

Universidad Nacional de Rosario.
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



**“Estudio de la sobre-expresión y
topología de BlaR1 y MecR1 de
Staphylococcus aureus”**

Mihovilcevic, Damila

Tesis para optar al título de Licenciada en Biotecnología

Directora: Dra. Leticia I. Llarrull

2017

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi directora Leticia Llarrull, quien me brindó un lugar en su grupo de trabajo, me tuvo muchísima paciencia, demostró una plena confianza en mí a pesar de mis errores, me transmitió tanto sus conocimientos como su entusiasmo y pasión por su/nuestro trabajo. Además agradezco a quienes estuvieron codo a codo conmigo durante todo este tiempo, los “LL.L10”, Ildo, Lein y Lania, quienes hicieron de este trabajo una experiencia inolvidable, me brindaron todos sus conocimientos y apoyo, me llevo tres grandes amigos. A todas las chicas del Lab 10, que siempre me recibieron con una sonrisa. A todas aquellas personas que forman parte de la gran familia del IBR, que siempre que necesité algo estuvieron dispuestos a ayudarme. También agradezco a la Dra. D. Albanesi, al Dr. A. Viale, al Prof. S. Mobashery, por brindarme amablemente distintos materiales necesarios para la realización de este trabajo.

Sin lugar a dudas, quiero agradecer a mi familia que me apoyó durante todos estos años para que, una vez más, pueda cumplir uno de mis sueños, para que pueda llegar al objetivo por el cual tanto peleamos los cuatro. A la persona que hoy también se recibe de Biotecnólogo, el Bebu, quien no dudó un segundo de mí cuando hasta yo lo hice, quien no me permitió bajar los brazos jamás, quien fue mi apoyo incondicional y me brindó y brinda todos los días el amor más sincero. A toda la familia Botto, quienes se alegraron y festejaron mis logros, como si fuese una más. A mis amigas de toda la vida, las gordas, quienes se bancaron años enteros escuchando hablar de bacterias y se alegraron por mis logros. A todos los amigos que me dejó la facultad, las Vivoras, los Biolocos, las Julis y mi gran amiga de oro Florian, quienes siempre estuvieron presentes, con una juntada, una tarde de estudio, un mate, un abrazo. A todas aquellas personas que en algún momento estuvieron presentes durante estos largos y hermosos años, GRACIAS.

Finalmente, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Rosario, porque además de brindarme la mejor formación y educación, me permitió encontrarme con personas que jamás hubiese imaginado y descubrir, en la Cátedra de Química Orgánica, mi gran amor y pasión por la docencia.

NO PERMITAS QUE EL MIEDO A FRACASAR, TE IMPIDA JUGAR EL JUEGO.

Índice

1.	Abreviaturas	1
2.	Resumen	2
3.	Introducción	3
3.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	3
3.1.1.	Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos de MRSA.....	4
3.2.	Rol de la proteína sensora/transductora BlaR1	7
3.3.	Topología de la proteína de membrana sensora/transductora BlaR1 de <i>B. licheniformis</i>	11
3.4.	Estudio de la arquitectura de la proteína de membrana sensora/transductora MecR1.....	12
3.5.	Utilización de las proteínas Mistic y eGFP para la sobre-expresión de proteínas de membrana	15
4.	Objetivos	19
5.	Materiales y métodos	20
5.1.	Plásmidos	20
5.1.1.	Plásmidos pET24a(+) y pET41a(+).....	20
5.1.2.	Plásmido pET15b-mistic	21
5.2.	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	21
5.3.	Medios de cultivo.....	22
5.4.	Técnicas de biología molecular	22
5.4.1.	Purificación de ADN plasmídico.....	22
5.4.2.	Electroforesis en geles de agarosa.....	23
5.4.3.	Soluciones amortiguadoras	24
5.4.4.	Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	24
5.4.5.	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	24
5.4.6.	Reacciones de ligación	25
5.4.7.	Reacción de PCR	25
5.4.8.	PCR en colonia.....	26
5.4.9.	Secuenciación de ADN	27
5.5.	Preparación de células competentes.....	27
5.6.	Transformación de células competentes	28
5.7.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	28

5.8.	Ensayos de Western Blot	29
5.9.	Expresión y purificación de proteínas.....	31
5.9.1.	Crecimiento de cultivos y ensayos de expresión de proteínas	31
5.9.2.	Preparación de extractos de proteínas de membrana	32
5.9.3.	Ensayos de solubilización	32
5.9.4.	Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad	33
5.9.5.	Diálisis.	34
5.10.	Ensayos de topología.....	35
5.10.1.	Preparación de esferoplastos.	35
5.10.2.	Ensayo de susceptibilidad a Proteinasa K.....	35
5.10.3.	Ensayos de unión al antibiótico Bocilina-FL.	36
6.	Resultados y Discusión	37
6.1.	Evaluación de la expresión, purificación y topología de la proteína BlaR1JH1 como fusión a Mistic	37
6.1.1.	Construcción del plásmido pET41a(+)_H6x-mistic-TEV-blaR1JH1	37
6.1.2.	Evaluación de las condiciones de expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1 utilizando distintas cepas	39
6.1.3.	Evaluación de la densidad óptica óptima para la expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1	40
6.1.4.	Evaluación de la concentración óptima de inductor (IPTG) para la expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1.....	41
6.1.5.	Evaluación de la localización sub-celular de la proteína Mistic-BlaR1JH1	43
6.1.6.	Determinación de las condiciones de solubilización de Mistic-BlaR1JH1, a partir de preparaciones de membrana de <i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3)	44
6.1.7.	Purificación de la proteína Mistic-BlaR1JH1 mediante cromatografía de afinidad.....	45
6.1.8.	Puesta a punto del revelado de Western Blot empleando un anticuerpo secundario fluorescente	47
6.1.9.	Estudios de la topología de la proteína Mistic-BlaR1JH1 en esferoplastos de <i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3), empleando ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K y unión al antibiótico fluorescente Bocilina-FL..	49
6.2.	Evaluación de la expresión de las proteínas TM3BlaR1(E202A) y BlaR1(E202A) como fusión a Mistic.....	53
6.2.1.	Construcción de los plásmidos pET24a(+)_H6X-mistic-TEV-TM3blaR1(E202A) y pET24a(+)_H6X-Mistic-TEV-blaR1(E202A).	54

6.2.2. Evaluación de la expresión de las proteínas Mistic-TM3BlaR1(E202A) y Mistic-BlaR1(E202A).	58
6.3. Evaluación de la expresión de la proteína CytMecR1(E205A) como fusión a eGFP	62
6.3.1. Construcción del plásmido pET24a(+)_cytmecR1(E205A)-TEV-egfp-H6X. 62	
6.3.2. Evaluación de la expresión de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP... 65	
6.3.3. Evaluación de la localización sub-celular de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP.	67
7. Conclusiones.....	69
8. Referencias bibliográficas	70

1. Abreviaturas

Abs	Absorbancia
Amp ^R	Resistencia a Ampicilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
eGFP	Proteína Verde Fluorescente Potenciada (del inglés Enhanced Green Fluorescent Protein)
His-Tag o H6X	Secuencia de 6 Histidinas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kan ^R	Resistencia a Kanamicina
LB	Cultivo de lisogenia (del inglés Lysogeny Broth)
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina (del inglés Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
DO	Densidad Óptica
PBP	Proteínas de unión a penicilina (del inglés Penicillin Binding Proteins)
PBS	Solución amortiguadora fosfato salina (del inglés Phosphate Buffered Saline)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride)
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosido
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultravioleta
TM	Transmembrana
Lβ	Lámina β
λ	Longitud de onda

2. Resumen

Las proteínas BlaR1 y MecR1, están involucradas en la inducción de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). La función de estas proteínas está relacionada con la detección del antibiótico presente en el medio y la posterior transmisión de una señal hacia el interior celular, desencadenando la expresión de una β -lactamasa (PC1), a partir de la inducción del operón *bla*, responsable de la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos, y de una PBP de menor afinidad por los antibióticos β -lactámicos (PBP2a), expresada a partir de la inducción del operón *mec*. BlaR1 y MecR1 son posibles blancos para el diseño de inhibidores que puedan emplearse conjuntamente con los antibióticos β -lactámicos. Por lo tanto, en este proyecto pretendemos identificar los determinantes estructurales que dan lugar a la transducción de la señal en las proteínas MecR1 y BlaR1, dando lugar a la manifestación de resistencia.

Debido a la dificultad para lograr la sobre-expresión, solubilización y purificación de las proteínas BlaR1 y MecR1, actualmente se desconocen las estructuras cristalográficas de las mismas. Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluó la sobre-expresión de diferentes versiones de las proteínas BlaR1 y MecR1, fusionadas a otras proteínas de alta solubilidad o a otras proteínas de membrana. Se logró sobre-expresar la proteína BlaR1JH1, una versión trunca de la proteína BlaR1 que carece de las primeras tres hélices transmembrana, como fusión a la proteína Mistic. Se verificó su localización en membrana y se puso a punto la solubilización y purificación de la misma. Además, pudo demostrarse la localización extracelular del dominio sensor en esferoplastos de *E. coli* BL21StarTM (DE3). Podríamos decir, que se ha logrado por primera vez en diez años de trabajo, sobre-expresar en membrana una de las versiones más largas reportadas de la proteína BlaR1 y demostrar que posee un dominio sensor funcional. También, se ha logrado sobre-expresar la proteína CytMecR1 fusionada a eGFP y se ha verificado su inserción en membrana.

3. Introducción

3.1. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

La bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* es la principal causa de infecciones intra- y extra-hospitalarias^{1,2,3}. En el ambiente hospitalario, *S. aureus* es la causa más frecuente de infecciones quirúrgicas, de tracto respiratorio inferior, y cardiovasculares^{4,5}. Además, es la segunda causa más común de neumonía asociada a ambientes hospitalarios y de infecciones sanguíneas. Los antibióticos β -lactámicos han mostrado históricamente una potente actividad contra *S. aureus* lo cual, sumado a su baja toxicidad y alta tolerancia, los convierte en los agentes de elección para el tratamiento de infecciones causadas por estos organismos. Sin embargo, *S. aureus* presenta una elevada capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Las primeras cepas resistentes a la penicilina aisladas expresaban una β -lactamasa, capaz de inactivar al antibiótico. En 1969, un año después de la introducción del antibiótico β -lactámico meticilina (resistente a la hidrólisis por β -lactamasas) al tratamiento clínico de infecciones por *S. aureus* en Estados Unidos, se aislaron cepas resistentes al mismo. Las cepas se denominaron MRSA, por las siglas en inglés correspondientes a *S. aureus* resistente a meticilina. En los últimos años, la creciente prevalencia de infecciones intra- y extra-hospitalarias causadas por MRSA ha generado gran preocupación^{6,7,8,9}. MRSA es un problema creciente en América Latina, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad; ya es la principal causa de infecciones hospitalarias en América Latina, y el número de reportes de infecciones adquiridas en la comunidad está en aumento¹⁰. Las infecciones por MRSA en nosocomios han sobrepasado el 50%, en casi la mitad de los países en que se está realizando un seguimiento epidemiológico de la misma¹¹. MRSA constituye más del 50% de los aislamientos de la especie a nivel hospitalario en la región centro-este de Argentina, observándose un claro incremento también a nivel comunitario (MRSA-CA)^{12,13}. El MRSA-CA es hoy en día el agente etiológico identificable más frecuente en infecciones de piel y tejidos blandos^{12,14}.

