



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización bioquímica y estructural del factor
de transcripción Clp y del complejo Clp/ADN**

Tesis que presenta

Karina Elisa Rosales Pérez

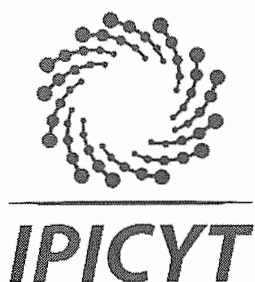
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización bioquímica y estructural del factor de transcripción Clp y del complejo Clp/ADN**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karina Elisa Rosales Pérez** y aprobada el veintinueve de noviembre del dos mil dieciocho 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. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial

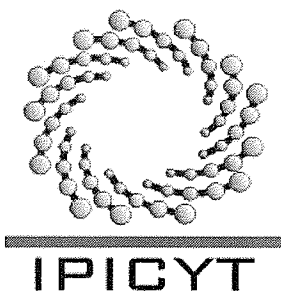
Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial



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 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 611368) 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-2013-01No 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 183 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 29 días del mes de noviembre del año 2018, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Presidente	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretaria	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karina Elisa Rosales Pérez

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización bioquímica y estructural del factor de transcripción Clp y del complejo Clp/ADN

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

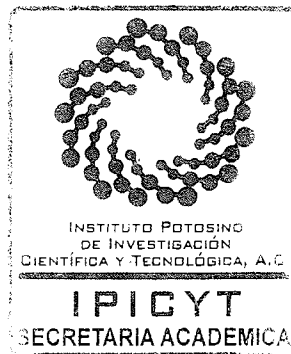
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de noviembre de 2018.

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

La presente Tesis está dedicada a mi mamá, porque siempre has estado a mi lado brindándome tu apoyo y consejos para hacer de mí una mejor persona. Gracias infinitas porque cuando todos los caminos se cierran siempre me brindas un abrazo caluroso y palabras motivantes, que me impulsan a continuar.

A mi amado esposo por sus palabras de aliento cuando las situaciones se complican, por su amor y por brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente. Este proyecto no fue fácil, pero siempre estuviste motivándome y ayudándome soy afortunada de tenerte como cómplice de vida.

A mi querida familia, por enseñarme que con esfuerzo e integridad se pueden lograr grandes cosas.

Al Doctor Samuel por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza depositada, por su infinita paciencia y el conocimiento transmitido.

A mis compañeros y amigos, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas y a todas aquellas personas que durante estos dos años estuvieron a mi lado apoyándome.

Gracias a todos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

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

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y Dra.

Martha Leticia Santos Martínez, por las aportaciones en la tesis.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	2
Materiales y Métodos	6
Evaluación de la expresión y solubilidad de proteínas	6
Expresión de la proteína Clp	6
Purificación por afinidad a níquel	7
Desalinización	8
Cromatografía por afinidad a heparina	8
Desplazamiento térmico	9
Formación del complejo Clp-ADN	9
Ensayos de cristalización	10
Crio conservación y montaje de los cristales	10
Determinación de la estructura de Clp, refinamiento y análisis	11
Resultados y Discusión	12
Evaluación de la expresión y solubilidad de proteínas	12
Desplazamiento térmico	12
Purificación por afinidad a níquel	13
Desalinización	13
Purificación por afinidad a Heparina	14
Formación del complejo Clp-ADN	14
Ensayos de cristalización	15
Determinación de la estructura de Clp	16
Estructura de Clp	19
Conclusiones	20
Referencias	37

Lista de tablas

Tabla I.	Condiciones evaluadas en el ensayo de estabilidad térmica.	21
Tabla II.	Condiciones evaluadas en el segundo ensayo de estabilidad térmica.	22
Tabla III.	Condiciones en las que crecieron cristales de Clp Xac y Clp-ADN.	23
Tabla IV.	Aditivos usados para optimizar las condiciones de cristalización.	26
Tabla V.	Datos cristalográficos y estadísticos de la recolección de datos y refinamiento.	27
Tabla VI.	Datos estadísticos de validación por MolProbit.	28

Lista figuras

Fig. 1	Alineamiento de las secuencias de Clp tanto de <i>X. campestris</i> cómo de <i>X. axonopodis</i> .	29
Fig. 2	Evaluación del tiempo de incubación y concentración de IPTG para la expresión de Clp en BL21 (DE3) Star.	30
Fig. 3	Ensayo de estabilidad térmica	31
Fig. 4	Purificación de la proteína recombinante por afinidad a Níquel	32
Fig. 5	Cromatografía de afinidad a Heparina.	33
Fig. 6	Cristales de Clp de <i>Xanthomonas axonopodis</i>	34
Fig. 7	Densidad electrónica en la estructura de Clp de <i>Xanthomonas axonopodis</i>	35

Abreviaturas

AMPC	Ciclic adenosin monophosphate
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CAP	Catabolite activator protein
c-di-GMP	Ciclic diguanosil monophosphate
Clp	Crp like protein
CV	Column Volumes
COOT	Crystallographic Object-Oriented Toolkit
DSF	Difusible signal factor
EPS	Exopolysaccharide
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MR	Molecular Replacement
Ni-NTA	Niquel-nitrilotriacetic acid
PDB	Protein Data Bank
PHASER	Program for phasing macromolecular crystal structure
PHENIX	Python-based Hierarchical Environment for Integrated Xtallography
QS	Quorum sensing
RPF	Regulator pathogenicity factors
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>

Resumen

Caracterización bioquímica y estructural del factor de transcripción Clp y del complejo Clp/ADN

Las bacterias del género *Xanthomonas* son de un alto interés agrícola y económico, a causa de que son bacterias fitopatógenas y por lo tanto responsables de enfermedades en plantas como la podredumbre negra o cáncer, en cultivos como tomates, pimientos, cítricos o frutas, entre otros. Estas bacterias poseen un factor de transcripción global de virulencia llamado Clp el cual es un homólogo estructural de la proteína activadora por catabolito (CAP, también conocida como CRP) de ahí que reciba el nombre de Clp, por sus siglas en inglés CRP like protein. Clp es de interés en la súper familia CRP/FNR debido a que puede unirse a ADN sin necesidad de un ligando y cuando se une a éste, que es c-di-GMP, Clp es inhibido, caso contrario a su homólogo CAP. Es de un gran interés conocer el mecanismo por el cual Clp reconoce e interacciona con su sitio de unión en el ADN y de igual forma con c-di-GMP. En el presente trabajo se expresó Clp en la cepa BL21 (DE3) Star de *Escherichia coli*, y se evaluaron las condiciones para una mejor expresión de la proteína recombinante. Mediante la técnica de desplazamiento térmico se identificó un amortiguador que le proporciona mayor homogeneidad y estabilidad térmica y conformacional a la proteína recombinante. La purificación se realizó mediante dos pasos cromatográficos el primero por IMAC y el segundo por afinidad a Heparina. Se realizaron ensayos de cristalización tanto de la proteína recombinante como en complejo con ADN, utilizando la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Con los cristales obtenidos para Clp, se realizaron experimentos de difracción de rayos X, obteniendo un patrón de difracción de 2.6Å de resolución con el cual se resolvió su estructura.

Palabras clave: CAP, Factor de Transcripción, Interacción Proteína-ADN, Cristalización, Reemplazo Molecular.

Abstract

Biochemical and structural characterization of the interaction of the transcription factor Clp with its binding site in DNA

Bacteria of the genus *Xanthomonas* are of high agricultural and economic interest, because they are phytopathogenic and therefore responsible for diseases in plants such as black rot or cancer in crops such as tomatoes, peppers, citrus or fruit, among others. These bacteria have a global virulence transcription factor called Clp which is a structural homologue of the catabolite activating protein (CAP) or also known as CRP hence it is called Clp, for its acronym in English CRP like protein. Clp is of interest in the CRP / FNR super family because it can bind to DNA without the need for a ligand and unlike its more-studied homologue CAP the binding to its ligand (c-di-GMP) only causes its inhibition. It is of great interest to know the mechanism by which Clp recognizes and interacts with its binding site in DNA and in the same way with c-di-GMP. In the present work, Clp was expressed in strain BL21 (DE3) Star of *Escherichia coli*, the conditions for a better expression of the recombinant protein were evaluated. By means of the thermal displacement technique, a buffer was identified that provides greater homogeneity and thermal and conformational stability to the recombinant protein. The purification was carried out by means of two chromatographic steps, the first by IMAC and the second by affinity to Heparin. Crystallization tests were carried out on both the recombinant protein and on the DNA complex, using the technique of vapor diffusion in sitting drop. Several crystals were tested in X-ray diffraction experiments, a complete dataset was collected from a single crystal and the structure of apo Clp was obtained at 2.6Å.

KEY WORDS. CAP, Transcription Factor, Protein-ADN interaction, Crystallization, Molecular Replacement.

Caracterización bioquímica y estructural del factor de transcripción Clp y del complejo Clp/ADN

Rosales-Pérez K.E.¹, Lara-González S.^{1*}

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

***Autor de correspondencia:** Samuel Lara-González,
Tel. 01(444)834200 ext. 6239
Correo electrónico: Samuel.laripicyt.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Xanthomonas* producen la goma de xantana, la cual tiene diversas aplicaciones en la industria farmacéutica y alimenticia como agente estabilizante o espesante¹. Estas bacterias también fabrican grandes cantidades de exopolisacáridos (EPS) y son capaces de secretar enzimas extracelulares incluyendo proteasas, pectinasas y endoglucanasas, los cuales se han considerado importantes factores de virulencia causantes de la enfermedad de podredumbre negra en una amplia variedad de plantas comerciales alrededor del mundo, especialmente las crucíferas y rutáceas. El mecanismo por el cual éstas bacterias causan estas enfermedades es penetrando al sistema del xilema de las plantas a través de heridas o bien por los hidatodos², que son estructuras generalmente presentes en los bordes de las hojas por medio de las cuales secretan agua. Estos hidatodos facilitan el ingreso bacteriano hasta llegar al xilema; una vez ahí las bacterias crecen y desarrollan de lesiones cloróticas en forma de V que se extienden desde el borde de la hoja^{3,4}

Para la formación de biofilm y de los factores de virulencia, existe un sistema de fosfotransferencia de dos componentes que transmite una señal ambiental al interior de la bacteria con la consecuente expresión de genes de respuesta; el mecanismo denominado Quorum sensing (QS), detecta la densidad celular, responsable de la regulación de genes por medio de la secreción y detección de señales químicas denominadas autoinductores.^{5,6} Para la adaptación de la bacteria a su entorno es crucial que el QS detecte cuándo una molécula señal alcanza determinada concentración, para que la bacteria exprese determinados genes⁷. En el caso de *Xanthomonas campestris* el QS en condiciones de alta densidad de población regula de manera positiva los factores de virulencia (producción de EPS, secreción de enzimas hidrolíticas y formación de biofilm); el sistema de dos componentes está constituido por la quinasa histidínica RpfC, que tiene un dominio transmembrana, un dominio receptor de señal REC, un dominio HTP (del inglés, histidine phosphotransferase) y su regulador de respuesta RpfG, éste último tiene los dominios REC y HD-GYP. Por lo tanto, a baja densidad de

