disminuye en el caso de Clp+DNA dado el mayor peso molecular del complejo. B) Curva de calibración de la columna Superdex 75.

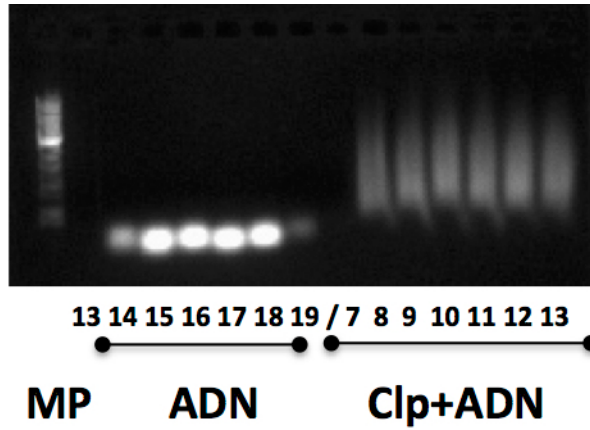


Fig. 4. Movilidad electroforética del complejo Clp-DNA

Gel de agarosa al 1% de las fracciones obtenidas por el experimento de filtración en gel de la Figura 3A. Se muestra el número de fracción correspondiente tanto para el DNA (curva azul Figura 3A) como para el complejo Clp-DNA (curva verde Figura 3A). La movilidad de Clp+DNA es característica de un complejo.

Ensayos de cristalización

El formar el complejo y concentrar la muestra tras la purificación por IMAC, nos ha permitido realizar los primeros ensayos con una concentración del complejo de 5 mg/ml. La cantidad de pozos claros fue de 166 (76.85%), mientras que la de pozos con precipitación es de 50 (23.15%). La solubilidad de las proteínas varía de acuerdo a las condiciones de la solución en que se encuentra, por lo que la solubilidad cambia en presencia de algún agente precipitante o de sal (Kim et al., 2011). La formación de cristales se da en soluciones sobresaturadas de proteína en un delicado equilibrio entre la precipitación o la nucleación. En un diagrama de fases podemos observar que la zona de formación de cristales está próxima a la zona de precipitación (Asherie, 2004; Kim et al., 2011). Por ello, la alta proporción de pozos claros nos indica que 5 mg/ml no es una concentración óptima del complejo para favorecer las condiciones de nucleación, ya que la muestra se encuentra principalmente en forma soluble. Por el contrario, una alta proporción de pozos con precipitado es lo que necesitamos para saber que estamos cercanos a las condiciones idóneas de cristalización.

Para aumentar las probabilidades de obtención de cristales es necesario aumentar la cantidad de complejo disponible para los ensayos. Los principales inconvenientes para ello son, por un lado la alta insolubilidad de Clp, y por otro, los problemas de agregación ya evidenciados. Prácticamente todos los grupos de investigación que trabajan con Clp han observado los mismos problemas (Chin et al., 2010). Para solucionar esto hemos pensado en dos alternativas distintas. Primero, con respecto a la agregación, pensamos que la etiqueta de histidinas podría ser la causante. De esta manera podemos, ya sea subclonar Clp sin una etiqueta de Histidinas y realizar su purificación mediante una columna de heparina, como se hace para CAP (Rao and Lawson, 2014), o bien colocar la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo de la proteína. La segunda alternativa consiste en expresar algún ortólogo de Clp que no presente los mismos problemas de insolubilidad y estabilidad, resolviendo la estructura por reemplazo molecular. Finalmente, se ha tomado en cuenta la posibilidad de realizar el análisis estructural del complejo de Clp con el segundo mensajero c-di-GMP. Contar con

las estructuras a buena resolución de Clp y sus complejos con DNA y c-di-GMP, abriría la posibilidad de diseñar un fármaco efectivo contra Xcc. Los experimentos de control actuales únicamente se basan en probar diversos compuestos seleccionados de forma un tanto estocástica (Velasco et al., 2013).

Clonación del cDNA de CAP en el vector de expresión pET28

Un análisis *in silico* de las estructuras activas de Clp (sin ligando) y CAP (con DNA y AMPc) arroja un RMSD de 1.283 Å. Este valor nos indica que las estructuras son prácticamente idénticas (Zhang, 2009). Si las estructuras son idénticas: ¿Clp se une al DNA de la misma forma que CAP? Hemos decidido abordar esta cuestión realizando un análisis comparativo de la interacción con el DNA mediante AFM (del inglés, Atomic Force Microscopy), el cual nos permitirá conocer si Clp produce un ángulo de doblez en el DNA cercano a 80° como sucede con CAP (Cervantes and Medina, 2014; Lawson et al., 2004).