El desarrollo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, generalmente concurrente con la adquisición de resistencia a otros agentes antibacterianos,

representa un gran desafío para la prevención y el tratamiento de infecciones por *S. aureus*¹⁵. La situación resulta más preocupante aún dado el extremadamente reducido número de nuevos compuestos en etapas avanzadas de desarrollo clínico para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes, incluyendo MRSA¹⁶. Las empresas farmacéuticas han reducido marcadamente su inversión en el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. En ese sentido, la comunidad científica, la industria en Estados Unidos y en Europa, están intentando unir esfuerzos para incrementar la inversión en la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos, dirigidos a nuevos blancos, o a los blancos tradicionales pero que sean capaces de eludir el mecanismo de resistencia ya existente¹⁷.

3.1.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos de MRSA

Los antibióticos β -lactámicos bloquean la síntesis de la pared celular bacteriana a través de la inhibición de la actividad transpeptidasa de las PBPs (por las siglas en inglés correspondientes a Proteínas de Unión a Penicilina). En particular, impiden la formación de puentes peptídicos entre hebras de glicanos adyacentes (*crosslinking*). *S. aureus* posee dos mecanismos primarios de resistencia a los antibióticos β -lactámicos: la expresión de la β -lactamasa, PC1, capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico, inactivándolo, y la adquisición del gen que codifica para una PBP, PBP2a, que presenta menor afinidad por estos compuestos y que por lo tanto, no es inhibida por concentraciones clínicas de los mismos¹⁸. PBP2a permanece activa en presencia de concentraciones de antibióticos β -lactámicos ante las cuales la actividad transpeptidasa de las PBPs endógenas se encuentra inhibida, y sustituye a las mismas en la síntesis de la pared celular. De esta manera permite el crecimiento de las bacterias en presencia de estos compuestos.

Los genes adquiridos por *S. aureus* que le confieren resistencia a β -lactámicos forman parte de los operones *bla* y *mec*¹⁹. El operón *bla* está constituido por el gen *blaZ*, que codifica para la β -lactamasa PC1, y los genes *blaR1* y *blaI* que codifican para las proteínas reguladoras BlaR1 y Blal, respectivamente. El operón *mec* está compuesto por el gen *mecA*, que codifica para PBP2a, y los genes *mecR1* y *mecI* que codifican para las proteínas reguladoras MecR1 y Mecl, respectivamente (**Figura 3.1**). Recientemente se determinó que un cuarto gen forma parte del operón

mec, *mecR2*, el cual codifica para el anti-represor MecR2^{20,21}. Los dos sistemas son similares en estructura y función²², pero mantienen identidades independientes: exhiben co-represión pero no co-inducción²³.

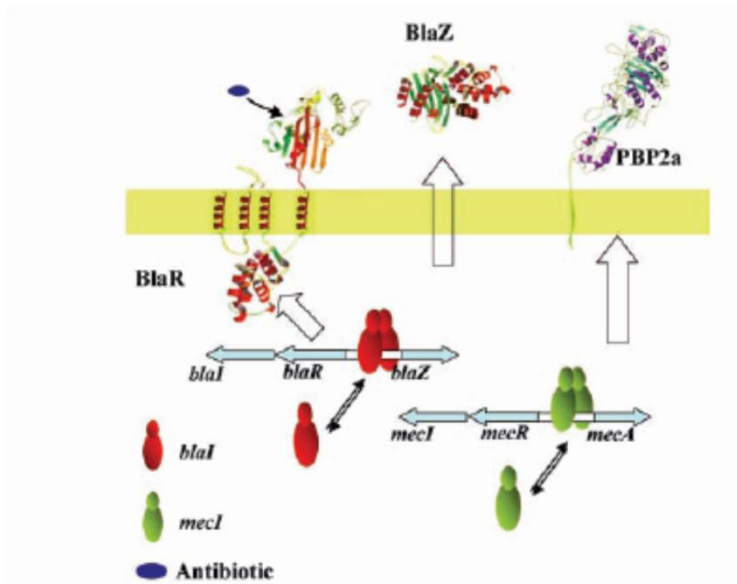


Figura 3.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos de MRSA²⁴.

Las proteínas BlaI y MecI son proteínas de unión a ADN que reprimen la transcripción de los genes de los operones mediante unión a las regiones operadoras (**Figura 3.2**)^{19,25,26}. Se cree que el sistema de regulación para el sistema *mec* es igual al mecanismo propuesto para el sistema *bla*, mejor caracterizado hasta el momento. BlaR1 y MecR1 son proteínas de membrana, se ha propuesto que presentan un dominio extracelular sensor que detecta al antibiótico β-lactámico presente en el medio (**Figura 3.2**)^{24,27}. Estas proteínas transmitirían una señal al citoplasma que resultaría en la transcripción de los genes de resistencia. En presencia de β-lactámicos, un residuo de serina en el dominio sensor extracelular de BlaR1 (S389) y MecR1 (S391) es acilado por el antibiótico, de manera irreversible para el tiempo de duplicación de la bacteria. Existe controversia respecto al mecanismo a través del cual esta modificación covalente es transmitida al dominio citoplasmático de las proteínas sensoras, existiendo evidencias a favor y en contra de un cambio conformacional en el dominio sensor^{24,28,29}. Se ha demostrado que el dominio citoplasmático activado de BlaR1 presenta actividad proteolítica, responsable de un evento de auto-proteólisis y de la degradación de la proteína

represora Blal^{30,31,32}. Estudios recientes, también han propuesto la participación de otra proteína, aún no identificada, en la activación del dominio sensor de BlaR1 en respuesta al antibiótico, ya que se ha demostrado que al mutar el residuo S389 del dominio sensor, la acilación del mismo por el antibiótico no es necesaria para activar al dominio metalo-proteasa, debido a que la capacidad de auto-proteolizarse y de degradar Blal se mantuvo en la mutante incapaz de unir al antibiótico. Es decir que, BlaR1 expresada en la membrana de *E. coli* presenta la capacidad de proteolizar a Blal, pero dicha actividad es baja y no inducible por β -lactámicos. Se ha propuesto que la kinasa Stk1 podría participar en la activación del sistema *bla* a través de la fosforilación de BlaR1³³. En el caso del sistema *mec*, existen evidencias que indican que la proteína represora MecI no sería degradada directamente por MecR1, sino por otras proteasas de la célula, proceso que sería favorecido por la unión de la proteína MecR2^{18,20,21}. La fragmentación de Blal/MecI da lugar a la reducción de la concentración citoplasmática de la forma activa de estas proteínas represoras, y así a la transcripción de los genes del operón en presencia de antibióticos β -lactámicos, con la consecuente manifestación del fenotipo de resistencia. Si bien los sistemas *bla* y *mec* presentan profundas similitudes a nivel genético, existe una significativa diferencia temporal en la expresión de los dos sistemas y en el mecanismo de activación propuesto^{23,34}.

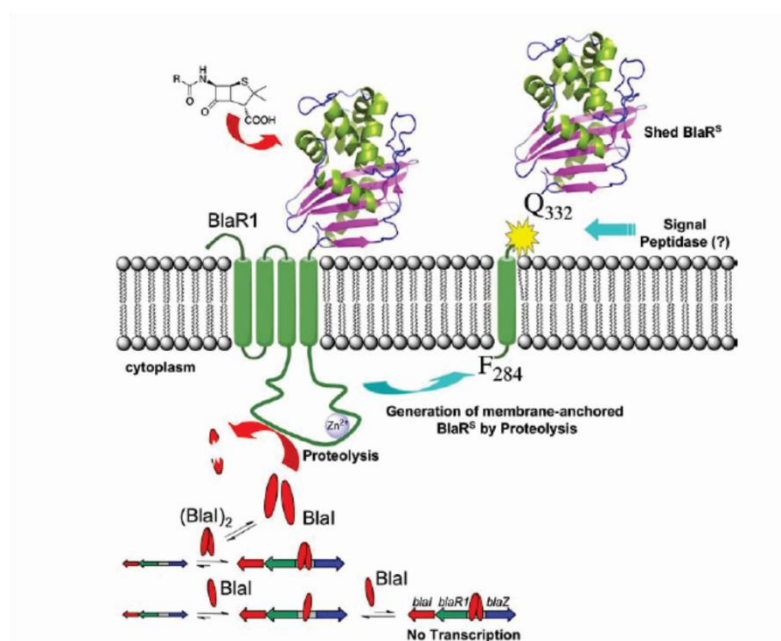


Figura 3.2. Esquema de activación del sistema *bla*, en respuesta a antibióticos β -lactámicos³⁰.

Los sistemas descritos tienen importantes implicancias en la resistencia a antibióticos en *S. aureus*, pero aún no se comprende en detalle los mecanismos

moleculares involucrados en la transducción de señal en estos sistemas. Una de las dificultades radica en la expresión de las proteínas sensoras/transductoras BlaR1 y MecR1, las cuales son proteínas de membrana, para su estudio bioquímico y biofísico. La comprensión del mecanismo de transducción de señal empleado por estas proteínas sensoras/transductoras es de sumo interés dado que las mismas son posibles blancos para el diseño de inhibidores que puedan emplearse conjuntamente con los antibióticos β -lactámicos actualmente disponibles.

3.2. Rol de la proteína sensora/transductora BlaR1

La proteína de membrana BlaR1 de *S. aureus* NRS128, es una proteína de 585 aminoácidos, conformada por un dominio sensor en el extremo C-terminal, ubicado en el espacio extracelular, un dominio citoplasmático con un motivo H₂₀₆EXXH característico de metalo-proteasas de zinc³⁵ y, según el consenso general, cuatro dominios transmembrana que anclan la proteína a la misma.

Se ha demostrado que, luego de la unión no-covalente del antibiótico β -lactámico al dominio extracelular de BlaR1, ocurre un evento catalítico que resulta en la formación de un aducto covalente enzima-antibiótico debido a la acilación de la Ser-389, concomitante con la apertura del anillo β -lactámico. El residuo esencial que promueve la acilación de la serina por parte del antibiótico es una N^ε-carboxilisina, obtenida por la reacción del grupo amino perteneciente a la cadena lateral del residuo de Lys-392 con dióxido de carbono. La posterior N-decarboxilación de la lisina, permite la formación de una especie acilada de la proteína muy estable²⁸ (**Figura 3.3**).