DSF la RpfC está unida a RpfF (DSF sintasa), dejando al regulador RpfG inactivo y como resultado el nivel de c-di-GMP es elevado permitiendo así que éste se una a el factor de transcripción Clp; como consecuencia de ésta unión, Clp no puede unirse al ADN blanco⁸. Caso contrario; la disminución intracelular de c-di-GMP activa a Clp, propiciando la expresión de los genes involucrados en la patogénesis de *Xanthomonas*, incluyendo a aquellos que codifican para enzimas extracelulares como la endoglucanasa EngXCA y la manasa ManA.⁹ Para comprobar la regulación transcripcional de éstos factores de virulencia se realizó una delección del gen de Clp, lo cual tiene como consecuencia una reducción severa en la producción de EPS y enzimas extracelulares incluso mayor que la delección de rpfF y rpfG. Con respecto a la formación de biofilm, Clp juega un papel dinámico en su regulación en respuesta a las alteraciones en los niveles de c-di-GMP^{4,10}. Debido a que actúa como activador cuando se une al gen *manA* y de forma inversa como represor en su unión al gen *xag*. El gen *manA* está implicado en la dispersión de biofilm y el segundo gen *xag* en la formación de biofilm^{11,12}. Estos hallazgos sugieren que la unión de Clp con c-di-GMP cuando se encuentra en niveles elevados influye en factores involucrados en la formación de biofilm, ésta unión Clp-c-di-GMP previene que el factor de transcripción se una a ADN y por lo tanto la expresión del gen *manA* disminuye pero por el contrario se expresa el gen *xag*.¹¹

Clp es un factor de transcripción que recibe éste acrónimo de “CAP like protein” debido a que comparte 45% de identidad en secuencia de aminoácidos y un RMSD de 0.99 Å en alineación de estructuras con su homólogo más estudiado en *Escherichia coli* CAP (Catabolite activator protein), y máximo representante de la familia CRP/FNR a la cual también pertenece Clp. En esta familia de reguladores transcripcionales sus miembros forman homodímeros y tienen un dominio N-terminal que constituye el sitio de unión a su efector y un dominio C-terminal que comprende el motivo hélice-giro-hélice de unión a ADN¹³. En el caso específico de Clp su efector es c-di-GMP y contrario a CAP la unión a su efector inhibe la unión de Clp al ADN blanco. El sitio de unión de Clp con su efector c-di-GMP no está bien definido; sin embargo, el modelado sugiere que el nucleótido se une en un

sitio localizado entre el dominio cNMP (N-terminal cyclic mononucleotide) y el dominio de unión a ADN a diferencia de CAP que se une en el dominio cNMP¹⁴.

Chin Ko-Hsin y colaboradores, cristalizaron XcClp (Clp en *X. campestris*) en ausencia de cAMP y ADN, resolvieron la estructura por remplazo molecular (MR) usando como modelo de búsqueda a *EcCAP* (CAP de *E. coli*) en complejo *EcCAP*-cAMP-ADN (PDB 2CGP) y determinaron que la estructura apo de XcClp es muy similar a la estructura del complejo *EcCAP*-cAMP-ADN, las cuales pudieron empalmarse con excepción de los primeros 21 residuos del N-terminal. Así mismo concluyen que el dominio N-terminal es el característico a CAP, constituido por ocho cadenas de barriles β anti paralelas flanqueadas por dos α -hélices. El dominio C-terminal consiste en tres α -hélices y cuatro barriles β anti paralelos con dos α -hélices (αE y αF) conectados por un loop entre los residuos 198-200 lo cual constituye el motivo HTH (hélice-giro-hélice) característico de la familia. Una diferencia estructural entre XcClp y *EcCAP* es que la primera forma de un dímero simétrico con cada subunidad adoptando una forma cerrada adecuada para la unión a ADN; y la segunda adopta una estructura de un dímero no simétrico, con una subunidad abierta y la otra cerrada, la cual solo se vuelve simétrica cuando es cristalizada en presencia de cAMP y ADN.

En *EcCAP* los residuos S84 y E130 son cruciales en el sitio de unión e interacción con el AMP cíclico, sin embargo estos residuos corresponden a E99 y R150 en XcClp respectivamente, E99 es un residuo grande con carga negativa lo que implica un cambio dramático para la posible unión de cAMP con XcClp¹⁴, esta ausencia de efector se ve compensada con la formación de un puente salino E99-R150, lo que sugiere que posiblemente c-di-GMP tenga otro sitio de unión.

Con respecto a la unión a ADN en XcClp el residuo D162 (G142 en *EcCAP*) forma dos puentes de hidrógeno con la cadena lateral del residuo D159 lo que provoca un acercamiento entre las hélices αC y αD , primer requerimiento para la unión a ADN. Así mismo se necesita de un residuo que propicie la interacción de la hélice αD con la αF hélice, en *EcCAP* esta función corresponde a A145, el cual corresponde en XcClp a V165 un residuo hidrofóbico que empuja y orienta a la hélice αF para la interacción con ADN¹⁵.

En nuestro grupo de trabajo en el 2015 se empezó a trabajar con Clp de *X. campestris* y *X. axonopodis*, (Fig.1) debido al alto porcentaje de identidad entre ambas (98%), logrando la correcta clonación de los genes sintéticos de Clp para la expresión de *E. coli* con el objetivo de tener la proteína de Clp fusionada a una etiqueta de seis histidinas (6XHis) en el extremo N-terminal y clonado entre dos sitios de restricción de las enzimas Hind III y Nde I del vector pET28-PPS, cuyas clonas fueron verificadas por secuenciación en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA). Sin embargo, los rendimientos de ambas proteínas no permitían hacer ensayos de cristalización. Por lo que estas dos secuencias se analizaron en programas que evalúan la propensión a cristalizar como lo son: XtalPred-RF, Crysalis, PDpredictor, CRYSTALP2 y SECRET y con base en los resultados obtenidos se decidió trabajar en la optimización del rendimiento de Clp de *X. axonopodis*. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar las condiciones para lograr una buena expresión de Clp de *X. axonopodis*, en las que la proteína se mantenga soluble y estable, así como desarrollar el protocolo para la purificación de la misma y poder utilizarla en ensayos de cristalización y resolver su estructura tridimensional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína

Se evaluó la expresión de Clp en la cepa de *E.coli* BL21 (DE3) Star con diferentes tiempos de inducción (2, 5, 8 y 16 h), temperaturas de incubación (37 y 28°C), y concentraciones de IPTG (Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mM.

Se realizaron dos protocolos de expresión; en el primer protocolo a evaluar se prepara el pre-inóculo con células BL21 (DE3) Star transformadas con la construcción pET28pps_Clp en 50 ml de medio LB líquido adicionado con kanamicina (50 μ g/ml). El pre-inóculo se incuba a 37°C durante 12h a 190 rpm (revoluciones por minuto) con éste se inocula medio LB fresco (en una dilución 1:25) el cual se incuba hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0.6 - 0.8. Una vez alcanzada la densidad óptica se induce la producción de proteína con 0.2mM de IPTG y así evaluar las diferentes condiciones de tiempo y temperatura de incubación antes mencionadas^{16,17}. En el segundo protocolo, se prepara el pre-inóculo en las condiciones antes mencionadas y una vez que se obtiene una DO_{600nm} entre 0.6 y 0.8 se induce la producción de la proteína con diferentes concentraciones de IPTG para evaluar la influencia de éstas en la expresión y se incuba a 28°C por 16 h, se tomó una alícuota antes y después de la inducción y se evaluó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%.

Expresión de la proteína Clp

Se descongelaron en hielo 50 μ l de células competentes BL21 star por 10 minutos; después se agregó 1 μ l del vector con la construcción pET28pps_Clp, se mantuvo en hielo por 20 min, posteriormente se le dio un choque térmico a 42°C por 45 s e incubar en hielo por 2 minutos. Posteriormente se le añadió 500 μ l de medio Luria-Bertani (LB) se incubó por una hora a 37°C con agitación constante a 190 rpm. Los tubos se centrifugaron a 6000 rpm, se retiraron 400 μ l de medio LB, el precipitado se resuspendió y se resembró en placas de agar con kanamicina, las cuales se incubaron a 37°C por 16 h.

A partir de estas colonias se prepara el preinóculo en 50 ml de medio LB con kanamicina y se incubó a 37°C durante 12 horas.

Posterior a la incubación se inoculó un litro de medio LB fresco con kanamicina se incubó a 37°C con agitación constante a 190 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 nm. Una vez alcanzado se hizo un choque térmico a 4°C por 2 h y posteriormente se indujo la expresión con una concentración final de 0.2mM de IPTG, la expresión se hizo a 28°C durante 16 horas con agitación constante a 190rpm. El precipitado de las células se guardó a -20°C hasta su uso. La expresión fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%.

Purificación por afinidad a níquel

Para purificar Clp del extracto celular, al término de la inducción, se centrifugan las células a 10,000 rpm durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante y éstas células son re suspendidas en 25 ml del amortiguador optimizado (25mM Tris-HCl pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM) y las células se sonicán 7 min 30 seg con pulsos de 15s ON/30s OFF a 50% de amplitud. Después se centrifugan a 12,000 rpm a 4°C por 15 min. Se recupera la fracción soluble, la cual se transfiere a una columna de agarosa Ni-NTA de Qiagen.

La columna Ni-NTA de Qiagen es equilibrada con 5 volúmenes de columna del amortiguador optimizado. La elución se realiza con un gradiente escalonado de imidazol de la siguiente forma: en el primer lavado se usan 10 volúmenes de columna (CV) del amortiguador de lisis adicionado con 10mM de imidazol, se hace un segundo lavado con 6CV de amortiguador de lisis adicionado con 50 de imidazol y por último un lavado con 4CV usando el amortiguador de lisis con 500mM de imidazol. Las fracciones eluidas se colectan y son sometidas a electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 12%.

La proteína recombinante, presente en las fracciones que eluyeron, se mezclaron e incubaron con 5 unidades/mL de la proteasa PPS a 4°C durante toda la noche para eliminar la etiqueta de histidinas. Se tomó muestra antes y después de la

incubación con la proteasa y el corte fue evaluado por medio de SDS-PAGE al 12%.

Desalinización

La proteína recombinante es desalada por filtración en gel con una columna sephadex g-25 PD10 (GE Healthcare). En un primer paso se evaluó la cantidad de KCl necesario en el buffer, para determinar la metodología de desalinización que se adecue a Clp de *X. axonopodis*.

Primero se lava la columna adicionando 25ml de agua milliQ, y se desecha el sobrenadante, después la columna es equilibrada con 25 ml del amortiguador a ser evaluado, cada uno mantiene constante las siguientes condiciones: 25mM Tris-HCl pH 7.5, Glicerol 15%, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM y lo que se modifica es la concentración de KCl; de la siguiente forma: sin KCl, con 50mM, 100mM y 150mM de KCl según corresponda. Se adiciona 2.5 ml de la muestra proveniente de la purificación por níquel, el frente en este caso es colectado para evaluar y por último se adiciona 3.5 ml del amortiguador a la columna y se colecta ésta elución. Este protocolo se repitió para cada uno de los amortiguadores a evaluar.

Se toman muestras tanto del frente y la elución de cada una de las condiciones y se evalúan mediante SDS-PAGE al 12% y se mide la concentración de proteína por el método de Bradford.

Cromatografía por afinidad a heparina

Una vez que la proteína es desalada por filtración en gel con una columna sephadex g-25 PD10 la elución es filtrada por una membrana de 0.2 μ m e inyectada en el equipo AKTA-FPLC (GE Healthcare) usando una columna de afinidad a heparina HiTrap Heparin HP (GE Healthcare)¹⁸, previamente equilibrada con el amortiguador (25mM Tris-HCl pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 500 mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM). Se utilizaron dos amortiguadores para la purificación por afinidad a heparina; el amortiguador A que contenía Tris-HCl pH 7.5 25mM, Glicerol 15%, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM y el amortiguador B contenía 25mM Tris-HCl pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 1M, LiCl 25mM, β -

mercaptoetanol 1mM. La proteína se recupera haciendo un gradiente lineal de 50% a 100% de amortiguador B, usando un flujo de 2ml/min y se colectaron fracciones de 3 ml cada una, las cuales se sometieron a SDS-PAGE al 12%.