Para realizar el análisis es necesario contar con Clp, CAP y una secuencia de DNA con la que interactúen y que nos permita ver la modificación en el DNA. El DNA seleccionado para el experimento consiste en una secuencia de 910 nucleótidos parte del operón *lac* del DNA genómico de *E. coli*, con el sitio de unión de 22 nucleótidos para CAP 5'-AATGTGATCTAGATCACATTT-3' ubicada en su posición natural a -62.5 bases del operón *lac* (Lawson et al., 2004). Con respecto a los factores de transcripción, el laboratorio ya cuenta con los vectores de expresión para Clp y SdrP, mientras que para contar con CAP se sintetizó el cDNA para CAP y se subclonó en el vector pET28pps para su expresión. Una digestión de la construcción pET28pps_CAP muestra que el vector contiene el gen de CAP, cuya secuencia fue corroborada por secuenciación. (Figura 5).

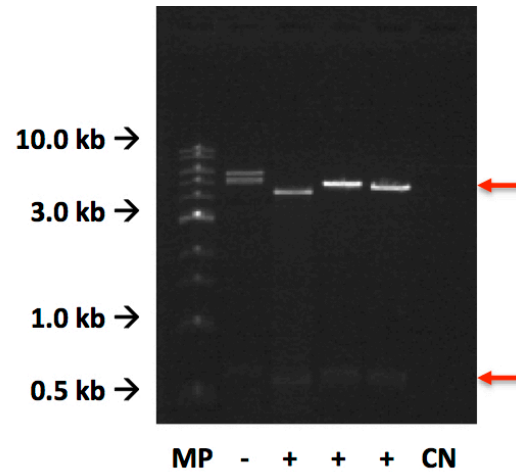
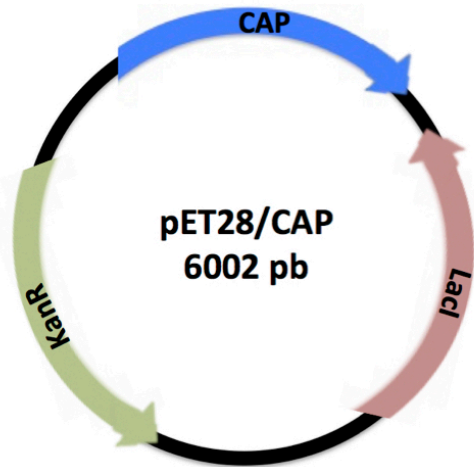


Fig. 5. Construcción pET28pps_CAP

A) Diagrama que muestra la construcción del vector pET28pps con un inserto del gen silvestre de CAP. B) Digestión con las enzimas de restricción *Nde* I y *Hind* III de DNA obtenido a partir de Miniprep de células Top10 transformadas con la construcción de interés. Se señala la ubicación de las bandas correspondientes al vector (pET28pps) y al inserto (CAP). Marcador de peso molecular (MP), clona negativa (-), clona positiva (+), control negativo (CN).

Evaluación de la expresión, solubilidad y purificación de CAP

La purificación de CAP arrojó un rendimiento de 24 mg/l. (Figura 6). A pesar de no seguir el protocolo canónico de purificación de CAP (Rao and Lawson, 2014), el rendimiento obtenido es más que suficiente para los ensayos de AFM. Además de Clp y CAP, en el laboratorio se trabaja con el factor de transcripción SdrP de *Thermus thermophilus*. Los tres factores de transcripción pertenecen a la superfamilia Crp/Fnr y son capaces de interactuar con la secuencia consenso de DNA para CAP (Lawson et al., 2004), diferenciándose únicamente por el tipo de cNMP que unen. CAP es un receptor de cAMP, Clp es un efector de c-di-GMP y SdrP no une ningún cNMP. Es notable como a pesar de ser muy similares en estructura, los rendimientos de purificación al expresarlos de forma recombinante son diferentes. SdrP presenta un rendimiento de 20 mg/L, muy similar al rendimiento obtenido para CAP. El rendimiento para Clp con el amortiguador optimizado por Thermofluor es de 3 mg/L. Dado que se utilizó el amortiguador para Clp durante la purificación de CAP y se obtuvo un rendimiento ocho veces mayor al de Clp, sería interesante observar si el amortiguador optimizado para Clp es igual de efectivo en todos los integrantes de la superfamilia Crp/Fnr.