Hasta el momento, se ha logrado solubilizar y cristalizar únicamente el dominio sensor de BlaR1 (BlaR^S). Se cree que este dominio está relacionado evolutivamente con las β -lactamasas de clase D, aunque se asemeja a las PBP por la formación del complejo estable con el antibiótico β -lactámico, como se mencionó anteriormente. Se ha demostrado que la diferencia funcional que poseen estas dos proteínas, a pesar de su similitud estructural, se debe a la naturaleza del residuo ubicado en la posición 439 de BlaR1. En el caso de BlaR1 se trata de una asparagina o una treonina, en donde, la cadena lateral de estos aminoácidos se une por puente de hidrogeno a la Lys-392 N-carboxilada, permitiendo la acilación de la

Ser-389. En cambio, en el caso de las β -lactamasas de clase D, en la posición 439 se encuentra un aminoácido hidrofóbico (valina o isoleucina), que permite la formación de un puente de hidrógeno alternativo entre la Ser-389 activa y la Lys-392 N-carboxilada. Estas diferencias en las interacciones conllevan a una diferencia funcional de estas proteínas³⁶.

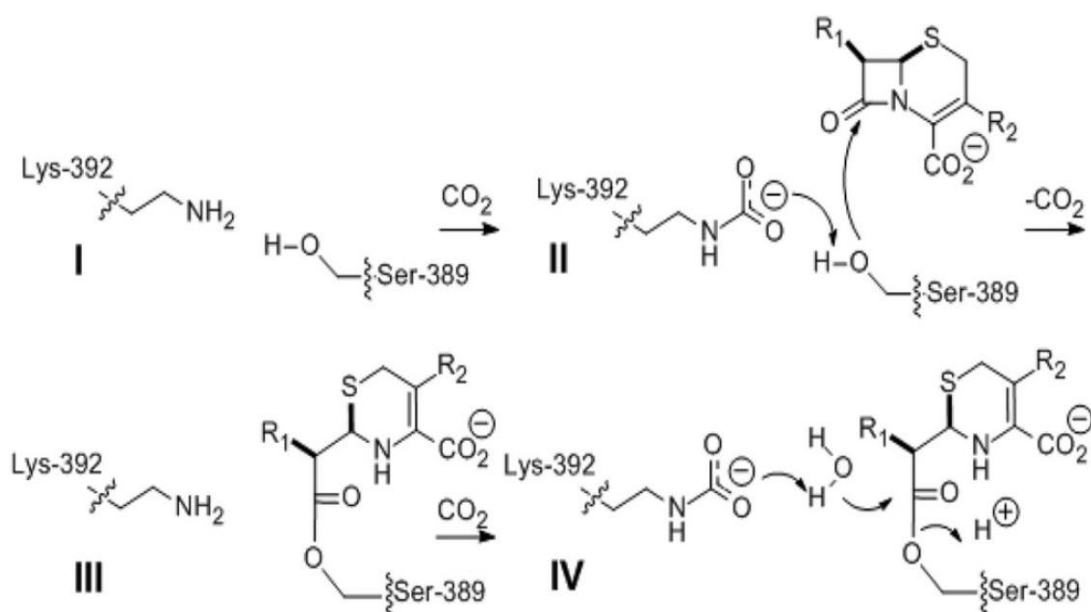


Figura 3.3. Mecanismo de reacción involucrado en la unión del antibiótico β -lactámico al dominio sensor de BlaR1³⁶. La Lys-392 de BlaR1 y la lisina correspondiente en las β -lactamasas de clase D tienen que estar N-carboxiladas para que la proteína sea funcional. La N-carboxilación de la Lys-392 promueve la acilación de la Ser-389 por el antibiótico (etapa II). La N-decarboxilación de la Lys-392 en el intermediario acil-enzima es la especie final para BlaR1 (paso III). En las β -lactamasas de clase D, y en la mutante BlaR^S N439V del dominio sensor de BlaR1, la lisina vuelve a ser N-carboxilada y la misma participa en la deacilación (paso IV), para completar un ciclo catalítico, liberándose el antibiótico β -lactámico hidrolizado y regenerándose la enzima.

En cuanto al efecto de la unión del antibiótico al dominio sensor de *S. aureus*, la comparación de los espectros de dicroísmo circular y de Infrarrojo (FTIR) del dominio libre y unido al antibiótico, muestran cambios en el contenido de estructura secundaria, es decir, sugieren un cambio conformacional^{24,28}. Sin embargo, las estructuras cristalográficas obtenidas hasta el momento de la forma libre y acilada del dominio sensor, no muestran cambios conformacionales^{29,37}. Esta controversia acerca de la existencia de cambios conformacionales en el dominio sensor en respuesta a la unión covalente del antibiótico, ha llevado a proponer que la transducción de la señal podría estar iniciada por interacciones diferenciales entre

los bucles extracelulares del dominio metalo-proteasa y el dominio sensor. A su vez, estudios realizados en la proteína homóloga BlaR1 de *Bacillus licheniformis*, también sugirieron que la unión del antibiótico β -lactámico al extremo C-terminal de BlaR1 (dominio sensor, BlaR^S), genera un cambio conformacional significativo y se propuso que este evento jugaría un rol importante en el proceso de transducción de la señal.

A pesar de muchas incertezas, se sabe que el dominio sensor es el encargado de detectar la presencia del antibiótico β -lactámico en el espacio extracelular y que el extremo N-terminal de BlaR1 (dominio citoplasmático), es el responsable del primer paso de señalización en el espacio citoplasmático. La transmisión de la presencia del antibiótico detectada por el dominio sensor al dominio citoplasmático, requiere de una interacción cercana entre estos dos dominios. Estudios de *phage-display* realizados en BlaR1 de *B. licheniformis* permitieron proponer que el bucle extracelular que une el segundo y tercer segmento transmembrana, denominado bucle L2 (**Figura 3.4**), interactuaría con el dominio sensor. Estos estudios indicaron que esta interacción se veía perturbada ante la acilación del dominio sensor por el antibiótico β -lactámico y se ha propuesto que la pérdida de dicha interacción sería la señal que da lugar a la activación del dominio citoplasmático³⁸.

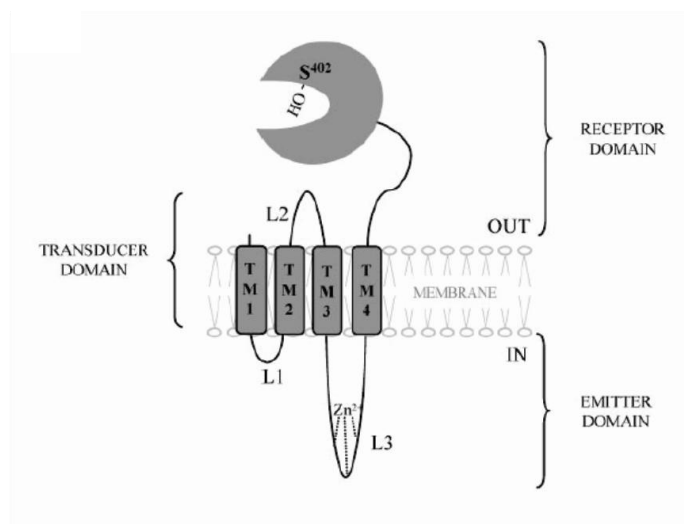


Figura 3.4. Topología de membrana de la proteína sensora/transductora BlaR1 de *Bacillus licheniformis*³⁸.

Al estudiar mediante RMN, la interacción entre BlaR^S de *S. aureus* y una versión trunca soluble del bucle L2 (residuos 79-105) se determinó que se trata de una interacción de baja afinidad ($K_D = 1$ mM) y que no se ve significativamente perturbada luego de que el dominio sensor es acilado por el antibiótico³⁹. Este último

estudio, indica que la transducción de la señal en *S. aureus* no estaría dada por una interacción diferencial del bucle L2 con el dominio sensor, según el antibiótico se encuentre unido o no al mismo.

Como se mencionó anteriormente, el dominio citoplasmático de BlaR1, posee un motivo característico de metalo-proteasas. Se determinó que BlaR1 es susceptible a un evento de auto-proteólisis, generando dos fragmentos asociados a membrana. Uno de ellos es un fragmento C-terminal que incluye al dominio sensor extracelular, BlaR1_284-585 (36,6 kDa) o BlaR1_294-585 (35,4 kDa), resultantes del clivaje luego de los aminoácidos 283³⁰ o 293³¹, respectivamente. Si bien hay diferencias según el grupo de trabajo en la posición del corte, en ambos casos el fragmento C-terminal resultante incluye la cuarta hélice transmembrana predicha seguida del dominio sensor, y este fragmento sería reminiscente de los precursores de β -lactamasas, teniendo en cuenta la homología estructural del dominio sensor de BlaR1 con β -lactamasas de clase D. Además, se comprobó que al mutar los residuos del motivo de unión a zinc, H201 y H205, o el aminoácido E202 (que tendría el rol de base general, activando a una molécula de agua para el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico), todos ellos por el residuo alanina, no se evidencia la presencia de los fragmentos de degradación, indicando actividad auto-proteolítica^{31,32}.

A partir de estudios de la activación temporal del sistema *bla* en diferentes cepas de *S. aureus*, también se ha detectado otro fragmento de degradación, BlaR1_332-558 (31 kDa), proveniente de un segundo evento de proteólisis en un sitio específico, catalizado por una Peptidasa Señal de Tipo I, que da lugar a la liberación del dominio sensor al medio de cultivo³⁰. Se postuló, que este fragmento podría ser el resultado de la acción de la Peptidasa Señal sobre los fragmentos C-terminales de aproximadamente 36 kDa, reminiscentes de los precursores de β -lactamasas. Se cree, que estos eventos de proteólisis observados en BlaR1 permitirían regular la cantidad de proteína sensora que se acumula en la membrana luego de la inducción del sistema y por lo tanto, sería un mecanismo para eliminar la proteína sensora activada, una vez que se ha eliminado el antibiótico β -lactámico del medio (mecanismo de apagado del sistema).

Se han propuesto dos hipótesis con respecto al evento de auto-proteólisis de BlaR1. Por un lado, se postuló que este evento sería necesario para la degradación de Blal y la consecuente activación del sistema³¹. Por otro lado, se propuso que la actividad auto-proteolítica basal actuaría como un regulador de la cantidad de proteína acumulada en membrana y un mecanismo de eliminación de la proteína BlaR1 activada una vez que se eliminó el antibiótico. En este último modelo propuesto, la capacidad de BlaR1 de degradar a Blal, no dependería de la previa auto-proteólisis del dominio sensor. Se postula que la activación del dominio citoplasmático de BlaR1 para degradar rápidamente a Blal, dependería de algún otro mecanismo aún desconocido, presumiblemente, una interacción diferencial de un bucle extracelular con el dominio sensor activado que desate un cambio en la actividad del dominio citoplasmático^{30,32} o el evento de fosforilación³³.

3.3. Topología de la proteína de membrana sensora/transductora BlaR1 de *B. licheniformis*

Una de las mayores dificultades al momento de intentar comprender los mecanismos de transducción de la señal, los cuales dependen del número, de la direccionalidad y del ensamblado de los segmentos transmembrana de la proteína transductora, está relacionada con la sobre-expresión de estas proteínas de membrana, para su posterior estudio bioquímico y biofísico. Hasta el momento, no se ha logrado purificar la proteína BlaR1 de forma completa en cantidades suficientes para ser cristalizada y de esta forma poder dilucidar su estructura. Por esta razón, la topología de la proteína BlaR1 sería de suma utilidad para poder obtener más información acerca de los mecanismos involucrados en la transmisión de la señal en respuesta a la presencia de antibióticos β -lactámicos.