Desplazamiento térmico

La técnica de desplazamiento térmico (Thermal Shift Assay) también conocida como Thermofluor, se realizó en una placa de PCR de 96 pozos y el equipo usado fue un RT-PCR 7500 Fast (Applied biosystems). El volumen final de la muestra fue de 40µl, la proteína Clp de *Xanthomonas axonopodis* se ajusta a una concentración final de 0.1 mg/ml, se incuba junto con el fluoróforo SYPRO orange (Invitrogen) con una concentración final de 5X y con cada una de las condiciones a evaluar, entre ellas tipo de amortiguador, uso de sales, detergentes, etc. Las cuales se encuentran en la Tabla 1. El rango de temperatura que se evaluó fue de 25°C a 95°C y los datos de fluorescencia emitida se analizaron y graficaron en Excel; ajustándolos a la ecuación de Boltzman para obtener la Tm (melting temperature) con el complemento Solver de Excel^{19,20}.

Formación del Complejo Clp-ADN

Para la formación del dúplex de ADN de 38 pb (pares de bases) se utilizó la secuencia consenso de unión a ADN de CAP. Utilizando dos secuencias de ADN (Integrated DNA Technologies), 17-mer (5'ATTTTCGAAAATTGTGAT) Y 19-mer (5'CTAGATCACAATTTTCGAAAT), las cuales forman un palíndromo. La hibridación del dúplex de ADN se hace en un termociclador Bio Rad utilizando una rampa de disminución de temperatura de 0.1° C/s. La temperatura inicial es de 95°C y se reduce hasta 20°C, este protocolo se realiza por duplicado en el termociclador.

La proteína purificada por afinidad a heparina es mezclada con el ADN en una relación 1:1.5 (proteína: ADN) en presencia de 50mM de MgCl₂ para la formación del complejo.

Ensayos de Cristalización

La técnica utilizada para los ensayos de cristalización fue difusión de vapor en gota sentada con el método de matriz esparcida.

La proteína purificada por afinidad a heparina, se cambia al siguiente amortiguador 25mM Tris-HCl pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 300mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM, mediante la columna sephadex g-25 PD10. Posteriormente es concentrada a 10 mg/ml en un amicon Vivaspín turbo con una membrana de retención de 10kDa.

Para el complejo Clp/ADN primero se cambia la proteína al amortiguador 25mM Tris-HCl pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 300mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM, mediante la columna sephadex g-25 PD10, para posteriormente formar el complejo Clp:ADN en una proporción 1:1.5 y por último concentrarlo a 15 mg/ml en un amicon Vivaspín turbo con una membrana de retención de 10kDa.

Se usaron dos matrices de condiciones de cristalización; la primera de Hampton Research (Kit Cristal Screen I y II) y el segundo de Molecular Dimensions (Kit Morpheus I y Morpheus II). Para cada condición se utiliza 50 μ L de precipitante, las gotas se colocan en una proporción 1:1 (0.8 μ L de proteína y 0.8 μ L de precipitante) las cajas son selladas y almacenadas a 14°C monitoreándolas periódicamente con el microscopio estereoscópico.

Crio conservación y montado de los cristales

Una vez identificado un cristal de buena calidad, se cortó con cuidado el sello del pozo en el que se encuentra, y con la ayuda de un crio-loop se pesca el cristal, para después sumergirlo por unos segundos en la solución madre adicionada con 20% glicerol como solución crioprotectora, posterior a esto se pesca nuevamente y se congelan instantáneamente "flash-frozen" en crio-viales que se encuentran sumergidos en nitrógeno líquido, en un movimiento continuo y rápido. Los cristales son almacenados en un contenedor con nitrógeno líquido (Dewar) para su transporte. Cada cristal se mantiene en nitrógeno líquido mientras es transportado y durante el experimento de difracción.

Se registró la ubicación y detalles de cada cristal cosechado y congelado. Una vez colectado cada cristal es enviado al Laboratorio Nacional de Estructura de Biomacromoléculas (LANEM) para realizarles a estos cristales la técnica de difracción de rayos X.

Determinación de la estructura de Clp, refinamiento y análisis

Los datos de difracción que se obtuvieron del difractómetro del LANEM, por el método de rotación, fueron integrados con el programa HKL 3000. Posteriormente, los datos se analizaron con el programa xtriage de la plataforma PHENIX, para corroborar la correcta asignación del grupo espacial y determinar la presencia de posibles anomalías (twinning) y datos como el coeficiente de Mattheus o el factor B del gráfico de Wilson.

Para la resolución del problema de fases se usó el método de remplazo molecular (MR), utilizando como modelo de búsqueda la estructura de Clp de *Xanthomonas campestris* (PDB: 3iwz) con el programa de PHASER, se determinan los valores de la función de rotación (RFZ) y la de traslación (TFZ) para confirmar la certeza de la solución.

El refinado se hizo con el programa phenix.refine; sólo en el primer ciclo de refinado se realizó con el protocolo de simulated annealing, junto con los siguientes parámetros: refinamiento cartesiano estándar con las coordenadas XYZ, cuerpo rígido activo, con función de máxima verosimilitud, todas con restricciones de simetría no cristalográfica. Para el segundo ciclo de refinado y los subsecuentes, se ejecuta con los mismos parámetros a excepción de simulated annealing.

Posterior a cada refinado se efectuaron los ajustes necesarios a las coordenadas utilizando mapas de desidad electrónica ($2F_o-F_c$ y F_o-F_c) de forma manual en el programa COOT, después de varios ciclos de ajuste y refinamiento, la estructura se sometió a validación en el programa MolProbity, disponible en <http://molprobity.biochem.duke.edu>.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la expresión y solubilidad de proteínas

Con el fin de obtener la proteína pura que nos permitiera realizar ensayos funcionales y estructurales se evaluaron diferentes condiciones de expresión, usando la cepa BL21 (DE3) Star de *E. coli*, debido a que esta cepa es deficiente de la expresión de proteasas y como consecuencia disminuye el riesgo de proteólisis de la proteína recombinante y por otro lado contiene la secuencia que codifica para la RNA polimerasa T7 indispensable para la expresión en el vector pET28, entre otros.

Una vez transformadas, las bacterias BL21 (DE3) star con el plásmido pET28 Xac (del cual se corroboró su secuencia en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental) se inició con el protocolo de evaluación de la expresión antes mencionado y con base en los resultados obtenidos en los geles SDS-PAGE al 12% podemos discernir y concluir que la mejor condición para una mayor expresión de la proteína fue que, la temperatura y tiempo de incubación sea a 28°C por 16 h, una temperatura de expresión más baja facilita la producción de la proteína soluble y plegada. Por otro lado, en cuanto a la evaluación que se hizo para conocer la concentración de IPTG necesaria para una mayor expresión, los resultados muestran que ésta concentración no afecta significativamente la cantidad de proteína obtenida (Fig. 2). Por lo que se decidió trabajar con una concentración de 0.2mM de IPTG, basándonos en el hecho de que cuando requerimos aumentar la solubilidad de las proteínas no es conveniente saturar los mecanismos celulares de plegado y que el IPTG puede llegar a ser tóxico debido a que no es metabolizado, por lo que se decidió usar la concentración más baja^{16,17}.

Desplazamiento térmico

El ensayo de desplazamiento térmico fue un protocolo rápido y sencillo que nos permitió la identificación de los componentes necesarios para que el amortiguador aumentara la estabilidad y homogeneidad conformacional de la proteína recombinante, lo cual podría permitir el mejorar notablemente la probabilidad de

éxito en la obtención de cristales^{19,20} debido a que se ha demostrado que una estabilidad térmica aumentada se correlaciona con un orden estructural incrementado y una menor flexibilidad de la proteína y cómo consecuencia final incrementar las posibilidades de cristalizar la proteína. En una primera etapa se probaron 96 condiciones diferentes, mencionados en la Tabla I, cuyos resultados nos permitió seleccionar aquellos aditivos que mejoraban la T_m y que a su vez se ajustaban mejor a la ecuación de Boltzman. Como segunda etapa en ésta selección de aditivos, se eligieron a aquellos destacados en la primera etapa y se hicieron 96 combinaciones diferentes (Tabla II) entre ellos, para la identificación de aquel amortiguador que tuviera los aditivos que permitieran una T_m relevante y correcto ajuste a la ecuación de Boltzman. De esta forma fue posible determinar el amortiguador de trabajo, el cual vamos a llamar a partir de este momento como “amortiguador optimizado” y se compone de: Tris-HCl 25mM pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM presentando una T_m de 60.75 ± 0.15 C (Fig. 3).

Purificación por afinidad a níquel

En la purificación por afinidad a Níquel se usó el amortiguador optimizado (Tris-HCl 25mM pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM) y la columna de agarosa Ni-NTA de Qiagen de 5 ml. Como resultado se tuvo un rendimiento de 11.26mg/L, con el amortiguador optimizado mejoró tres veces más el rendimiento a lo obtenido en nuestro grupo de trabajo en 2016 por Pérez Márquez²¹ (3mg/L). La proteína recombinante eluyó en su totalidad en el primer lavado con 500mM de imidazol; cómo se puede observar en la Fig. 4. Para eliminar la etiqueta de histidinas que hasta este punto aún tenía la proteína, se le adicionó 5 unidades/ml de proteasa PPS y se incubó a 4°C toda la noche, lo cual se comprobó mediante SDS-PAGE al 12% (Fig. 4).

Desalinización

Para poder colocar pruebas de cristalización se disminuyó la concentración de sal con la finalidad de reducir la solubilidad de la proteína y de esta forma alcanzar la

súper saturación o el límite de solubilidad de la proteína y aumentar la probabilidad de que se formen cristales; sin embargo, en el caso específico de Clp, la concentración de sal no se pudo erradicar en su totalidad, porque la proteína la requiere para su estabilidad; por lo que se decidió hacer un cambio de amortiguador con menor cantidad de sal. Se evaluó este cambio con tres diferentes concentraciones de KCl (50, 100, y 150mM), se colectó la muestra tanto del frente, cómo de la elución y se evaluó con SDS-PAGE al 12%. Lo que nos permitió determinar que la proteína recombinante puede ser cambiada a un amortiguador que contenga Tris-HCl 25mM pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 150mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM, para continuar con el siguiente paso de purificación que es afinidad a Heparina.

Purificación por afinidad a Heparina

Para el último paso de purificación se usó la columna Hi Trap Heparin HP, basándonos en que Clp tiene un punto isoeléctrico de 8.92 y que la heparina imita la estructura polianiónica del ácido nucleico por lo tanto tiene la capacidad de interaccionar con proteínas de unión a ADN^{18,22}.

Clp de *X. axonopodis* eluyó a una concentración entre 600mM y 700mM de KCl, cómo se puede ver en el cromatograma obtenido en el equipo AKTA-FPLC (GE Healthcare) y lo cual fue corroborado con SDS-PAGE (Fig. 5). Se hizo la cuantificación de estas fracciones colectadas, mediante el reactivo de Bradford y el rendimiento final de Clp de *X. axonopodis* de esta purificación fue de 3.34mg/L. Se observó que la proteína estaba pura por lo que éste fue el último paso de purificación, para después ser cambiada al amortiguador que contiene Tris-HCl 25mM pH 7.5, Glicerol 15%, KCl 300mM, LiCl 25mM, β -mercaptoetanol 1mM con el uso de la columna sephadex g-25 PD10 (GE Healthcare), y en seguida se concentró la proteína hasta 10mg/ml para posteriormente hacer ensayos de cristalización.