Conclusiones

Clp es capaz de expresarse en las células BL21 Star de *Escherichia coli* con una concentración de IPTG de 0.2 mM. Al momento de purificar Clp, una concentración mínima de NaCl 100 mM y una concentración de LiCl 100 mM son necesarias para aumentar la solubilidad y estabilidad de Clp. Al mezclar Clp y DNA, una vez dada la interacción proteína-ácido nucleico, el complejo Clp-DNA es estable y se puede identificar por SEC-MSA.

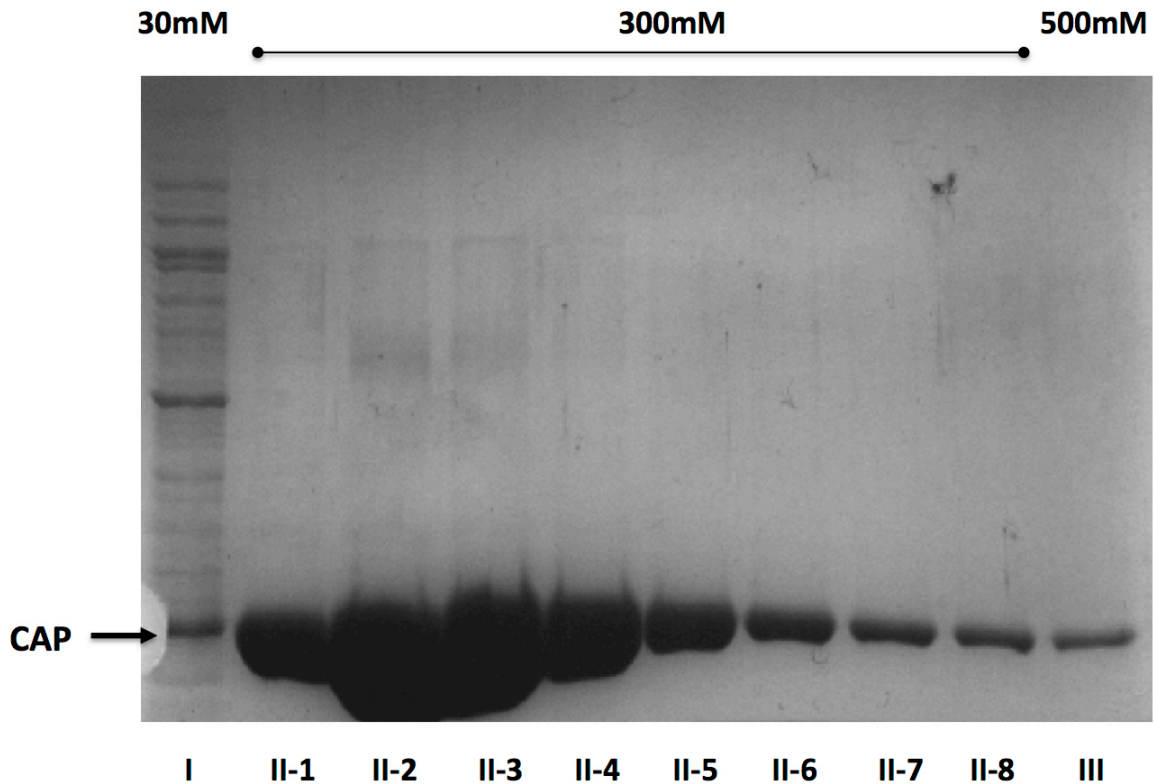


Fig. 6. Expresión y purificación de CAP

SDS-PAGE de la purificación por IMAC de CAP. La muestra se sonicó en el amortiguador optimizado para Clp (20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 100 mM LiCl, pH 8.0). La purificación se realizó con un gradiente escalonado de concentraciones de imidazol. Con una flecha se señala la ubicación de la proteína en el gel. Primera elución con 30 mM de imidazol (I), fracciones de la segunda elución con 300 mM de imidazol (II-n), tercera elución con 500 mM de Imidazol (III).

Sin embargo, a fin de resolver la estructura tridimensional del complejo Clp-DNA, una concentración mayor a 5 mg/ml del complejo es necesaria para la obtención de cristales adecuados para difracción de rayos X. Es importante resaltar que expresar Clp con una etiqueta de Histidinas en el extremo amino presentó problemas de agregación.