Se ha reportado el estudio de la topología de la proteína BlaR1 de *Bacillus licheniformis*, que permitiría determinar la localización de los bucles que unen los distintos segmentos transmembrana, que podrían estar involucrados en la transmisión de la señal. En el mismo, se llevó a cabo la predicción de hélices transmembrana (TM), obteniéndose cinco hélices posibles. De estas cinco hélices TM predichas, cuatro de ellas tuvieron mayor probabilidad de acuerdo al punto de corte de los algoritmos empleados, TM1, TM2, TM3 y TM4 (**Figura 3.4**). Se generaron distintas versiones trucas de las proteína, en las cuales se fusionó en su

extremo C-terminal y luego de cada dominio transmembrana predicho, una β -lactamasa (TEM), y se evaluó la capacidad de conferir resistencia a antibióticos β -lactámicos⁴⁰. Para esto, se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) del antibiótico al ser incubado con células transformadas con las distintas versiones trucas de BlaR1 fusionadas a TEM. Esta estrategia se basó en el hecho de que sólo aquellas construcciones en las cuales la β -lactamasa se localiza en el espacio extracelular tendrían mayor resistencia al antibiótico. De esta manera se determinó, en base a las CIM obtenidas, que el bucle L1 y el bucle L3 (luego de las regiones TM1 y TM3, respectivamente) se encuentran en el espacio citoplasmático y que el bucle L2 y el bucle L4 (luego de las regiones TM2 y TM4, respectivamente) están localizados en el espacio extracelular. Al revisar estos resultados, se observa que no se tuvieron en cuenta los niveles de expresión de cada construcción, los cuales también debieron ser tenidos en cuenta para definir qué valor de CIM se considera indicativo de actividad y cual no. Más allá de esto, de acuerdo a este estudio de topología, el dominio catalítico con el motivo HEXXH situado entre las regiones TM3 y TM4, se encontraría en el lado citoplasmático, mientras que el dominio sensor (C-terminal), ubicado luego de la región TM4 se encontraría en el espacio extracelular (**Figura 3.4**). Por lo tanto, el modelo propuesto para la transducción de la señal de BlaR1 en *B. licheniformis*, se basa en el hecho de que el dominio C-terminal sensor y el dominio metalo-proteasa se encuentran localizados en caras opuestas de la membrana (en el espacio extracelular y citoplasmático, respectivamente). Este modelo ha sido extrapolado a BlaR1 de *S. aureus*, si bien existen diferencias funcionales entre ambas proteínas. Por lo tanto, la topología de BlaR1 de *B. licheniformis* no es necesariamente extrapolable a *S. aureus*.

3.4. Estudio de la arquitectura de la proteína de membrana sensora/transductora MecR1

Empleando una estrategia que permite la determinación de la topología de proteínas de membrana sin necesidad de purificarlas, basada en fusiones de versiones trucas de la proteína MecR1 a la proteína fluorescente eGFP y utilizando inserciones del sitio de reconocimiento de la proteasa TEV en la proteína completa, el Lic. Bruno Belluzo ha logrado en nuestro laboratorio completar un estudio de la topología de MecR1. Este estudio muestra algunas diferencias respecto a la

arquitectura reportada para BlaR1 de *S. aureus*, en base a los estudios sobre BlaR1 de *B. licheniformis*; modelo 1 (**Figura 3.5 A**). Además se han encarado, en colaboración con el grupo del Dr. Dal Peraro (EPFL, Suiza), estudios de modelado por homología y modelado molecular en membrana de BlaR1 y MecR1. Los modelos obtenidos fueron validados contra datos totalmente independientes de contactos residuo-residuo resultantes del análisis de la co-evolución de residuos en grandes alineamientos de proteínas. En una simulación *in silico*, se equilibró en membrana una de las proteínas cristalizadas homólogas a MecR1 y posteriormente se ajustó a esta estructura nuestro modelo del dominio metalo-proteasa de MecR1. La primera observación fue que la topología de membrana resultante no se condecía con la obtenida a partir de las predicciones de hélices transmembrana, ni tampoco con la topología que fue informada en base a resultados experimentales para BlaR1 de *B. licheniformis*. Un “docking” de la estructura del dominio sensor de MecR1 libre de antibiótico, en nuestro modelo del dominio metalo-proteasa, guiado por interacciones análogas a las reportadas empleando ensayos de RMN entre BlaR^S y un fragmento del bucle L2 del dominio integral de membrana, muestra un complejo cerrado con una cavidad hidrofílica en su interior, modelo 2 (**Figura 3.5 B**).

La principal diferencia entre el modelo de topología presentado para BlaR1 de *B. licheniformis*, Modelo 1 y la arquitectura propuesta por nuestro grupo para MecR1, Modelo 2 (manuscrito en preparación), es que el dominio efector (gluzincina) se encontraría soluble en el primer caso e inserto en membrana en el segundo. En especial, un elemento distintivo es la presencia de un bucle reentrante (TM5) en nuestro modelo. Si este bucle se encuentra efectivamente inserto en membrana, al expresar una versión mínima del dominio citoplasmático, cytMecR1, sin ningún otro paso transmembrana fuera del putativo TM5, este podría ser suficiente para anclar la construcción a la membrana. La proteína cytMecR1 con la mutación E205A fue expresada en *E. coli* BL21 StarTM (DE3) y se corroboró que la misma se ubicó en la fracción de proteínas de membrana. Estos resultados indican que el dominio metalo-proteasa está embebido en membrana y se propone que se encontraría anclado por la hélice reentrante que comprende a los aminoácidos 211 a 242.

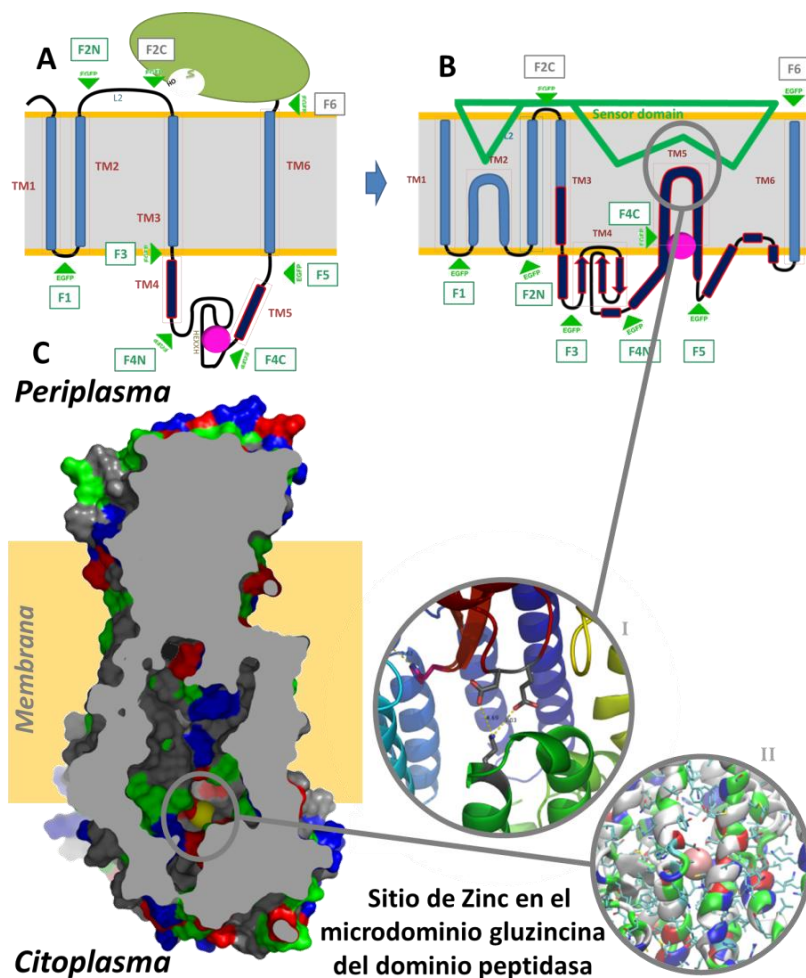


Figura 3.5. Modelo de la arquitectura de MecR1 completa. **A.** Esquema de la topología de MecR1 inserta en membrana según el modelo presentado para el homólogo de BlaR1 de *B. licheniformis*, Modelo 1. **B.** Esquema de la topología del modelo presentado, Modelo 2. En azul: topología general del dominio metalo-proteasa de MecR1 (celeste para el modelo completo obtenido por homología, azul oscuro para la región sustentada mediante datos de co-evolución). La esfera rosa muestra la posición aproximada del ion Zn(II). La traza verde muestra de manera aproximada como el dominio sensor se inserta para cerrar la cavidad definida por las hélices insertadas en membrana del dominio metalo-proteasa. **F1 a F6**: se indican las posiciones aproximadas

donde se fusionó eGFP. **C.** Modelo tridimensional de MecR1. El dominio integral de membrana tipo gluzincina se pliega generando una cavidad hidrofílica con hélices anfipáticas que permiten la inserción en membrana. El dominio sensor cierra esta cavidad hacia el espacio extra-citoplasmático, de manera que se genera la proximidad espacial de bucles de ambos dominios. Acercamiento I: Hélice-giro-hélice del TM5 (verde); extremo C-terminal del bucle L2 (cian); bolsillo de unión al antibiótico del dominio sensor (rojo). Se muestran pares de residuos que podrían estar interactuando, y conectando el dominio sensor con la hélice reentrante que contiene a los ligandos del metal. Acercamiento II: sitio activo del dominio metalo-proteasa, en la base de la cavidad hidrofílica y en estrecha proximidad a la interfase membrana-citoplasma

Si la arquitectura propuesta es correcta, el dominio sensor extracelular, parcialmente embebido en membrana, sería capaz de interaccionar estrechamente con este dominio gluzincina integral de membrana. La intercomunicación entre ambos dominios es evidente en esta arquitectura propuesta, sugiriendo por primera vez una hipótesis de cómo sería la transducción de la señal luego de que el dominio sensor de MecR1 es acilado por el antibiótico β -lactámico. Se ha demostrado que la unión del antibiótico al residuo S389 de la proteína homóloga BlaR1 de *S. aureus* altera la dinámica de los bucles que conectan a las hebras β 5- β 6 del dominio sensor. Dado que nuestro modelo propone una interacción entre este bucle del dominio

sensor de MecR1 y el motivo hélice-giro-hélice (hélice reentrante) del dominio citoplasmático de MecR1, se propone que la interacción del antibiótico podría ser transmitida a través de esta hélice reentrante al sitio metálico. Una alteración en la coordinación del ion Zn(II) o en la accesibilidad del sustrato al sitio metálico podría modular la actividad metalo-proteasa de MecR1, pasando de una actividad basal en ausencia del antibiótico a una actividad mayor en presencia del mismo.