Formación del Complejo Clp-ADN

El complejo Clp-ADN se formó con la proteína recombinante de Clp de *X. axonopodis* y la secuencia consenso del sitio de unión a ADN de CAP. En el laboratorio contamos con dos secuencias de ADN; 17-mer (5'ATTTTCGAAAATTGTGAT) y 19-MER (5'CTAGATCACAATTTTCGAAAT); el "annealing" del ADN de 38 pares de bases se ejecutó en el termociclador Bio-Rad, en una rampa de 95°C a 20°C, haciendo por duplicado este protocolo. Como resultado, se obtuvo una secuencia palindrómica de doble cadena:

5'ATTTTCGAAAATTGTGAT|CTAGATCACAATTTTCGAAAT3'
3'TAAAGCTTTTAACTAGATC|TAGTGTTAAAAGCTTTA5'

La proporción proteína:ADN utilizada fue de 1:1.5 y éste complejo se concentró hasta 10mg/ml para colocar ensayos de cristalización

Ensayos de Cristalización

La técnica usada para los ensayos de cristalización fue la de difusión de vapor en gota sentada. Esta sección de ensayos de cristalización está formada por dos apartados, el primero de ellos son los ensayos hechos solo a la proteína recombinante colocando un total de 374 condiciones y en el segundo al complejo Clp-ADN del cual se colocó un total de 550 condiciones para propiciar la cristalización de este complejo.

Las condiciones en donde se observó la formación de cristales para apoClp (Tabla III) se repitieron con reactivos del laboratorio para evaluar diferentes relaciones proteína:precipitante o bien se agregaron aditivos sugeridos por Hampton Research al precipitante (Tabla IV).

De los cristales que crecieron, se seleccionaron las mejores condiciones, con base en el tamaño, forma y definición del cristal, ésta fue la 31 del kit de Morpheus 1, la cual está compuesta de la siguiente forma: 0.09M NPS (Nitrate Phosphate Sulfate), 0.1M Sistema de buffer 2 (HEPES y MOPS) pH7.5, 50% v/v mezcla del precipitante 3 (Glicerol y PEG 4000). Los cristales que se formaron con este precipitante pueden observarse en la Fig. 6, uno de estos cristales difractó y se obtuvo una colección de datos a 2.6 Å de resolución.

Con respecto a la formación de cristales del complejo Clp-ADN, se obtuvieron un total de 19 cristales, de doce condiciones distintas (Tabla III), en dos formas características; por un lado en forma de agujas y por el otro en forma tetragonal similares a los obtenidos de apoClp (Fig. 6). Se observó que como común denominador en estas doce condiciones se tenía el sulfato de amonio, por lo que se decidió colocar gotas con reactivos de laboratorio usando sulfato de amonio y los aditivos mencionados en la tabla VI, se obtuvieron seis condiciones en las que creció el cristal (Tabla III). De los 19 cristales obtenidos, se seleccionaron los de mayor tamaño y mejor forma y se enviaron a difracción de rayos X en el LANEM; sin embargo, ninguno de ellos fue de la calidad suficiente para poder brindar un patrón de difracción que pueda resolverse. Hasta el momento en el que se redacta la presente tesis no se ha podido reproducir ninguna condición que brinde cristales de mejor tamaño para difractar de nuevo.

Determinación de la estructura de Clp

La colecta de los datos de difracción de rayos-X se realizó a 100 K (-173°C) para poder reunir la mayor cantidad de datos de un solo cristal (Fig. 6). El método para la colección de los datos de difracción fue el de rotación, este método colecta los datos de difracción mientras el cristal es rotado con pequeños incrementos, en nuestro caso éstos incrementos fueron de 0.25 grados, se colectaron tres series de datos del mismo cristal de 180, 90 y 180 grados (1800 oscilaciones). Es importante mencionar que durante este proceso el cristal fue bañado constantemente con nitrógeno, con la finalidad de reducir las vibraciones térmicas, reducir el desorden y el daño por radiación, así mismo nos permitió una reducción de datos más precisa. El patrón de difracción obtenido tuvo una resolución de 2.6Å.

El primer paso de la resolución de la estructura fue el indexado, que se realizó con el software HKL3000²³, mediante el cual se asignaron los índices de Miller a las reflexiones observadas; esta indexación nos permitió determinar que los cristales pertenecían a un sistema cristalino monoclinico cuyo grupo espacial asignado es

P12₁1, las dimensiones de la celda unitaria: a= 67.613 Å, b=67.888 Å, c=108.817 Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 103.649^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ y 48.6% de contenido de solvente.

El grupo espacial corresponde a un sistema monoclinico en el cual los ejes cristalográficos α y γ son igual a 90° .

Los datos se analizaron con el programa xtriage de la plataforma de PHENIX²⁴. El análisis mostró un coeficiente de Matthews de $2.57 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, un factor B de Wilson de 28.8218 y un pico máximo de la función de Patterson de 7.06% no detectándose una pseudotranslación significativa. El análisis de twinning mostró un valor I/I de 0.414 (El valor de 0.5 para no twinning y 0.375 para un twinning perfecto) lo que indica que no hay una significancia estadística para twinning.

El problema de fases fue resuelto por remplazo molecular (MR), cómo modelo de búsqueda se utilizó la estructura de Clp de *Xanthomonas campestris* (PDB: 3iwz) en el programa de PHASER²⁵.

Se obtuvo un LLG final de 5200, en cuanto a la función de rotación (RFZ) y la de traslación (TFZ) mostró valores de 11.3 y 8.8 respectivamente; con 897 residuos en la unidad asimétrica (ASU). Se detectaron dos dímeros por celda unitaria. Valores para TFZ mayores a 5 generalmente indican una buena solución para el modelo.

El refinado cristalográfico se realizó con phenix.refine, con los siguientes parámetros, refinado cartesiano estándar con las coordenadas XYZ, uso del espacio real (usa como objetivo el mapa de densidad de electrones), también se usó refinamiento de cuerpo rígido "rigid-body"²⁶ (refina la posición de regiones definidas, sin cambiar la geometría); cómo función objetivo se usó ML (Máxima verosimilitud), estas estrategias fueron ejecutadas con restricciones de simetría no cristalográfica (NCS). El ajuste del modelo se hizo de forma manual, usando Coot²⁷ (Fig. 7). Sólo en el caso del primer refinado se realizó un protocolo de templado molecular o "simulated annealing"; este algoritmo realiza una búsqueda estocástica dentro de la región permitida para las variables de optimización. Este proceso consiste en "simular" un sobrecalentamiento de tal forma que las partículas del cristal se colocan al azar en la fase líquida, para después disminuir la temperatura de forma gradual y lenta hasta que las partículas se organicen con

un coste bajo de energía a un estado estacionario en el que no ocurran cambios, con el objetivo de que solidifique en una estructura cristalina perfecta.

Algunas regiones de la molécula tuvieron una densidad pobre, con un factor B de 60 A 85 Å², comparado con el promedio observado para todos los átomos que es de 36.45 Å², lo que indicó que es una zona de elevada movilidad. Esta zona de baja densidad coincide con la reportada por Chin y colaboradores como la zona en la que los residuos (177 a 182) participan en la unión del péptido C-terminal de la ARN polimerasa.

El refinamiento se hizo en rondas, cada una de 7 ciclos y tras varias rondas de refinamiento y ajuste manual, se obtuvo un $R_{\text{free}}=0.2750$ y $R_{\text{work}}= 0.2175$ y un RMS (bonds) de 0.009. Otros estadísticos de refinamiento se presentan en la Tabla VI.

Para comprobar la validez y calidad de la estructura terciaria obtenida se utilizó el servidor en línea MolProbity²⁸, el cual hace un análisis de validación de la estructura, primero detecta si el archivo contiene una cantidad adecuada de átomos H, de lo contrario brinda la opción de adicionarlos; una vez adicionados los átomos se hace el análisis de la geometría y contacto de todos los átomos, detecta si hay choques estéricos serios (clashscore, donde los átomos se solapan más de 0.4 Å), también informa el porcentaje de residuos con rotámeros pobres, valores atípicos de Ramachandran así como conformaciones favorables del mismo, valores atípicos de la longitud de cadena principal, desviación atípica del C^β y el ángulo de enlace (análisis de geometría covalente) y éstos valores detectados los muestra en el reporte kinemage en un código de colores tipo semáforo e identificando el residuo involucrado en el error, posteriormente fueron corregidos con COOT de forma manual²⁸.

Como resultados de esta validación obtuvimos 0.36% de rotámeros pobres (aquellos que poseen problemas en la rotación de sus cadenas laterales sobre el esqueleto peptídico), 86.18% de rotámeros favorecidos, 97.8% del total de los residuos se encontraron en regiones favorecidas y el 100% del total de los residuos estuvieron en regiones permitidas. Con un clashscore de 8.5 y MolProbity score de 1.49 éste último es una combinación logarítmica ponderada del clashscore, el porcentaje de Ramachandran no favorecido y el porcentaje de

malos rotámeros de la cadena lateral, brindando un número que refleja la resolución cristalográfica en la que se esperarían estos valores. Los resultados de esta validación se muestran en la Tabla VI.

Estructura de Clp

Clp tuvo una estructura dimérica como la de otros miembros de la familia CRP. El mapa de densidad electrónica permitió observar claramente los residuos del 15 al 229 de cada monómero de Clp (Fig. 7) a excepción de los residuos ubicados en la zona que hacen contacto con la RNA polimerasa (del residuo 177 al 183), correspondientes a la zona AR1 en CAP^{29,30}. Aun después de varios refinamientos esta zona permaneció con casi nula densidad electrónica, posiblemente debido a su flexibilidad.

El dominio N-terminal consistió en ocho hebras beta antiparalelas flanqueadas por dos hélices α . El dominio C-terminal en tres alfa hélices y cuatro hebras β antiparalelos, en esta zona se encontró el característico hélice giro hélice presente en proteínas de unión a ADN compuesto por la α hélice de los residuos 190 al 197 y la hélice α de los residuos 201 al 213 conectados por el loop de los residuos 198 al 200.

Cómo se mencionó anteriormente en la proteína *EcCAP* el residuo S84 es crucial en el posicionamiento de su ligando cAMP; sin embargo, para la proteína Clp el residuo correspondiente fue el E99 el cual interactúa con R150 (3.63 Å) un residuo de carga negativa que impide que se una cAMP en esta zona, formando un puente salino, lo que corrobora que éste segundo mensajero no tiene un sitio de unión como se observa en CAP, por lo que el mecanismo de regulación de Clp es diferente al de CAP, y explica por qué cAMP no tiene efecto en la patogenicidad de *X. campestris*. (Fig. 7).

Con respecto al sitio de unión con ADN dos requerimientos deben de ser cumplidos, el primero de ellos es que exista un acercamiento entre las hélices α C y α D para que esto genere que se empuje la hélice α F y como segundo requerimiento es que esta hélice α F cuente con un residuo abultado e hidrofóbico interactúe con la cadena de ADN. En la estructura de Clp esto se cumplió, porque

el residuo D162 formó dos puentes de hidrógeno con la cadena lateral del residuo D159 provocando un acercamiento entre las hélices αC y αD ; así el residuo V165 al ser abultado a hidrofóbico empuja y orienta la hélice αF para una mejor interacción con el ADN (Fig. 7).

Un alineamiento de las secuencias de Clp de *X. campestris* y de *X. axonopodis* mostró que son cuatro los residuos sustituidos entre ambas especies. Mientras que XcClp presentó los residuos L, T, R y S en las posiciones 2, 21, 132 y 172, XaClp presentó los residuos P, A, K, y A en las mismas posiciones. Sin embargo, los residuos mencionados presentaron la misma estructura que la observada en Clp de *campestris*, con un RMSD para la superposición global de ambas estructuras de 0.681Å (Fig. 1).