Finalmente, la construcción pET28pps_CAP permite la expresión de CAP en cantidades idóneas para el futuro análisis comparativo de la interacción proteína-DNA de Clp y CAP por AFM.

Agradecimientos

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de Registro 297723) 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.

Referencias

Akimoto-Tomiyama, C., Furutani, A., and Ochiai, H. (2014). Real Time Live Imaging of Phytopathogenic Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* MAFF106712 in “Plant Sweet Home.” PLoS ONE 9, e94386.

Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods San Diego Calif* 34, 266–272.

Boivin, S., Kozak, S., and Meijers, R. (2013). Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr. Purif.* 91, 192–206.

Boulanger, A., Zischek, C., Lautier, M., Jamet, S., Rival, P., Carrere, S., Arlat, M., and Lauber, E. (2014). The Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Exploits N-Acetylglucosamine during Infection. *mBio* 5, e01527–14 – e01527–14.

Cervantes, N.A.G., and Medina, B.G.- (2014). Robust deposition of lambda DNA on mica for imaging by AFM in air: Robust deposition of lambda DNA for AFM imaging. *Scanning* 36, 561–569.

Chen, C.-H., Lin, N.-T., Hsiao, Y.-M., Yang, C.-Y., and Tseng, Y.-H. (2010). Two non-consensus Clp binding sites are involved in upregulation of the gum operon involved in xanthan polysaccharide synthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Res. Microbiol.* 161, 583–589.

Chin, K.-H., Lee, Y.-C., Tu, Z.-L., Chen, C.-H., Tseng, Y.-H., Yang, J.-M., Ryan, R.P., McCarthy, Y., Dow, J.M., Wang, A.H.-J., et al. (2010). The cAMP Receptor-Like Protein CLP Is a Novel c-di-GMP Receptor Linking Cell–Cell Signaling to Virulence Gene Expression in *Xanthomonas campestris*. *J. Mol. Biol.* 396, 646–662.

De Crecy-Lagard, V., Glaser, P., Lejeune, P., Sismeiro, O., Barber, C.E., Daniels, M.J., and Danchin, A. (1990). A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 172, 5877–5883.

Dong, Q., and Ebright, R.H. (1992). DNA binding specificity and sequence of *Xanthomonas campestris* catabolite gene activator protein-like protein. *J. Bacteriol.* 174, 5457–5461.

Ebright, R.H., Ebright, Y.W., and Gunasekera, A. (1989). Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. *Nucleic Acids Res.* 17, 10295–10305.

Ernst, O., and Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *J. Vis. Exp.*

Fogolari, F., Brigo, A., and Molinari, H. (2002). The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *J. Mol. Recognit. JMR* 15, 377–392.

Francis, D.M., and Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. In *Current Protocols in Protein Science*, J.E. Coligan, B.M. Dunn, D.W. Speicher, and P.T. Wingfield, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.),.

- Ge, C., and He, C. (2008). Regulation of the Type II Secretion Structural Gene *xpsE* in *Xanthomonas campestris* Pathovar *campestris* by the Global Transcription Regulator Clp. *Curr. Microbiol.* *56*, 122–127.
- Gomelsky, M. (2009). Cyclic-di-GMP-Binding CRP-Like Protein: a Spectacular New Role for a Veteran Signal Transduction Actor. *J. Bacteriol.* *191*, 6785–6787.
- Gomelsky, M., and Galperin, M.Y. (2013). Bacterial second messengers, cGMP and c-di-GMP, in a quest for regulatory dominance. *EMBO J.* *32*, 2421–2423.
- Guo, Y., Zhang, Y., Li, J.-L., and Wang, N. (2012). Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing Plays a Central Role in Coordinating Gene Expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *25*, 165–179.
- Hawe, A., Sutter, M., and Jiskoot, W. (2008). Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharm. Res.* *25*, 1487–1499.
- He, Y.-W., Ng, A.Y.-J., Xu, M., Lin, K., Wang, L.-H., Dong, Y.-H., and Zhang, L.-H. (2007). *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol. Microbiol.* *64*, 281–292.
- Hsiao, Y.-M., Liao, H.-Y., Lee, M.-C., Yang, T.-C., and Tseng, Y.-H. (2005). Clp upregulates transcription of *engA* gene encoding a virulence factor in *Xanthomonas campestris* by direct binding to the upstream tandem Clp sites. *FEBS Lett.* *579*, 3525–3533.
- Hsiao, Y.-M., Zheng, M.-H., Hu, R.-M., Yang, T.-C., and Tseng, Y.-H. (2008). Regulation of the *pehA* gene encoding the major polygalacturonase of *Xanthomonas campestris* by Clp and RpfF. *Microbiology* *154*, 705–713.
- Kim, Y., Babnigg, G., Jedrzejczak, R., Eschenfeldt, W.H., Li, H., Maltseva, N., Hatzos-Skintges, C., Gu, M., Makowska-Grzyska, M., Wu, R., et al. (2011). High-throughput protein purification and quality assessment for crystallization. *Methods* *55*, 12–28.
- Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., and Ebright, R.H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 10–20.
- Leduc, J.L., and Roberts, G.P. (2009). Cyclic di-GMP Allosterically Inhibits the