3.5. Utilización de las proteínas Mistic y eGFP para la sobre-expresión de proteínas de membrana

El análisis estructural de proteínas de membranas se ve limitado debido a la dificultad de obtener altos rendimientos en la producción de la proteína, en la solubilización y purificación y por dificultades en la cristalización de las mismas. Generalmente se presentan dos problemas, uno de ellos es que las proteínas deben poseer una secuencia señal para ser transportadas a la membrana que puede no ser reconocida por la bacteria hospedadora y otro es que altos niveles de expresión de proteínas de membrana que deban usar la maquinaria translocadora, pueden interferir con la inserción en membrana de otras proteínas esenciales para el hospedador, lo cual puede hacer que la expresión de la proteína de interés resulte tóxica para el hospedador. En respuesta a ello, podrían plantearse distintas soluciones, como utilizar plásmidos de bajo número de copia con promotores débiles para producir bajos niveles de proteínas, compensado por grandes volúmenes de cultivo; dirigir la proteína de interés a cuerpos de inclusión, proceso con bajo rendimiento, en general, que requiere de la renaturalización de la misma (y de un ensayo de actividad biológica para monitorear que se recupera el plegamiento nativo); utilizar fusiones a otras proteínas, limitado por la falta de direccionamiento de la construcción hacia la membrana o porque no facilitan la inserción en membrana⁴¹. Dadas las limitaciones encontradas hasta la fecha para la sobre-expresión de las proteínas BlaR1 y MecR1 completas, no se cuenta con una estructura cristalográfica de las mismas (sólo se ha resuelto la estructura del dominio sensor)^{29,42,37,43}.

En nuestro laboratorio estamos explorando la posibilidad de sobre-expresar en *E. coli* versiones más cortas de la proteína BlaR1 presente en ciertas cepas de *S. aureus* resistentes a β -lactámicos (como ser la cepa JH1), que carecen de las tres

primeras hélices transmembrana predichas. Creemos que estas proteínas podrían representar sensores mínimos funcionales (aminoácidos 160-585). También estamos explorando la posibilidad de sobre-expresar una versión que carece de las primeras dos hélices transmembrana de BlaR1 (TM3BlaR1) y la proteína completa (BlaR1). El Lic. Belluzo, en nuestro grupo, logró sobre-expresar BlaR1 de *S. aureus* JH1 como fusión a GST en su extremo N-terminal, aunque la misma se acumuló en cuerpos de inclusión y hasta la fecha no se ha logrado purificar la proteína activa a partir de los mismos. A su vez, se ha logrado sobre-expresar a BlaR1-JH1 como fusión a TrxA en su extremo N-terminal, observándose fragmentos de degradación concordantes con los esperados en caso de que la proteína esté activa y sufra auto-proteólisis. También se han realizado estudios de sobre-expresión utilizando como fusión al extremo N-terminal de BlaR1JH1 la proteína NusA, pero tampoco pudo observarse sobre-expresión de la misma. Por lo tanto, en este trabajo de tesina hemos decidido trabajar con la proteína Mistic como fusión al extremo N-terminal de distintas versiones de la proteína BlaR1 (BlaR1JH1, TM3BlaR1 y BlaR1), para estudiar su sobre-expresión en *E. coli*. En el caso de las versiones TM3BlaR1 y BlaR1 se decidió utilizar la mutante E202A, para evitar la auto-proteólisis de las mismas, mientras que en el caso de BlaR1JH1 la versión utilizada fue la salvaje (Wild Type). Además, en el caso de TM3BlaR1 y BlaR1 se ha utilizado la secuencia genética de *S. aureus* (a excepción del aminoácido mutado), mientras que el gen que codifica para BlaR1JH1 fue optimizado para la expresión en *E. coli*.

Mistic es una proteína de membrana inusual de *Bacillus subtilis*, de 110 aminoácidos (13 kDa), que se pliega de forma autónoma en la membrana, sin requerir de la maquinaria de translocación celular. Se ha demostrado que la fusión de Mistic a otras proteínas de membrana permite la expresión de altos niveles de las mismas en sus conformaciones nativas, incluyendo muchas proteínas eucariotas que no han podido ser sobre-expresadas en bacterias empleando otras fusiones^{41,44}. A partir de estudios de RMN (TROSY-HNCA y NOESY), se ha determinado que la proteína Mistic presenta 4 hélices transmembrana (residuos 8 a 22, 32 a 55, 67 a 81 y 89 a 102), con su extremo C-terminal expuesto al espacio periplasmático en *E. coli*, las cuales se agrupan formando un “manejo” (bundle) de hélices, con una superficie sorprendentemente polar expuesta a los lípidos (**Figura 3.6**).

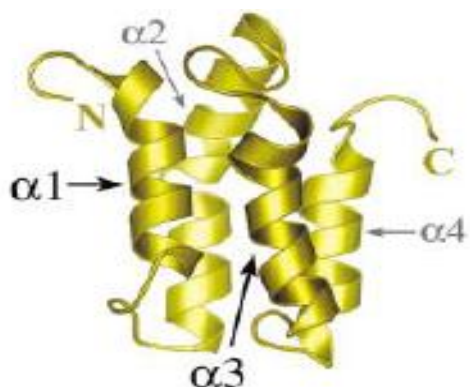


Figura 3.6. Estructura de la proteína Mystic, determinada por estudios de RMN⁴¹.

Enhanced-GFP (**Figura 3.7**), es una variante de la proteína verde fluorescente GFP obtenida a partir de una mutación que mejora el plegado de esta proteína a 37 °C y, además es una de las variantes con más brillo y más estables de GFP⁴⁵. Esta es una proteína de 238 aminoácidos (26,9 kDa) que emite fluorescencia a 490 nm y posee un máximo de emisión a 509 nm, en el rango de luz verde del espectro visible⁴⁵. La emisión de fluorescencia por parte de esta proteína se debe a la existencia de un fluoróforo formado espontáneamente a partir de una reacción intramolecular entre los aminoácidos Tyr65-Tyr66-Gly67, dentro de la estructura de barril-β de la proteína correctamente plegada^{45,46}. Cuando eGFP es translocada hacia el espacio periplasmático de *E. coli*, a través del sistema Sec, la misma no puede plegarse correctamente, presumiblemente debido al ambiente oxidante del espacio periplasmático que promueve la formación de puentes disulfuro entre cisteínas de la misma molécula de eGFP o intermoleculares, formando agregados de eGFP, lo cual interfiere con la estructura terciaria de la proteína, y por lo tanto no emite fluorescencia⁴⁷.

En nuestro laboratorio el Lic. Belluzo, logró sobre-expresar en membrana el dominio “citoplasmático” de la proteína MecR1, CytMecR1(E205A)-H6X. En base a ello, y a los problemas nombrados anteriormente para el estudio de proteínas de membrana, hemos decidido utilizar la proteína eGFP como fusión al extremo C-terminal de la proteína CytMecR1(E205A)-H6X, para evaluar la posibilidad de obtener mejores niveles de expresión en membrana o en forma soluble. Estudios previos, han demostrado que la misma aumenta los niveles de expresión al ser utilizada como una fusión a la proteína en estudio^{48,49}. En base al modelo molecular planteado para la proteína MecR1, debería observarse fluorescencia al fusionar el

dominio citoplasmático de MecR1 a la proteína eGFP. Por lo tanto, esta podría utilizarse para realizar un seguimiento de su sobre-expresión, solubilización y purificación.

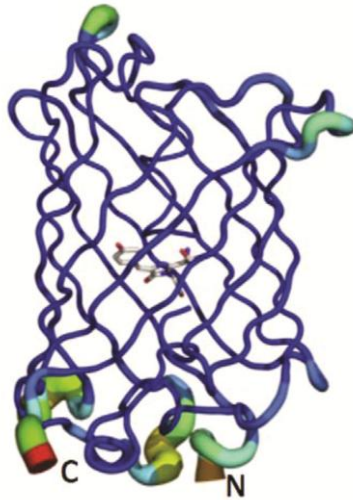


Figura 3.7. Estructura de la proteína eGFP, determinada por difracción de RayosX⁵⁰.

4. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es identificar los determinantes estructurales que dan lugar a la transducción de la señal en las proteínas MecR1 y BlaR1 de *Staphylococcus aureus*, dando lugar a la manifestación de resistencia. Estas proteínas son posibles blancos para el diseño de inhibidores que puedan emplearse conjuntamente con los antibióticos β -lactámicos actualmente disponibles, prolongando así la utilidad de los mismos para el tratamiento de infecciones debidas a MRSA. Para lograr este objetivo pretendemos realizar estudios estructurales de las proteínas de membrana sensoras/transductoras BlaR1 y MecR1, que nos permitan profundizar en el mecanismo de activación de estas proteínas sensoras de antibióticos β -lactámicos. Dentro de este contexto y teniendo en cuenta trabajos previos, en este proyecto pretendemos poner a prueba las siguientes hipótesis:

1. La fusión de BlaR1 y MecR1 completas o truncadas a otras proteínas de alta solubilidad o a otras proteínas de membrana permitiría la sobre-expresión como se ha observado con otras proteínas de membrana;
2. Variantes más cortas de la proteína BlaR1 presentes en ciertas cepas de *S. aureus* resistentes, con un menor número de hélices transmembrana predichas, podrían ser mejores candidatas para la sobre-expresión en *E. coli*, y podrían permitir la posterior caracterización estructural de las mismas;
3. Para lograr sobre-expresar estas metalo-proteasas es necesario emplear versiones inactivas de las mismas.

A fin de poner a prueba estas hipótesis, se definieron los siguientes objetivos específicos:

- Expresar a BlaR1 de *S. aureus* JH1 (salvaje), a BlaR1 de NRS128 con la mutación E202A, a la versión truncada de la misma TM3BlaR1(E202A) y a CytMecR1(E205A) (dominio metalo-proteasa de MecR1 de NRS70) como fusiones a Mystic y/o EGFP.
- Evaluar la localización y topología de las fusiones en *E. coli*.
- Evaluar estrategias para la solubilización y purificación de las construcciones logradas.

5. Materiales y métodos

5.1. Plásmidos

5.1.1. Plásmidos pET24a(+) y pET41a(+)

Los plásmidos pET24a(+) y pET41a(+), comercializados por Novagen, permiten la sobre-expresión de proteínas recombinantes cuyos genes son clonados bajo control de un promotor T7, reconocido por la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Corriente arriba al promotor, estos vectores contienen el gen codificante para el represor LacI. Por lo tanto, la expresión de los genes clonados corriente abajo del promotor, puede ser inducida por lactosa o IPTG. Dado que el promotor de los plásmidos no es reconocido por las polimerasas bacterianas, la cepa hospedadora debe ser capaz de expresar la T7 RNA Polimerasa.

Estos vectores, presentan bajo control del promotor T7 una secuencia codificante para 6 Histidinas (His-tag). De esta forma, para el caso del vector pET24a(+), un gen clonado adecuadamente puede ser expresado como fusión C-terminal a His-tag, ya que el sitio de múltiple clonado se encuentra previo al mismo. En el caso del pET41a(+), el sitio de múltiple clonado se encuentra posterior al His-tag, por lo tanto la fusión podría ser N-terminal. Además, este último vector contiene una secuencia de 8 Histidinas, posterior al sitio de múltiple clonado, que podría ser utilizada como una fusión C-terminal a la secuencia de interés. Ambos plásmidos contienen un marcador de resistencia a Kanamicina.