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte de la estructura cristalográfica de Clp de *Xantomonas axonopodis*, en el cual se tomaron las siguientes consideraciones: para conservar la solubilidad y estabilidad de esta proteína recombinante fue importante mantener una concentración de KCl en el amortiguador por arriba de 150mM. La purificación por afinidad a heparina brindó un rendimiento final de 3.34mg/L. Clp de *X. axonopodis* al igual que su homólogo en *X. campestris* formó homodímeros, y presenta el motivo HTH característico de la familia CRP; ésta estructura posee una zona muy flexible, correspondiente a la zona de unión con el péptido C-terminal de la ARN polimerasa. Clp de *X. axonopodis* posee cuatro residuos diferentes en comparación con su homólogo *X. campestris* y presenta un RMSD de 0.681Å en un alineamiento estructural. A pesar de la similitud con su homólogo CAP, se propone que Clp tiene un sitio de unión diferente a su ligando alostérico (c-di-GMP), debido a que E99 es un aminoácido de mayor tamaño en comparación con el residuo S84 de CAP, que junto con el residuo R150 forman un puente salino que ocupa la cavidad de unión a AMP cíclico que se observa en CAP.

Tabla I. Condiciones evaluadas en el ensayo de estabilidad térmica

	Compuesto	Concentración	Tm (°C)
	Proteína sin aditivo	---	54.9
Amortiguadores	Tris pH 8.0	25 mM	55.7
		50 mM	54.0
		75 mM	54.4
		100 mM	54.4
	Tris pH 8.5	25 mM	54.4
		50 mM	54.4
		75 mM	53.7
	Hepes pH 7.5	100 mM	54.1
		25 mM	55.6
		50 mM	55.4
		75 mM	55.3
	Hepes pH 8.0	100 mM	55.5
		25 mM	55.1
		50 mM	55.0
		75 mM	54.8
	MOPS pH 6.5	100 mM	55.3
		25 mM	56.1
		50 mM	55.1
	MOPS pH 7.0	75 mM	55.3
		100 mM	56.0
		25 mM	55.6
	MES pH 5.5	50 mM	55.0
		75 mM	55.4
		100 mM	55.6
		25 mM	55.6
	MES pH 6.0	50 mM	54.5
		75 mM	53.8
		100 mM	55.0
25 mM		55.2	
Sales	NaCl	50 mM	54.6
		75 mM	55.4
		100 mM	55.1
		100 mM	54.1
		150 mM	55.1
		250 mM	54.8
		300 mM	55.5
		500 mM	56.7
	KCL	600 mM	57.0
		750 mM	57.4
		1 M	58.7
		100 mM	54.9
		150 mM	54.5
		250 mM	54.3
		300 mM	55.4
500 mM	56.2		
600 mM	56.3		
750 mM	58.2		
1 M	57.9		

	Compuesto	Concentración	Tm (°C)		
Sales	LiCL	25 mM	56.1		
		50 mM	55.9		
		75 mM	55.0		
		100 mM	54.8		
	MgCL	25 mM	54.0		
		50 mM	52.9		
		75 mM	53.3		
		100 mM	53.1		
		Agentes reductores	DTT	1 mM	55.3
				2 mM	54.6
3 mM	54.5				
5 mM	54.4				
7 mM	54.6				
10 mM	54.5				
Beta-Mercaptoetanol (BME)	1 mM		56.3		
	2 mM		54.9		
	3 mM		55.7		
	5 mM		55.9		
	7 mM	55.7			
aminoácidos, amino azucres	Glucosamina	10 mM	56.3		
		1 mM	55.8		
		5 mM	56.2		
	Glicina	10 mM	55.9		
		1 mM	55.6		
		5 mM	54.7		
	Prolina	10 mM	54.7		
		10 mM	54.3		
		50 mM	55.4		
	Ácido Glutámico	10 mM	54.3		
		50 mM	53.1		
		10 mM	50.1		
	L-Arginina	10 mM	50.1		
		50 mM	52.5		
	Quelantes y detergentes	EDTA	1 mM	54.2	
5 mM			54.4		
10 mM			53.7		
Glicerol		5%	56.4		
		10%	58.0		
		15%	57.2		
		20%	60.0		

Tabla II. Condiciones evaluadas en el segundo ensayo de estabilidad

térmica

	Compuesto	Tm (°C)
Amortiguadores	Tris pH7.5, 25 mM	54.7
	MOPS pH 6.5, 25 mM	55.8
	HEPES pH 7.0, 25 mM	55.9
Aditivos	Glicerol, 15%	59.1
	KCl 500 mM	55.0
	LiCl 25mM	56.1
	Beta mercapto 1mM	54.7
Mezcla de amortiguador con todos los aditivos	Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM y BE-ME 1mM	60.8
	MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM y BE-ME 1mM	60.8
	HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM y BE-ME 1mM	60.6
Amortiguador mas un aditivo	Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%	58.7
	MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%	59.0
	HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%	59.5
	Tris pH 7.5 25mM, KCl 500mM,	55.7
	MOPS pH 6.5 25mM, KCl 500mM,	55.7
	HEPES pH 7.0 25mM, KCl 500mM,	55.9
	Tris pH 7.5 25mM, LiCl 25mM	55.4
	MOPS pH 6.5 25mM, LiCl 25mM	56.1
	HEPES pH 7.0 25mM, LiCl 25mM	56.6
	Tris pH 7.5 25mM, BE-ME 1mM	55.9
	MOPS pH 6.5 25mM, BE-ME 1mM	56.5
	HEPES pH 7.0 25mM, BE-ME 1mM	57.2
	Amortiguador mas dos aditivos	Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM
MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM		60.3
HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM		60.4
Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15% , BE-ME 1mM		58.2
MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15% , BE-ME 1mM		58.6
HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15% , BE-ME 1mM		59.1
Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%, LiCl 25mM		58.7
MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%, LiCl 25mM		55.9
HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%, LiCl 25mM		58.5
Tris pH 7.5 25mM, KCl 500mM, LiCl 25mM		54.2
MOPS pH 6.5 25mM, KCl 500mM, LiCl 25mM		56.8
HEPES pH 7.0 25mM, KCl 500mM, LiCl 25mM		55.1
Tris pH 7.5 25mM, KCl 500mM, BE-ME 1mM		52.9
MOPS pH 6.5 25mM, KCl 500mM, BE-ME 1mM	56.5	
HEPES pH 7.0 25mM, KCl 500mM, BE-ME 1mM	56.1	
Amortiguador mas tres aditivos	Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM	62.0
	MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM	61.7
	HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM	60.6
	Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%, LiCl 25mM y BE-ME 1mM	57.7
	MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%, LiCl 25mM y BE-ME 1mM	58.3
	HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%, LiCl 25mM y BE-ME 1mM	58.6
	Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM y BE-ME 1mM	60.9
	MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM y BE-ME 1mM	60.6
HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM y BE-ME 1mM	56.9	

Clp de *X. axonopodis* se incubó en presencia del fluoróforo SYPRO orange. La prueba de desplazamiento térmico se hizo en un rango de 25° a 95°C y los datos de fluorescencia emitida fueron procesados en Excel ajustándolos a la ecuación de Boltzman usando el complemento Solver para obtener la Tm (melting temperature).

Tabla III. Condiciones en las que crecieron cristales de Clp Xac y Clp-ADN

No.	Tipo de proteína	Características del precipitante	[Proteína]	Proporción Proteína : Precipitante	Matriz	Vol. Gota
1	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 1 pH 6.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-26	2µL
2	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 1 pH 6.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	2:1	Morpheus 1-26	2µL
3	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 1 pH 6.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-27	2µL
4	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-30	2µL
5	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	2:1	Morpheus 1-30	2µL
6	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-31	2µL
7	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	2:1	Morpheus 1-31	2µL
8	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-34	2µL
9	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	2:1	Morpheus 1-34	2µL
10	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-35	2µL
11	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	2:1	Morpheus 1-35	2µL
12	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 4	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-36	2µL
13	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	0.4:1.6	Morpheus 1-31	3µL
14	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	0.6:1.4	Morpheus 1-31	3µL
15	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	0.8:1.2	Morpheus 1-31	3µL
16	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-31	3µL
17	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1.2:0.8	Morpheus 1-31	3µL
18	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1.4:0.6	Morpheus 1-31	3µL
19	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	0.4:1.6	Morpheus 1-34	3µL
20	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	0.6:1.4	Morpheus1 34	3µL
21	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	0.8:1.2	Morpheus 1-34	3µL
22	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-34	3µL
23	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1.2:0.8	Morpheus 1-34	3µL
24	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1.4:0.6	Morpheus 1-34	3µL
25	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1.6:0.4	Morpheus 1-34	3µL
26	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	0.4:1.6	Morpheus 1-35	3µL

27	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	0.6:1.4	Morpheus 1-35	3µL
28	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	0.8:1.2	Morpheus 1-35	3µL
29	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-35	3µL
30	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1.2:0.8	Morpheus 1-35	3µL
31	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1.4:0.6	Morpheus 1-35	3µL
32	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.1 M Carboxylic acids, 0.1M Buffer System1 pH 6.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1:1	Morpheus 2-26	2µL
33	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.1 M Carboxylic acids, 0.1M Buffer System1 pH 6.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 2-27	2µL
34	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.1 M Carboxylic acids, 0.1M Buffer System2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 2-31	2µL
35	Clp <i>X.axonopodis</i>	0.1 M Amino acids, 0.1M Buffer System2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 4	10mg/ml	1:1	Morpheus 2-43	2µL
36	Complejo Clp-ADN	0.2 M sulfato monohidratado de litio, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 30%w/v PEG 4000	10mg/ml	1:1	Crystal Screen 1-17	2µL
37	Complejo Clp-ADN	0.2 M Acetato de sodio trihidrato, 0.1 M Cacodilato de sodio pH 6.5, 30%w/vPEG 8000	10mg/ml	1:1	Crystal Screen 1-28	2µL
38	Complejo Clp-ADN	2.0 M Sulfato de amonio	10mg/ml	1:1	Crystal Screen 1-32	2µL
39	Complejo Clp-ADN	0.2 M Sulfato de amonio, 0.1 M MES pH 6.5, 30% w/v PEG monoetileter 5000	10mg/ml	1:1	Crystal Screen 2-26	2µL
40	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 1 pH 6.5, 50% v/v Precipitant Mix 4	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-28	2µL
41	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 1	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-29	2µL
42	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-30	2µL
43	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 3	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-31	2µL
44	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 2 pH 7.5, 50% v/v Precipitant Mix 4	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-32	2µL
45	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 1	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-33	2µL
46	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-34	2µL
47	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 4	10mg/ml	1:1	Morpheus 1-36	2µL
48	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 1	20mg/ml	1:1	Morpheus 1-33	2µL

49	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	20mg/ml	1:1	Morpheus 1-34	2µL
50	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 4	20mg/ml	1:1	Morpheus 1-36	2µL
51	Complejo Clp-ADN	2.0 M Sulfato de amonio	20mg/ml	2:1	reactivos Lab-9	2µL
52	Complejo Clp-ADN	2.0 M Sulfato de amonio, aditivo F11 (Hampton Research)	15mg/ml	1:1	reactivos Lab-9	2µL
53	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 1	15mg/ml	1:1	reactivos Lab-9	2µL
54	Complejo Clp-ADN	0.09 M NPS, 0.1 M Buffer System 3 pH 8.5, 50% v/v Precipitant Mix 2	15mg/ml	1:1	reactivos Lab-9	2µL

Tabla que contiene el listado de los ensayos de cristalización, en los cuales se observó el crecimiento de cristales. Para el caso de la proteína recombinante Clp de *Xanthomonas axonopodis* se colocaron 374 condiciones, de las cuales 35 mostraron crecimiento de cristales. Para el complejo Clp-ADN se hicieron un total de 550 condiciones de las cuales sólo 16 mostraron desarrollo de cristales. Dentro de estos ensayos se hicieron cambios de proporción proteína: precipitante, así como la reproducción de las soluciones precipitantes, con reactivos del laboratorio.