CRP-Like Protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Bacteriol.* *191*, 7121–7122.

Lu, X.-H., An, S.-Q., Tang, D.-J., McCarthy, Y., Tang, J.-L., Dow, J.M., and Ryan, R.P. (2012). RsmA Regulates Biofilm Formation in *Xanthomonas campestris* through a Regulatory Network Involving Cyclic di-GMP and the Clp Transcription Factor. *PLoS ONE* *7*, e52646.

Nazari, M., Kurdi, M., and Heerklotz, H. (2012). Classifying Surfactants with Respect to Their Effect on Lipid Membrane Order. *Biophys. J.* *102*, 498–506.

Niesen, F.H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* *2*, 2212–2221.

Phillips, K., and de la Peña, A.H. (2011). The Combined Use of the Thermofluor Assay and ThermoQ Analytical Software for the Determination of Protein Stability and Buffer Optimization as an Aid in Protein Crystallization. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.),.

Ramya, R., Mohana Subramanian, B., Sivakumar, V., Senthilkumar, R.L., Sambasiva Rao, K.R.S., and Srinivasan, V.A. (2011). Expression and Solubilization of Insect Cell-Based Rabies Virus Glycoprotein and Assessment of Its Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice. *Clin. Vaccine Immunol.* *18*, 1673–1679.

Rao, R.R., and Lawson, C.L. (2014). Structure of catabolite activator protein with cobalt(II) and sulfate. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* *70*, 560–563.

Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., and Weiss, M.S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *69*, 209–214.

De Rossi, B.P., García, C., Alcaraz, E., and Franco, M. (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* interferes via the DSF-mediated quorum sensing system with *Candida albicans* filamentation and its planktonic and biofilm modes of growth. *Rev. Argent. Microbiol.* *46*, 288–297.

Rott, P., Fleites, L.A., Mensi, I., Sheppard, L., Daugrois, J.-H., Dow, J.M., and Gabriel, D.W. (2013). The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugar cane stalks by *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology* *159*, 1149–1159.

Sousa, R. (1995). Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *51*, 271–277.

Tao, F., He, Y.-W., Wu, D.-H., Swarup, S., and Zhang, L.-H. (2010). The Cyclic Nucleotide Monophosphate Domain of *Xanthomonas campestris* Global Regulator Clp Defines a New Class of Cyclic Di-GMP Effectors. *J. Bacteriol.* *192*, 1020–1029.

Tebbutt, J., Rhodius, V.A., Webster, C.L., and Busby, S.J.W. (2002). Architectural requirements for optimal activation by tandem CRP molecules at a class I CRP-dependent promoter. *FEMS Microbiol. Lett.* *210*, 55–60.

Tulumello, D.V., and Deber, C.M. (2012). Efficiency of detergents at maintaining membrane protein structures in their biologically relevant forms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1818*, 1351–1358.

Velasco, P., Lema, M., Francisco, M., Soengas, P., and Cartea, M. (2013). In Vivo and in Vitro Effects of Secondary Metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecules* *18*, 11131–11143.

Zhang, L.-H. (2010). A novel C-di-GMP effector linking intracellular virulence regulon to quorum sensing and hypoxia sensing. *Virulence* *1*, 391–394.

Zhang, Y. (2009). Protein structure prediction: when is it useful? *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 145–155.

Zhang, X.P., Gunasekera, A., Ebright, Y.W., and Ebright, R.H. (1991). Derivatives of CAP having no solvent-accessible cysteine residues, or having a unique solvent-accessible cysteine residue at amino acid 2 of the helix-turn-helix motif. *J. Biomol. Struct. Dyn.* *9*, 463–473.