El plásmido pET41a(+), además de lo nombrado anteriormente, contiene la secuencia genética para la expresión de la proteína GST (Glutathión S- transferasa de *Schistosoma japonicum*) bajo control del promotor T7 y un sitio específico de reconocimiento de trombina. De esta manera, en este vector también es posible expresar proteínas como fusión al C-terminal de GST.

En nuestro laboratorio contamos con el plásmido pET24a(+)_*blaR1(E202A)*-H6X, que fue utilizado como molde en las reacciones de PCR realizadas para obtener las construcciones de *blaR1(E202A)* y *TM3blaR1(E202A)*. A su vez, la Lic. Fabbri logró la construcción del vector pET24a(+)_*H6X-mistic-TEV*, el cual fue utilizado para el clonado de las construcciones *blaR1(E202A)* y *TM3blaR1*. También, hemos utilizado el vector pET24a(+)_*mecR1(E205A)*, construido por el Lic. Belluzo,

como molde para la amplificación del gen *cytmecR1(E205A)*, que luego fue clonado en el vector pET24a(+)_TEV-egfp-H6X, también construido por el Lic. Belluzo.

Además, el Lic. Belluzo, logró la construcción del plásmido pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1*, que fue utilizado para la construcción del vector pET41a(+)_H6X-mistic-TEV-*blaR1JH1*.

5.1.2. Plásmido pET15b-mistic

El vector pET15b-mistic, provisto por la Dr. Albanesi, fue utilizado como molde en las reacciones de PCR para la amplificación del gen *mistic*, junto a un His-tag N-terminal, que luego fue clonado en el vector pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1*.

5.2. Cepas de *Escherichia coli*

La cepa empleada en este trabajo para guardar los plásmidos en stock de glicerol a -80 °C, fue *E. coli* DH5 α . Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizaron las cepas BL21 StarTM (DE3), C41 (DE3) y C43 (DE3).

La cepa de *Escherichia coli* BL21 StarTM (DE3) posee el lisógeno λ DE3 que contiene el gen codificante para la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*; lleva una mutación en el gen *rne131* que codifica para una ARNasa E truncada y permite una mayor estabilidad de los ARNm^{51,52,53}. Además, tiene mutados los genes que codifican para dos proteasas (OmpT y Lon) lo cual reduce la degradación de proteínas heterólogas expresadas en este sistema.

La cepa C41 (DE3) deriva de la cepa BL21 (DE3) y contiene, al menos, una mutación que previene la muerte celular asociada a la expresión de algunas proteínas recombinantes tóxicas. La cepa C43 (DE3) deriva de la cepa C41 (DE3), seleccionada por su resistencia a diferentes proteínas tóxicas, por lo cual puede expresar un grupo diferente de proteínas recombinantes tóxicas para otras cepas^{54,55}.

Cepa	Genotipo
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺), λ ⁻
BL21 Star TM (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm rne131</i> (DE3)

C41 (DE3)	<i>F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3)</i>
C43 (DE3)	<i>F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3)</i>

Tabla I Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo con su correspondiente genotipo.

5.3. Medios de cultivo

Medio de cultivo líquido *Lisogeny Broth* (LB) o Caldo de Lisogenia: triptona de caseína 1 % P/V, extracto de levadura 0,5 % P/V, NaCl 1 % P/V (Sigma).

Medio de cultivo sólido *Lisogeny Broth-agar* (LB-agar): triptona de caseína 1 % P/V, extracto de levadura 0,5 % P/V, NaCl 1 % P/V, agar-agar 1,5 % P/V (Sigma).

Cuando se utilizó el antibiótico Kanamicina como agente de selección, los medios se suplementaron con una concentración final del mismo de 50 µg/mL.

5.4. Técnicas de biología molecular

5.4.1. Purificación de ADN plasmídico

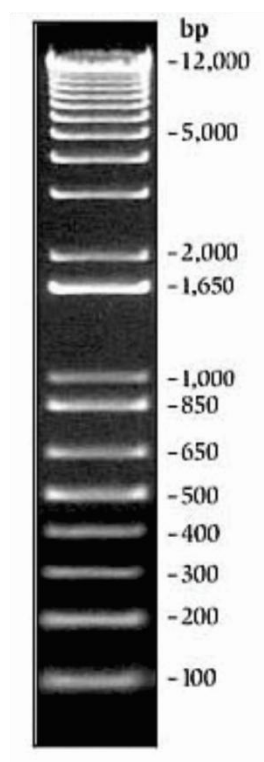
Para las purificaciones de ADN plasmídico se utilizó el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) según indicaciones del fabricante. Se partieron de cultivos de 10 mL de las células conteniendo el plásmido de interés crecidos durante 16 h a 37 °C, en presencia del antibiótico selector. Se cosecharon células a partir de 4,5 mL del cultivo y se procedió a su ruptura por lisis alcalina con los reactivos del kit: se trataron con una solución de NaOH/SDS y Proteinasa K y luego de neutralizar con acetato de potasio se centrifugaron para separar el ADN plasmídico del ADN cromosómico, el cual precipita en la centrifugación. El kit emplea una matriz con la cual interacciona el ADN plasmídico, para separar al mismo de aquellas moléculas que co-purifican con el lisado crudo. El rendimiento obtenido puede variar, dependiendo del número de copias del plásmido y de la cepa utilizada, entre otros factores. El grado de pureza e integridad se chequeó por electroforesis en gel de agarosa según se describe en la Sección 5.4.2. La determinación de la concentración del ADN obtenido se realizó mediante la adquisición de espectros de absorción entre 240 nm y 340 nm en un espectrofotómetro UV-visible NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). El cálculo se realizó considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de 50 µg/mL de ADN. Se evaluó también la relación Abs260/Abs280, que debería ser igual o mayor que 1.8 para preparaciones puras.

5.4.2. Electroforesis en geles de agarosa

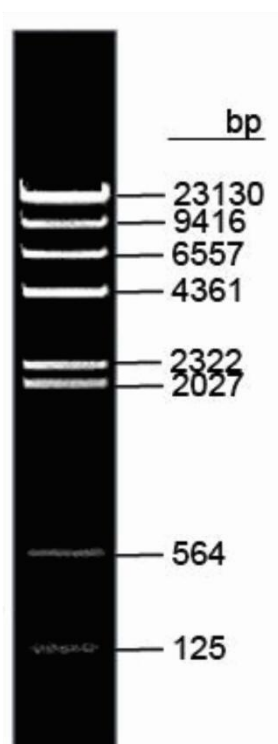
Se llevó a cabo utilizando sistemas de tipo submarino. Se usaron geles con una concentración de agarosa variable (entre 1 y 2 % P/V), dependiendo del tamaño de las moléculas de ADN a resolver, preparados en la solución reguladora TAE o TBE. A los mismos se les adicionó el colorante Syber Safe (Invitrogen), que se une al ADN doble hebra, antes de su gelificación a la concentración final indicada por el proveedor. Para la visualización de las bandas se empleó un transiluminador de luz azul, Safe Imager (Invitrogen), que permite visualizar la emisión de fluorescencia del colorante unido al ADN (λ_{em} = 530 nm), excitando a 500 nm. Se capturaron imágenes de los geles utilizando el transiluminador CHEMI DOC XRS+ SYSTEM (BIORAD).

Para ser sembradas, las muestras de ADN se mezclaron con 16,6 % V/V de una solución conteniendo azul de bromofenol 0,25 % P/V, xilenocianol 0,25 % P/V y glicerol 30 % V/V, en agua destilada estéril. Las electroforesis fueron realizadas utilizando TAE o TBE como solución de corrida, con limitación de voltaje a 80 V o de corriente en 50 mA, dependiendo del gel y de la cuba empleada. Los marcadores de peso molecular utilizados se muestran en la (Figura 5.1).

A. λ -HindIII



B. 1 Kbp Plus



C. 100 pb

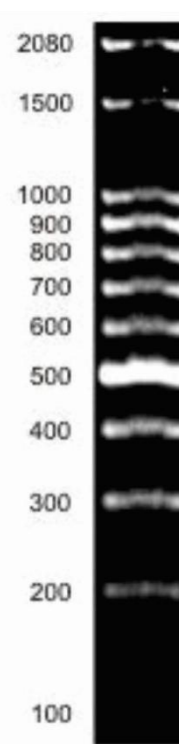


Figura 5.1 Marcadores de peso molecular utilizados para electroforesis en geles de agarosa. A. λ -HindIII; B. 1 Kbp Plus (Thermo Fisher Scientific); C. 100 pb (Thermo Fisher Scientific).

5.4.3. Soluciones amortiguadoras

TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

TBE: Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.

5.4.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Se utilizaron enzimas de Promega y NEB, en las condiciones recomendadas por el proveedor en cada caso.

Las reacciones de corte para chequeos se realizaron en un volumen final de 20 µL, utilizando 0,5 µL de la solución de enzima (en la mayoría de los casos), 3 µL de ADN plasmídico (con una concentración aproximadamente de 100 ng/µL) y 2 µL del medio de reacción 10 X correspondiente. En el caso de corte con enzimas de Promega que lo requirieran, se adicionó también 0,2 µL de BSA acetilada.

Los cortes realizados con fines de clonado se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, utilizando 20 µL de ADN plasmídico o de ADN proveniente de PCR, 1 µL de solución de enzima y 5 µL del medio de reacción 10 X correspondiente.

Para ambos casos, las digestiones se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Cuando se utilizaron dos enzimas, con medios de reacción diferentes, se realizaron cortes secuenciales. Es decir, primero se incubó dos horas con una de las enzimas en su medio de reacción correspondiente, luego se realizó la purificación de ADN y posteriormente se incubó dos horas más, con la otra enzima, en su medio de reacción correspondiente.

5.4.5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), según las instrucciones del fabricante. A partir del gel de agarosa, se cortó la banda de interés y se incubó con una solución de unión a membrana (isotiosianato de guanidinio 4,5 M y acetato de potasio 0,5 M) para luego fundirla a 65 °C. Se tomó el sobrenadante y se colocó en la columna del kit. Se realizaron dos lavados, con una solución de lavado de columna (acetato de potasio 10 mM, 80 % Etanol y EDTA 16,7 µM) y por último se agregaron 50 µL de agua para hidratar y eluir por centrifugación el material genético.

5.4.6. Reacciones de ligación

Las ligaciones de los fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Promega). Se utilizó una concentración molar del fragmento siete veces mayor a la del vector (en algunos casos se probó con cinco veces), para tratar de minimizar la religación del mismo, en un volumen final de 20 μ L. Se realizaron controles de religación del vector, sin el agregado de inserto. Las reacciones se llevaron a cabo en distintas condiciones: a 4 °C durante 17 h, a temperatura ambiente durante 3 h y luego a 4 °C durante 17 h, a temperatura ambiente durante 3 h.