Tabla IV. Aditivos usados para optimizar las condiciones de cristalización.

ID Hampton Research	Concentración stock	Aditivo	Concentración en la gota
A3	0.1 M	Cloruro de Calcio dihidratado	0.01 M
A6	0.1 M	Cloruro de Magnesio hexahidratado	0.01 M
A12	0.1 M	Sulfato de Níquel (en lugar de cloruro de Níquel)	0.01 M
B3	1.0 M	Sulfato de Amonio	0.1 M
B5	0.1 M	Cloruro de Litio	0.01 M
B10	1.0 M	Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado	0.1 M
B11	1.0 M	Citrato de sodio tribásico dihidratado	0.1 M
C2	0.1 M	L-Prolina	0.01 M
C4	30% v/v	Dimetil sulfóxido	3.0%
C10	1.0 M	Glicina	0.1 M
D2	0.1 M	Spermidine	0.01 M
D7	1.0 M	Hidrocloruro de guanidinio	0.1 M
D8	0.1 M	Urea	0.01 M
E1	0.1 M	EDTA	0.01 M
E5	10%v/v	PEG 3350	1.0%
E7	30% v/v	Sucrosa	3.0%
F2	30% v/v	Glicerol	3.0%
F11	5% w/v	n-octyl- β -D-glucoside	0.5%
G4	50% v/v	PEG 400	5.0%
G8	40% v/v	PEG 400	4.0%
G10	30% v/v	Etanol	3.0%
G11	30% v/v	2-propanol	3.0%
G12	30% v/v	Metanol	3.0%
H4	40% v/v	acetonitrilo	4.0%
H8	40% v/v	Acetona	4.0%
H10	7% v/v	1-butanol	0.7%
NA	0.1 M	L-Prolina, L-ac. glutámico, L-arginina	0.01M
NA	0.1 M	L-ac. glutámico	0.01M
NA	0.1 M	L-arginina	0.01M

*NA= No aplica

Listado de aditivos usados con la intención de obtener cristales de mayor tamaño o mejor definición. Se tomaron del listado de aditivos que proporciona Hampton Research en su Additive Screen. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada y filtradas a través de una membrana de 0.2 micras.

Tabla V. Datos cristalográficos y estadísticos de la recolección de datos y refinamiento.

	Clp <i>Xanthomonas axonopodis</i>
X-ray source	LANEM (UNAM)
Wavelength (Å)	1.8
Resolution range (Å)	33.71 - 2.571 (2.663 - 2.571)
Space group	P 1 21 1
Unit cell (Å)	a = 67.613, b = 67.888, c = 108.817, $\alpha = 90, \beta = 103.649, \gamma = 90$
Matthews coefficient (Å ³ Da ⁻¹)	2.57
Solvent content	48.6
Unique reflections	30017 (2461)
Completeness (%)	97.55 (80.65)
Mean I/sigma(I)	20.8 (5.3)
Wilson B-factor	32.98
Clp protomers per asymmetric unit	4
Reflections used in refinement	30010 (2459)
Reflections used for R-free	1992 (154)
R-work	0.2175 (0.2756)
R-free	0.2750 (0.3748)
Number of non-hydrogen atoms	5994
macromolecules	5994
Protein residues	842
RMS(bonds)	0.009
RMS(angles)	1.36
Ramachandran favored (%)	97.84
Ramachandran allowed (%)	2.16
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	0.36
Clashscore	8.35
Average B-factor	36.45
macromolecules	36.45

Datos estadísticos del estudio de difracción de rayos X de los cristales de Clp. Los cuales están formados por celdas de unidad triclinica, cada una de ellas contiene 4 moléculas. Los valores que se encuentran en paréntesis corresponden a la mayor resolución.

Tabla VI. Datos estadísticos de validación por MolProbity.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	8.35		99 th percentile* (N=226, 2.571Å ± 0.25Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	2	0.36%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	474	86.18%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	816	97.84%	Goal: >98%
	MolProbity score [^]	1.49		100 th percentile* (N=6188, 2.571Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 6081	0.00%	Goal: 0%
	Bad angles:	5 / 8280	0.06%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 29	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	8	0.97%	Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	0	0.00%	Goal: <0.5%

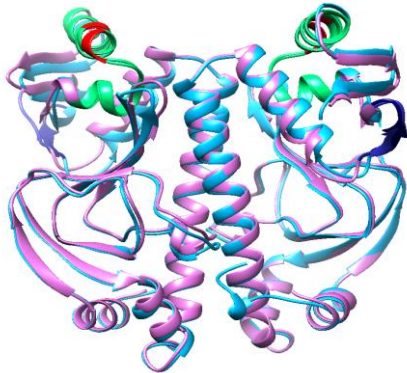
A) Clp Xax. 1 MSPGNTTVTTTTVRNATPSLALDAGTIERFLAHSRRRYPTRTDVFRPGDPAGTLYYVISGSVSI 65
 Clp Xca. 1 MSLGNTTVTTTTVRNATPSLTLDAGTIERFLAHSRRRYPTRTDVFRPGDPAGTLYYVISGSVSI 65

 Clp Xax. 66 IAEEDDDRELVLGYFGSGEFVGMGLFIESDTREVILRTRTQCELAEISYERLQQLFQTSLSPPDA 130
 Clp Xca. 66 IAEEDDDRELVLGYFGSGEFVGMGLFIESDTREVILRTRTQCELAEISYERLQQLFQTSLSPPDA 130

 Clp Xax. 131 PKILYAIGVQLSKRLLDTTRKASRLAFLDVTDRIVRTLHDLAKEPEAMSHPPQGTQLRVSRQELAR 195
 Clp Xca. 131 PRILYAIGVQLSKRLLDTTRKASRLAFLDVTDRIVRTLHDLAKEPEAMSHPPQGTQLRVSRQELAR 195

 Clp Xax. 196 LVGCSREMAGRVLKKLQADGLLHARGKTVVLYGTR 230
 Clp Xca. 196 LVGCSREMAGRVLKKLQADGLLHARGKTVVLYGTR 230

B)



C)

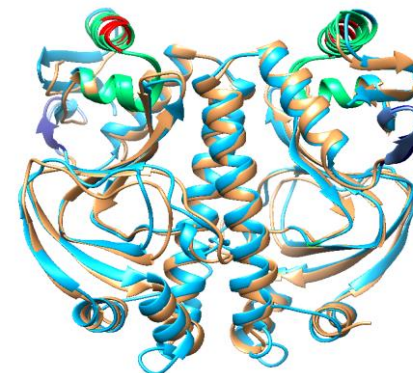


Fig. 1 Alineamiento de las secuencias de Clp tanto de *X. campestris* cómo de *X. axonopodis*.

A) Alineamiento de las secuencias de Clp de *X. axonopodis* (Clp Xax.) con *X. campestris* se puede observar que los residuos L3, T21, R132 y S172 de *X. campestris* corresponden a los residuos P3, A21, K132, A172 en *X. axonopodis*.

B) Comparación de las estructuras de Clp correspondientes a *X. axonopodis* (tonalidad azul) y *X. campestris* (tonalidad lila) con un RMSD de 0.681Å.

C) Comparación de las estructuras de Clp de *X. axonopodis* (tonalidad azul) con CAP de *E. Coli* (tonalidad café) con un RMSD de 1.109

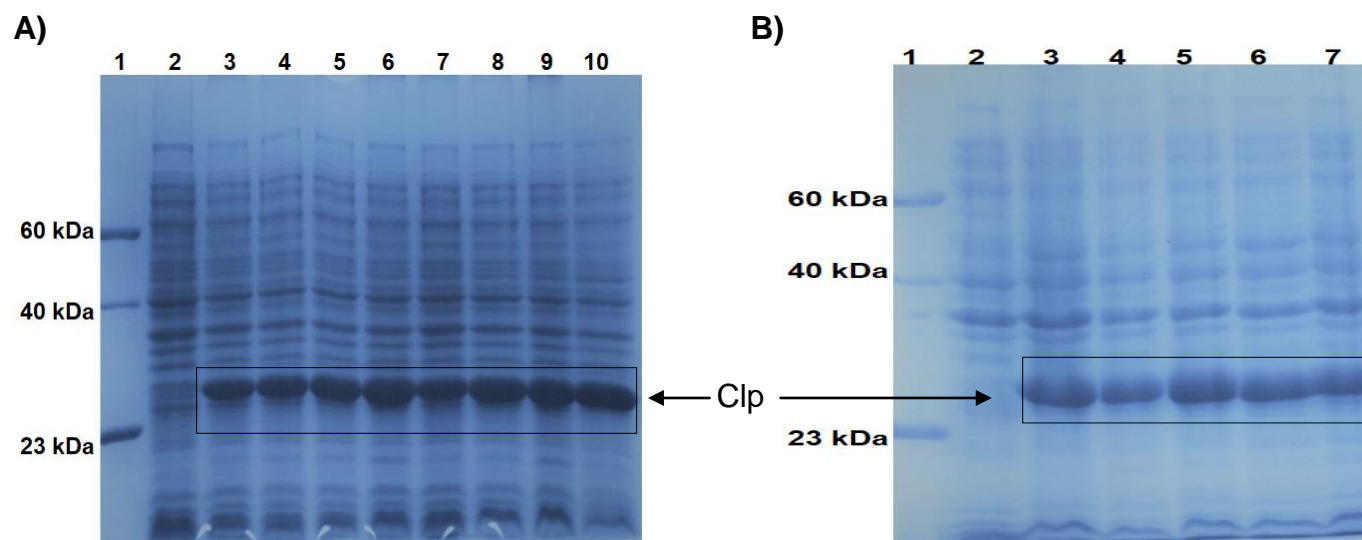
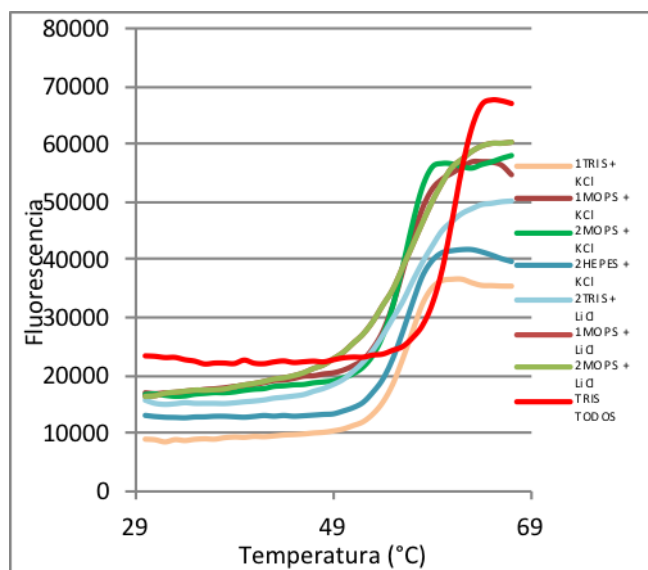


Fig. 2 Evaluación del tiempo de incubación y concentración de IPTG para la expresión de Clp en BL21 (DE3) Star

A) Gel SDS page al 12% de poliacrilamida en el cual se muestra la evaluación del tiempo y temperatura de incubación, con 0.2mM de IPTG para la expresión de Clp de *Xanthomonas axonopodis*. En el carril uno se encuentra el marcador de peso molecular, en el dos la muestra antes de la adición de IPTG. Del carril tres al seis se mantiene constante la temperatura a 37°C y se va variando el tiempo de incubación (2, 5, 8 y 16 horas); del carril siete al diez se usó una temperatura constante de 28°C y se variaron los tiempos de incubación (2, 5, 8 y 16 horas).