Posteriormente a la ligación, se transformaron 100 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α con 10 μ L (en la mayoría de los casos) de la mezcla de ligación y se seleccionaron las transformantes por crecimiento en placas de LB-Agar conteniendo el antibiótico correspondiente (Kanamicina 50 μ g/mL).

5.4.7. Reacción de PCR

Las amplificaciones de fragmentos de ADN se llevaron a cabo en 50 μ L de medio de reacción conteniendo 100 ng de ADN molde, 15 pmoles de cada oligonucleótido (**Tabla II**), 2 U de ADN polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen), 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 mM de MgSO₄ y 1X de la solución de reacción provista por el kit de la polimerasa Pfx Platinum. Para todos los casos se realizaron controles negativos sin el agregado de ADN molde.

Se utilizó un termociclador (MJ MiniTM Personal Thermal Cycle, BIORAD) con un programa que consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de: desnaturalización por 40 s a 95 °C, 1 minuto de hibridación a una temperatura variable, según las temperaturas de hibridación del par de cebadores usados en cada caso, y una extensión durante 1 min por kb del molde a 72 °C, y por último una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Oligo	Secuencia	Tm (°C)	Sitio
OLL29 (fw)	5'- GCCATATGCACCACCACCACCACGGC AGCATGTTTTGTACATTTTTTGAAAAACATC ACC-3'	59	<i>NdeI</i>
OLL30 (rv)	5'-GCAGATCTGCCAGAACCAGAACCTTC-3'	57	<i>BglII</i>
OLL40 (Fw)	5'-GCCATATGCGCCTGAAAGTGTGTCAGTC- 3'	58	<i>NdeI</i>
OLL41 (Fw)	5'- GCGGATCCGTACAGCGCGATATATTTCACG -3'	59	<i>BamHI</i>
OLL92 (Fw)	5'- GCGGATCCCATATGGCTAAGTTATTAATAA TGAGC-3'	52	<i>BamHI</i>
OLL93 (Fw)	5'- CGGGATCCTTTAATTGGGATTCAATTGATA ATATCTGC-3'	53	<i>BamHI</i>
OLL94 (Rv)	5'- CGGAATTCTCATTGGCCATTATAAACACCC- 3'	53	<i>EcoRI</i>
BlaR_SA_1	5'-GACTAAAATATATAATATTGCATG-3'		

Tabla II Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR.

5.4.8. PCR en colonia

Con el fin de verificar la presencia del inserto de interés en colonias transformantes, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa a partir de las distintas colonias aisladas de la placa de transformación. Las amplificaciones de fragmentos de ADN se llevaron a cabo en 20 µL de medio de reacción conteniendo 15 pmoles de cada oligonucleótido, 2 U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen), 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 50 mM de MgCl₂ y DNA molde. En este caso, no se incluyó ADN molde purificado, sino que se agregó una suspensión de células transformantes. Para ello se tocó una colonia

aislada en la placa con una punta estéril y se depositó en el fondo del tubo donde luego se agregó la mezcla de reacción. También, se realizó un asilado en placa de cada colonia.

Se utilizó un termociclador (MJ Mini™ Personal Thermal Cycle, BIORAD) con un programa que consistía en una desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido de 20 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a una temperatura variable, según las temperaturas de hibridación del par de cebadores usados en cada caso durante 30 s y 1 min de extensión a 72 °C, finalmente se realizó una extensión a 72 °C por 10 minutos.

5.4.9. Secuenciación de ADN

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (Estados Unidos). De acuerdo a los requerimientos del servicio, por cada reacción de secuenciación requerida se enviaron 15 µL de las muestras de ADN plasmídico a una concentración de 100 ng/µL, preparadas con el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Los genes clonados en el plásmido pET24a(+) y pET41a(+) se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos universales T7 Sequencing y T7 Terminator. Estos cebadores hibridan sobre las secuencias del promotor y del terminador de la transcripción para la ARN polimerasa T7, respectivamente. En el caso de los clonados de *blaR1(E202A)* y *TM3blaR1(E202A)*, se utilizó también el oligonucleótido *BlaR_SA_1*.

5.5. Preparación de células competentes

Para preparar células competentes de *E. coli* DH5α, se inoculó una colonia en medio líquido LB y se creció a 37 °C durante 16 h con agitación de 220 rpm. Luego, se realizó una dilución 1:100 del cultivo saturado en 250 mL de medio LB, y se lo dejó crecer a 37 °C con agitación, hasta alcanzar una $DO_{600nm} \sim 0,4$. Se centrifugaron las células (fraccionadas en tubos cónicos de 50 mL) durante 7 min a 1.600 g a 4 °C en centrífuga refrigerada Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific), se descartaron los sobrenadantes, y las células se resuspendieron en 60 mL de una solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM; glicerol 15 %; PIPES 1,62 g; pH 7; estéril) fría. Se centrifugaron nuevamente las células bajo las mismas condiciones, y se

resuspendieron en 15 mL de la solución de CaCl_2 fría. Se incubaron las células a 4 °C por 30 min. Se repitió la centrifugación, resuspendiendo en 2,5 mL de la solución de CaCl_2 fría. Luego, las células se almacenaron en alícuotas de 100 μL en tubos eppendorf, pre-enfriados en hielo, a -80 °C.

Para preparar células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), C41 (DE3) y C43 (DE3) para ser utilizadas en el día, se inoculó una colonia de las mismas en medio líquido LB y se creció a 37 °C durante 16 h con agitación de 220 rpm. Luego, se realizó una dilución 1:100 del cultivo saturado en 10 mL de LB y se lo dejó crecer a 37 °C con agitación de 220 rpm hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,4 - 0,5. Posteriormente, se separaron alícuotas de 1 mL y se centrifugaron 3 minutos a 1.600 g a 4 °C en centrífuga refrigerada Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific). El pellet se resuspendió en 0,5 mL de CaCl_2 0,1 M (estéril) frío y se volvieron a centrifugar por 3 minutos a 1.600 g 4 °C en centrífuga refrigerada. El pellet se resuspendió en 0,1 mL de CaCl_2 0,1 M (estéril) frío y se mantuvieron a 4 °C hasta el agregado del ADN a transformar.

5.6. Transformación de células competentes

Para transformar células de *E. coli* DH5 α , BL21 StarTM (DE3), C43 (DE3) y C41 (DE3) competentes, se adicionó a las mismas 1 μL de plásmido superenrollado concentrado (al menos 50 ng/ μL), o 10 μL de una mezcla de ligación, y se las incubó en hielo durante 1 h. Después se les aplicó un shock térmico de 90 s a 42 °C, seguido de 2 min en hielo, y se las incubó durante 1 h a 37 °C en medio LB con agitación para permitir su recuperación. Finalmente, las células se sembraron en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con el antibiótico para el cual confiere resistencia el plásmido transformado y se crecieron durante 16 h a 37 °C. Como control negativo se siguieron los mismos pasos, sin el agregado de ADN plasmídico.

5.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, con una concentración de poliacrilamida variable, según el ensayo realizado, para el gel de separación (12% o 16% P/V de Acrilamida-Bisacrilamida 30:0,8 en Tris:HCl 0,126 M pH 8,8, SDS 0,26% P/V) y 4,5% P/V para el gel de concentración (4,5% P/V de Acrilamida-Bisacrilamida 30:0,8% P/V en Tris:HCl 0,126 M pH 6,8, SDS 0,26 % P/V).

Las muestras de proteína fueron incubadas en Buffer de Siembra (glicerol 5% V/V, SDS 2% P/V, β -mercaptoetanol 0,1% V/V, azul de bromofenol 0,1 mg/mL), en un volumen equivalente a $DO_{600nm} \times 0.08 \times \mu L$ de cultivo con el objetivo de normalizar la cantidad final de células, durante 5 min a 100 °C para la desnaturalización de las mismas.

El sistema de electroforesis empleado fue el Miniprotean Tetra System (BIORAD). La corrida electroforética se realizó utilizando como solución reguladora Tris 0,3% P/V, glicina 1,44% P/V, y SDS 0,1% P/V, aplicando una corriente constante de 125 mV hasta que la corrida alcanza el gel de separación, luego se aplicó una corriente continua de 140 mV. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron fijados, calentándolos en agua hasta hervir, en microondas durante aproximadamente 10 minutos. Luego, fueron teñidos durante 2 minutos mediante el calentamiento en microondas en una solución de azul de Coomassie R250 al 1% (P/V) en metanol:ácido acético:agua (40:7:43). La decoloración del gel se llevó a cabo mediante lavados sucesivos con agua caliente.

Los marcadores de peso molecular utilizados se muestran en la (**Figura 5.2**).

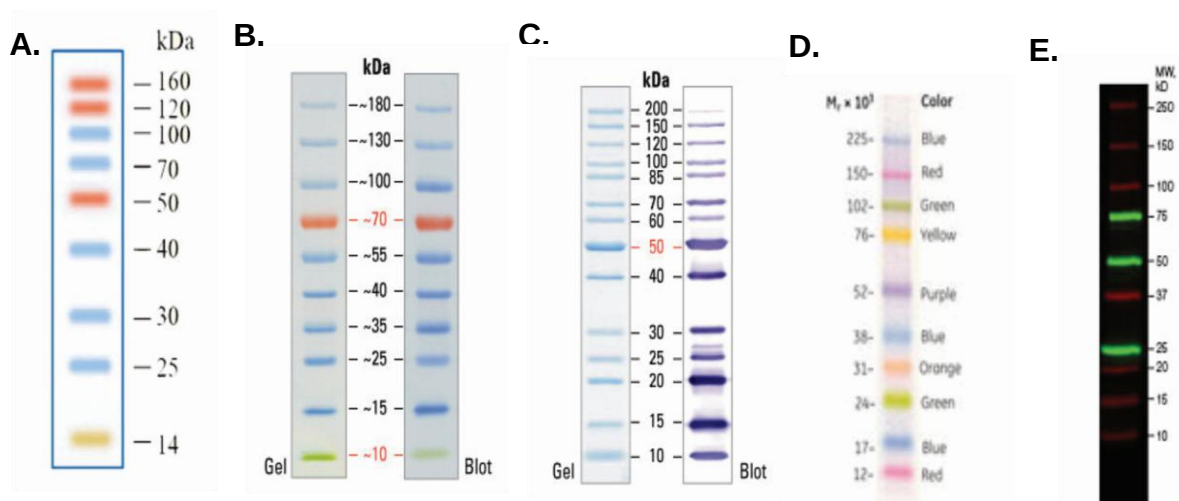


Figura 5.2 Marcadores de peso molecular utilizados para electroforesis en geles de poliacrilamida. A. Blue Plus III (Transgen Biotech); B. PageRuler Prestained (Thermo Fisher Scientific); C. PageRuler Unstained (Thermo Fisher Scientific); D. Rainbow (GE); E. Precision Plus WesternC (BioRad).