B) Gel SDS page al 12% de poliacrilamida de la evaluación de diferentes concentraciones de IPTG, para inducir la expresión de Clp de *Xanthomonas axonopodis*. En el carril uno se encuentra el marcador de peso molecular, en el dos la muestra antes de inducir con IPTG; del carril tres al siete se varia la concentración de IPTG adicionada, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mM respectivamente. Para después ser incubado a 28°C por 16 horas.



Condición	Tm
Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%	58.7 ± 0.02
MOPS pH 6.5 25mM, glicerol 15%	59.0 ± 0.01
HEPES pH 7.0 25mM, glicerol 15%	59.5 ± 0.21
Tris pH 7.5 25mM, KCl 500mM,	55.7 ± 0.20
MOPS pH 6.5 25mM, KCl 500mM,	55.7 ± 0.07
HEPES pH 7.0 25mM, KCl 500mM,	55.9 ± 0.06
Tris pH 7.5 25mM, LiCl 25mM	55.4 ± 0.51
MOPS pH 6.5 25mM, LiCl 25mM	56.1 ± 0.63
HEPES pH 7.0 25mM, LiCl 25mM	56.6 ± 0.08
Tris pH 7.5 25mM, BE-ME 1mM	55.9 ± 0.04
MOPS pH 6.5 25mM, BE-ME 1mM	56.5 ± 0.16
HEPES pH 7.0 25mM, BE-ME 1mM	57.2 ± 0.09
Tris pH 7.5 25mM, glicerol 15%, KCl 500mM, LiCl 25mM y BME 1mM	60.8 ± 0.15

Fig. 3 Ensayo de estabilidad térmica.

Evaluación de la estabilidad térmica de Clp de *Xanthomonas axonopodis*. El eje de las ordenadas corresponde a la fluorescencia y el eje de las abscisas a la temperatura en grados Centígrados. La condición optimizada que presenta una mejor Tm y ajuste a la ecuación de Boltzman fue la siguiente: Tris 25mM pH 7.5, glicerol 15%, KCl 500mm, LiCl 25mM y BME 1mM muestra una sigmoidea que se ajusta mejor a la ecuación de Boltzman y una Tm de 60.8±0.15.

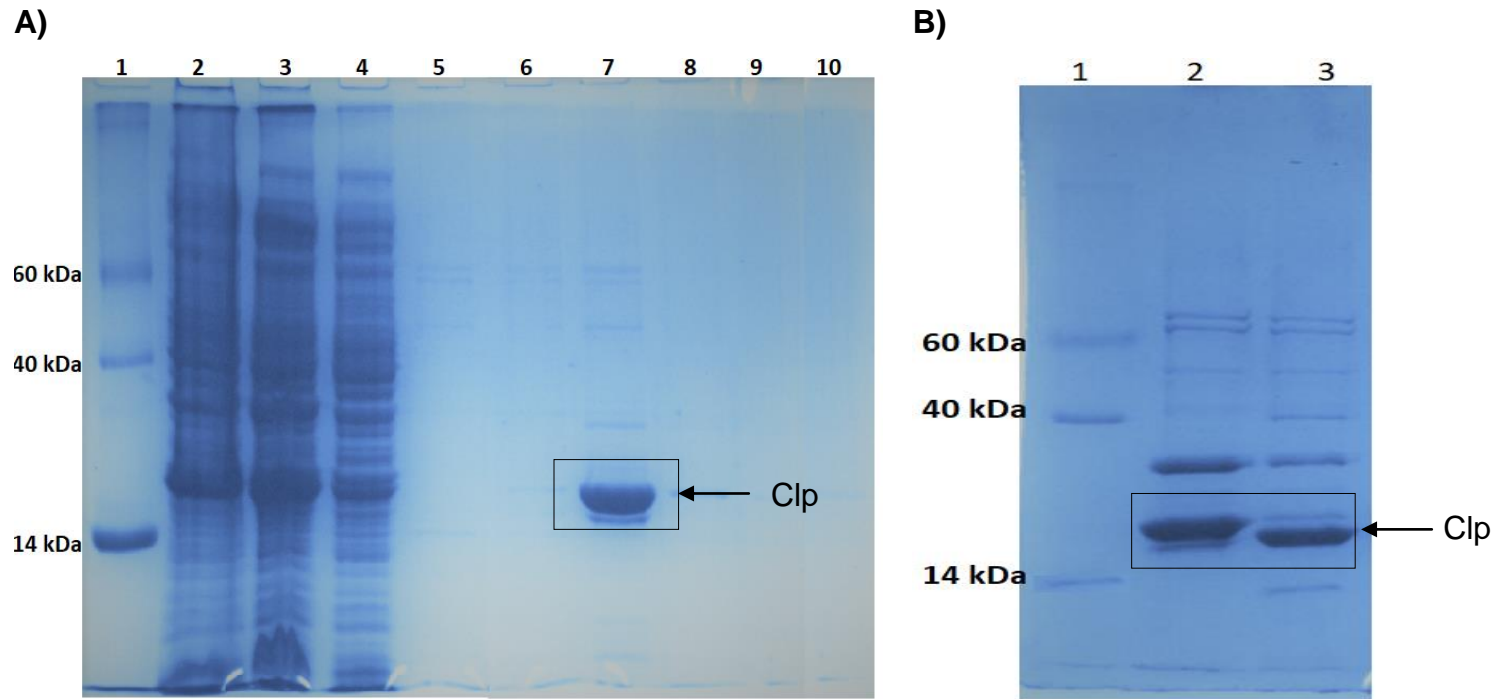


Fig. 4 Purificación de la proteína recombinante por afinidad a Níquel

A) Gel SDS page al 12% de poliacrilamida evaluando la purificación por afinidad a níquel, en una columna Ni-NTA de 5 ml. **Carril 1:** marcador de peso molecular. **Carril 2:** sonicado. **Carril 3:** centrifugado. **Carril 4:** frente. **Carril 5 y 6:** últimos lavados con 50mM de Imidazol. **Carril 7, 8, 9 y 10:** correspondientes a los lavados con 500mM de imidazol. La proteína recombinante eluye prácticamente en su totalidad en el primer lavado con 500mM de imidazol.

B) Gel SDS page al 12% de poliacrilamida en donde se observa el corte de la cola de histidinas, realizada por la adición de PPS a la proteína purificada previamente por afinidad a Níquel.

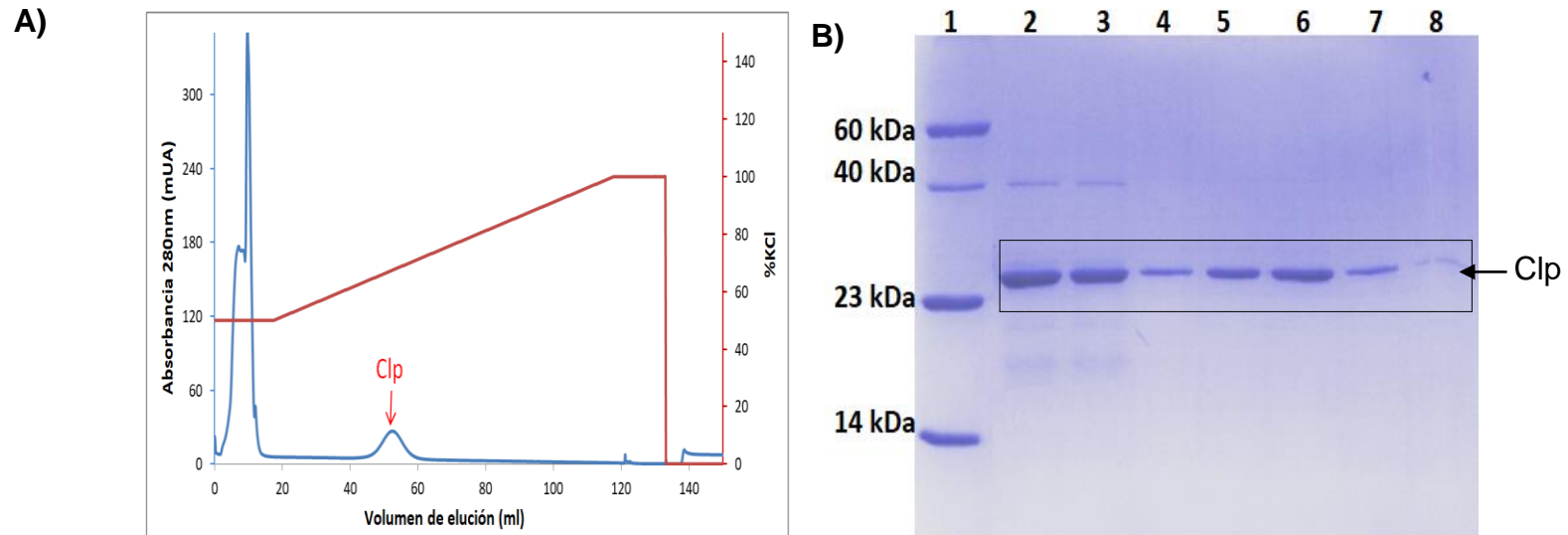


Fig. 5 Cromatografía de afinidad a Heparina

A) Cromatograma de la proteína Clp purificada en el equipo AKTA GE Healthcare, por afinidad a heparina en una columna Hi Trap Heparin HP 5ml, con el amortiguador A: Tris 25mM pH 7.5, Glicerol 15%, LiCl 25mM, Beta mercaptoetanol 1mM, el amortiguador B: Tris 25mM pH 7.5, Glicerol 15%, LiCl 25mM, Beta mercaptoetanol 1mM, KCl 1M. Se hace un gradiente de 50% de KCL a 100% de KCl. Las ordenadas corresponden a la absorbancia a 280nm y en las abscisas corresponden al volumen de elución. La corrida se hizo con un flujo de 2.0 ml/min, el volumen de inyección fue de 7.0 ml. La proteína eluye aproximadamente con 65% de KCL.

B) Gel SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida de la purificación por afinidad a heparina de la proteína Clp. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** Proteína que se cambió al amortiguador con 300 mM de KCl. **Carril 3:** Proteína filtrada a través de una membrana de 0.22 μ m. **Carril 4 al 8:** Fracciones colectadas que contienen a la proteína Clp de *Xanthomonas axonopodis* las cuales eluyeron en un rango de 600mM a 700mM de KCL.

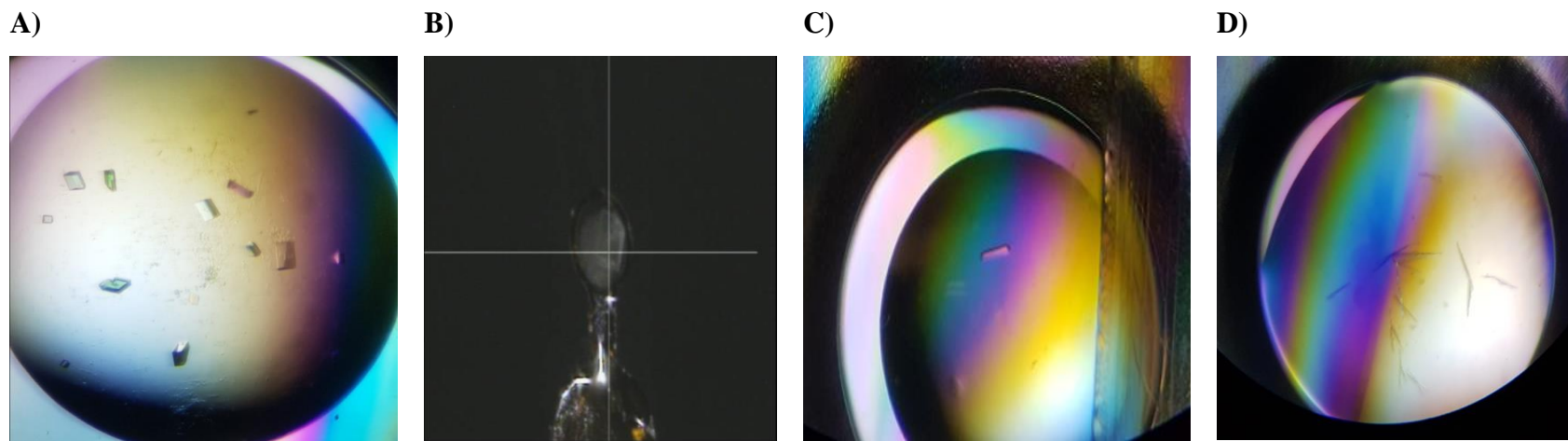


Fig. 6 Cristales de Clp de *Xanthomonas axonopodis*.

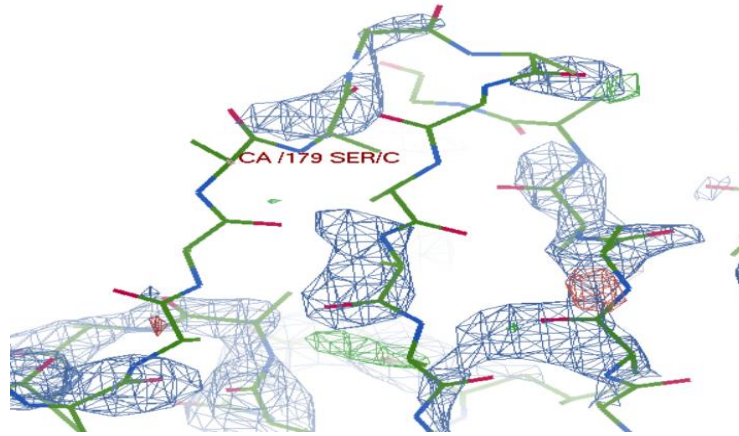
A) Cristales obtenidos en la condición 31 del kit de Morpheus 1 el cual tiene la siguiente composición: 0.09M de una mezcla de nitrato de sodio, fosfato dibásico de sodio y sulfato de amonio. Amortiguador: 0.1M de una mezcla de HEPES sódico y MOPS pH 7.5. Precipitante: 50% v/v de Glicerol y PEG 4000

B) Cristal colectado de la condición 31 del kit de Morpheus 1 y montado en el crioloop para la difracción de rayos X

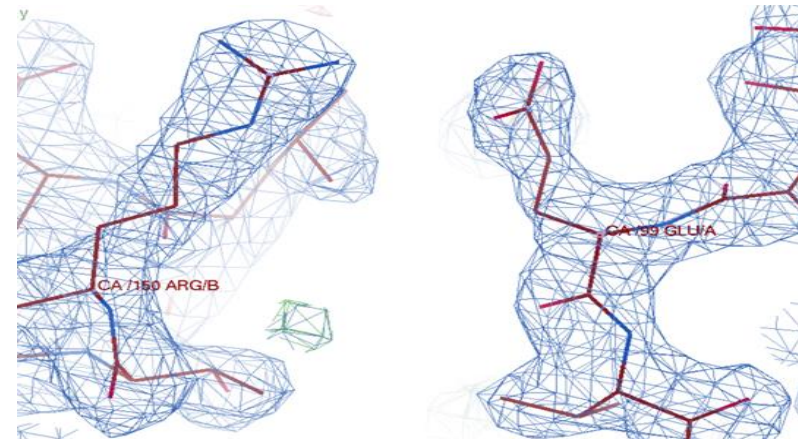
C) Cristales del complejo Clp-ADN de la condición 31 del Kit de Morpheus con la siguiente composición: 0.09M de una mezcla de nitrato de sodio, fosfato dibásico de sodio y sulfato de amonio. Amortiguador: 0.1M de una mezcla de HEPES sódico y MOPS pH 7.5. Precipitante: 50% v/v de Glicerol y PEG 4000

D) Cristales del complejo Clp-ADN de la condición 34 del Kit de Morpheus con la siguiente composición: 0.09M de una mezcla de nitrato de sodio, fosfato dibásico de sodio y sulfato de amonio. Amortiguador: 0.1M de una mezcla de Tris (base) y BICINE pH 8.5. Precipitante: 50% v/v de Etilenglicol y PEG 8000.

A)



B)



C)

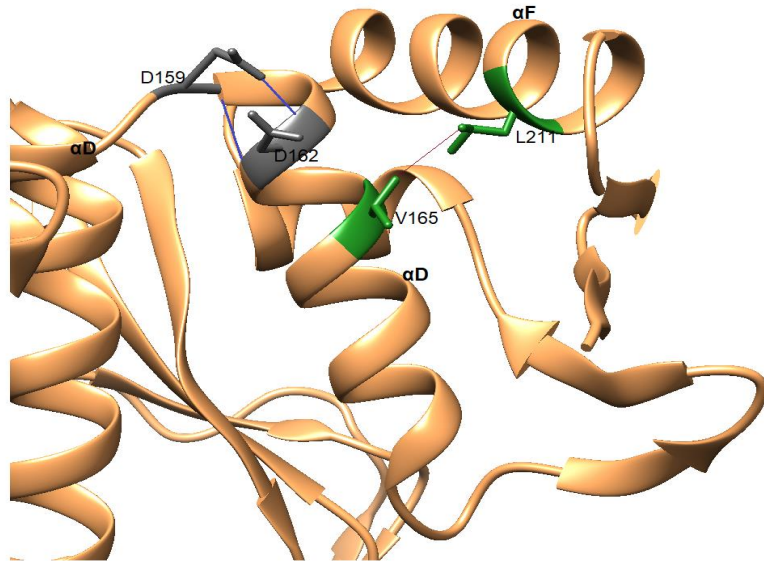
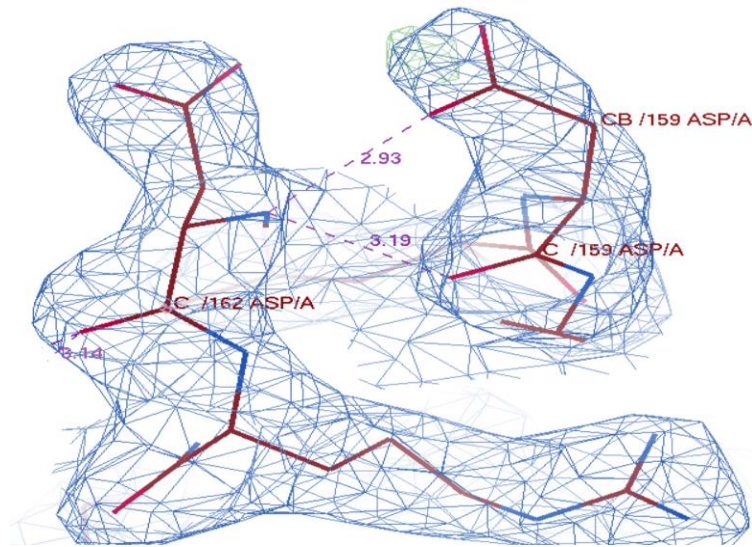


Fig. 7 Densidad electrónica en la estructura de Clp de *Xanthomonas axonopodis*

- A)** Zona de poca densidad ubicada entre los residuos del 178 al 183 (mapa 2 fobs-fcalc, contorno 1.5 veces por arriba de la desviación estándar).
- B)** Residuos E99 y R15 de cadena larga que ocupan el sitio de unión a AMPc observado en CAP eliminando la cavidad para que el ligando de Clp, c-di-GMP, interactúe en esta zona.
- C)** En la imagen de la izquierda se muestra el mapa de densidad electrónica (mapa 2 fobs-fcalc, contorno 1.5 veces por arriba de la desviación estándar) que muestra los dos puentes de hidrógeno entre los residuos D159 y D162, residuos importantes en la interacción con ADN. En la imagen de la derecha en tono gris se muestran los residuos D159 y D162, con los dos puentes de hidrógeno en líneas azules; esto provoca que el residuo V165 tenga interacciones hidrofóbicas (línea café) con el residuo L211 empujando de esta forma la hélice α F para su interacción con ADN.

Referencias

1. 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.
2. 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.
3. Ryan, R.P., Vorhölter, F.-J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.-A., Bogdanove, A.J., and Dow, J.M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 344–355.
4. Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Jiang, B. Le, He, Y.Q., Feng, J.X., Tang, J.L., and Dow, J.M. (2007). Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.* *63*, 429–442.
5. Solano, C., Echeverz, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* *18*, 96–104.
6. Fouhy, Y., Lucey, J.F., Ryan, R.P., and Dow, J.M. (2006). Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res. Microbiol.* *157*, 899–904.
7. Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 263–273.
8. He, Y.W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y.J.A., Wen, C.M., Wang, L.H., Liu, Z.D., Zhang, H.B., Dong, Y.H., Dow, J.M., et al. (2006). Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol. Microbiol.* *59*, 610–622.
9. 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.
10. He, Y.W., and Zhang, L.H. (2008). Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 842–857.

11. Ryan, R.P. (2013). Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiol. (United Kingdom)* 159, 1286–1297.
12. 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, 1–11.
13. Levy, C., Pike, K., Heyes, D.J., Joyce, M.G., Gabor, K., Smidt, H., Van Der Oost, J., and Leys, D. (2008). Molecular basis of halorespiration control by CprK, a CRP-FNR type transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.* 70, 151–167.
14. Chin, K.H., Lee, Y.C., Tu, Z. Le, Chen, C.H., Tseng, Y.H., Yang, J.M., Ryan, R.P., McCarthy, Y., Dow, J.M., Wang, A.H.J., 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.
15. 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.
16. Wood, T.K., and Peretti, S.W. (1991). Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *E. Coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 397–412.
17. Francis, D.M., and Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 1–29.
18. Xiong, S., Zhang, L., and He, Q.-Y. (2008). Fractionation of proteins by heparin chromatography. *Methods Mol. Biol.* 424, 213–221.
19. Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., and Weiss, M.S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69, 209–214.
20. Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., DeTitta, G.T., Dekker, N., and Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* 357, 289–298.
21. Pérez-Márquez, A., and Lara-González, S. (2016). Análisis estructural y

funcional de la proteína Clp de *Xanthomonas axonopodis*.

22. GE Healthcare (2007). *Affinity Chromatography: Principles and Methods*. GE Heal. Handbooks 159.
23. Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., and Chruszcz, M. (2006). HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution - From diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 62, 859–866.
24. Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221.
25. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.
26. Afonine, P. V, Urzhumtsev, A., and Adams, P.D. (2018). *Arbor*, Vol 191, No 772 (2015). 191, 1–11.
27. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
28. Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 12–21.
29. 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.
30. Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S. a, Helen, M., and Ebright, R.H. (2009). *Activation*. October 14, 10–20.
31. Passner, J.M., and Steitz, T. a (1997). The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2843–2847.