5.8. Ensayos de Western Blot

Las muestras de proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida de concentración variable según el ensayo realizado (12 o 16% P/V). Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, de

0,45 μ m, utilizando como medio de transferencia una solución conteniendo Tris 200 mM, glicina 150 mM y metanol 20% V/V. La transferencia se realizó utilizando el equipo Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (BIORAD), con el protocolo Standard SD: 1A, 25V, 30 min. La membrana se bloqueó posteriormente con una solución BLOTTO (Tris 100 mM; NaCl 150 mM; BSA 3%; leche en polvo descremada 3%; Azida de sodio 0,02%), incubando por 16 h a 4 °C. Luego de lavar 4 veces la membrana durante 10 min con 15 mL de T-TBS (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5, NaCl 0,6 M suplementado con TWEEN-20 0,1%) se incubó con el anticuerpo primario (en algunos casos conjugado a HRP - peroxidasa de rabanito), durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave en las concentraciones y en el medio detallado en la (**Tabla III**). En caso de ser necesario, se realizaron 4 lavados más de 10 min con 15 mL de T-TBS y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, conjugado a HRP o a Cy3, durante 1 h, a temperatura ambiente con agitación suave, en las concentraciones y el medio correspondiente (**Tabla III**). Seguido a esto, se efectuaron cuatro lavados de 10 min con 15 mL de T-TBS y se procedió al revelado de la membrana. El revelado final se realizó mediante incubación con 1,5 mL del reactivo quimioluminiscente SuperSignal™ West Dura (Thermo Fisher Scientific) o reactivo quimioluminiscente SuperSignal™ Pico (Thermo Fisher Scientific) según las indicaciones del proveedor, seguido de exposición de la membrana a una placa radiográfica CL-XPosure™ Film (Thermo Fisher Scientific) y, finalmente, revelado con revelador Kodak y fijado en solución fijadora Kodak. Como técnica alternativa para el revelado de membranas incubadas con un anticuerpo secundario conjugado a Cy3, la membrana se visualizó en el equipo Typhoon-FLA 7000, utilizando el filtro Cy3 y variando los potenciales de irradiación.

Anticuerpo	Dilución	Medio
Anti-6XHisTag-HRP Conjugated (Abcam, Ab1187)	1/10.000	T-TBS, leche 1,2%
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugated (Bio-Rad #161-0381)	1/5.000	T-TBS
Anti-BlaR ^{S 30} ; anticuerpo primario	1/1000	T-TBS
Anti-GroEL ⁵⁶ ; anticuerpo primario	1/10.000	T-TBS
Goat-Anti-Rabbit-Cy3 conjugated (A10520, Thermo Fisher Scientific); anticuerpo secundario	1/500	T-TBS, leche 1,2 %
Goat-Anti-Rabbit-HRP conjugated (#32460, Thermo Fisher Scientific); anticuerpo secundario	1/10.000 1/7.000	T-TBS, leche 1,2 %

Tabla III Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot.

5.9. Expresión y purificación de proteínas

5.9.1. Crecimiento de cultivos y ensayos de expresión de proteínas

Para la expresión de las proteínas recombinantes, en general, partimos de una placa fresca de transformación con el vector correspondiente, de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), C41 (DE3) o C43 (DE3). Se inocularon 3 mL de medio LB suplementado con Kanamicina 50 µg/mL, con 3 colonias transformantes aisladas y se incubó a 37 °C durante 16 h. Luego se realizó una dilución 1:100 del mismo, en 10 o 100 mL de medio LB suplementado con Kanamicina 50 µg/mL, en frascos de 125 mL o erlenmeyers de 500 mL, respectivamente, según el ensayo a desarrollar posteriormente, y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6 - 0,8, según el ensayo a realizar. En este punto, la expresión de la proteína se indujo por agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 o 1 mM, y se incubó a 20 °C, con agitación a 220 rpm durante 16 horas. También se probó incubar los cultivos a 37 °C, con agitación de 220 rpm durante 2 y 4 horas.

5.9.2. Preparación de extractos de proteínas de membrana

Se partió de 100 mL de cultivos de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) transformadas con el vector correspondiente e inducidas durante 16 h a 20 °C con la correspondiente concentración de IPTG. Se cosecharon las células por centrifugación durante 6 min a 6.200 *g* a 4 °C en centrífuga refrigerada Sorvall ST 16R (Thermo Fisher Scientific). Luego, se realizó un lavado con 25 mL de PBS 1X (10 mM NaH₂PO₄, 280 mM NaCl, 6 mM KCl, pH=7,4). Posteriormente, se resuspendieron las células en 5 mL del mismo buffer y se suplementó con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM y EDTA 0,01 mM. Después, se procedió a la ruptura de las células por sonicación. La muestra fue sometida a 5 pulsos con un 20 % de potencia en un sonicador de 600 Watts Sonics GEX-600 (Sonics & Materials). Cada pulso se aplicó durante 30 s, dejando intervalos de 90 s entre pulsos, manteniendo a la solución en un baño de agua:hielo. Este lisado se centrifugó durante 20 min a 6.200 *g* en centrífuga refrigerada a 4 °C. El pellet, conteniendo posibles cuerpos de inclusión, células sin romper y fragmentos grandes de membrana, se resuspendió en 5 mL de PBS 1X y se alicuotó una porción a la cual se le adicionó Buffer de Siembra 5X para SDS-PAGE. El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación durante 1 h a 150.000 *g* a 4 °C en una ultracentrífuga OptimaTM L-90K (Beckman Coulter), utilizando un rotor Ti90. Se separó el sobrenadante conteniendo la fracción de proteínas citoplasmáticas y de periplasma y se alicuotó una porción a la cual se le adicionó Buffer de Siembra 5X para SDS-PAGE. El pellet obtenido por ultracentrifugación, que contiene vesículas con las proteínas de membrana, se resuspendió en 500 µL PBS 1X con ayuda del Potter-Elvehjem PTFE pestle and glass tube (SIGMA). Luego se tomó una porción a la cual se le adicionó Buffer de Siembra 5X.

La cuantificación de proteínas totales en todas las fracciones, se realizó mediante un método colorimétrico, utilizando el Kit PierceTM BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific).

5.9.3. Ensayos de solubilización

Se tomaron alícuotas de 100 µL de la suspensión de membranas preparadas como se detalló en el apartado 5.9.2, y se incubaron con 200 µL de un stock de detergentes del kit ProteoPrep Detergent Sample (SIGMA-ALDRICH), de forma que la concentración final utilizada sea la que se detalla en la **Tabla IV**. La incubación se

realizó durante 16 h a 4 °C con agitación suave. Luego, se centrifugaron las muestras 30 min a 21.000 g en centrífuga refrigerada Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific), a 4 °C. El pellet, conteniendo la fracción no soluble se resuspendió en el mismo volumen de buffer de siembra 1X, mientras que a una alícuota de 100 µL del sobrenadante se le agregó 25 µL de buffer de siembra 5X.

Detergente	Descripción	Concentración Micelar Crítica (CMC) (% P/V)	Concentración utilizada (%P/V)
CHAPS	Zwitteriónico	0,37	3,7
C7BzO	Zwitteriónico	-	2
ASB-14	Zwitteriónico	-	2
n-Dodecyl-β-D-Maltosidasa (DDM)	No iónico	0,0075	0,5
Brij C10	No iónico	0,000136	0,5
SB310	Zwitteriónico	0,01	0,5
OG	No iónico	0,73	7,3
OTG	No iónico	0,003	0,5
Polyoxyrthylene 10 tridecyl ether (C ₁₃ E ₁₀)	No iónico	0,008	0,5
lauryldimethylamine-N-oxide (LDAO)	Zwitteriónico	0,5	0,5

Tabla IV Características de los detergentes del kit ProteoPrep Detergent Sample (SIGMA-ALDRICH) utilizados.

5.9.4. Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad

Para la purificación de H6X-Mistic-BlaR1JH1, se usó una columna de Ni-sefarosa. Se utilizó un volumen de columna (V_c = 500 µL) de la resina Ni Sepharose 6 Fast Flow 17531801 (GE Healthcare Life Sciences). La unión de la proteína a la resina se realizó en *batch*, es decir, se colocaron 500 µL de resina en un tubo eppendorf de 1,5 mL. En una primera instancia se lavó la resina con 2xV_c de agua destilada fría, se centrifugó 5 min a 500 g en centrífuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific), a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se centrifugó 5 min a 500 g nuevamente en centrífuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific), a 4 °C. Posteriormente, se realizó un lavado con 4xV_c de Buffer de Unión (PBS 1X, ASB-14 1%, NaCl 320 mM, pH 7,4, Imidazol 20 mM), se centrifugó 5 min a

500 g en centrifuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific), a 4 °C y se agregó la solución de membrana solubilizada, diluida en buffer PBS 1X suplementado con NaCl 500 mM, de manera tal que la concentración final de ASB-14 fuera del 1% y se incubó 1,5 h, con agitación suave a 4 °C.

La elución de la proteína de interés se realizó luego de empaquetar la resina en una jeringa de 5 mL con un filtro de papel Whatman. Al empaquetar la resina, se recolectó el sobrenadante, que es la fracción no unida a la resina (*flow-through*). Posteriormente, se realizaron 2 lavados con 2xVc de Buffer de Unión y se recolectaron las muestras. Seguido a ello, la proteína se eluyó empleando 1xVc de 4 Soluciones de Elución (PBS 1X, ASB-14 1%, NaCl 320 mM, pH 7,4), suplementados cada uno de ellos con una concentración creciente de Imidazol (50, 100, 250 y 500 mM) y se recolectaron las muestras luego de cada elución. Finalmente, se realizaron dos lavados con 1xVc de Buffer de Elución sin detergente (PBS 1X y 500 mM Imidazol).

5.9.5. Diálisis

Se procedió a realizar la diálisis de las muestras eluídas con 50 y 100 mM de imidazol, que fueron las fracciones en las cuales se detectó la proteína de interés en mayor proporción. Se juntaron las muestras eluídas con 50 y 100 mM de imidazol y se colocó una alícuota de 200 µL en un tubo eppendorf cerrado con una membrana de diálisis de 12,4 kDa de corte (Sigma 36H0858)⁵⁷. La muestra fue dializada contra 200 mL de un buffer compuesto por PBS 1X suplementado con NaCl 0,3 M, durante 16 h a 4 °C con agitación. Posteriormente se centrifugó la muestra dializada, durante 20 min a 6200 g, en centrifuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific), a 4 °C. El pellet (resuspendido en Buffer de siembra 1X para SDS-PAGE) y una alícuota del sobrenadante con cantidad adecuada de Buffer de Siembra 5X para SDS-PAGE, fueron analizados mediante SDS-PAGE. El sobrenadante también se cuantificó mediante un método colorimétrico, utilizando el Kit PierceTM BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) para poder estimar la concentración de proteína obtenida.

5.10. Ensayos de topología

5.10.1. Preparación de esferoplastos

Se partió de un cultivo saturado iniciado desde colonias transformantes aisladas de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) transformadas con el plásmido pET41_*H6X-mistic-TEV-blaR1JH1*. Se realizó una dilución 1:100 del mismo en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kanamicina). El cultivo se creció a 37 °C, 220 rpm, hasta una DO_{600nm} de 0,65 y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. El cultivo fue inducido durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm. Se tomó una alícuota de 500 µL del cultivo inducido. El resto se transvasó a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó 6 min a 6.200 g a 4 °C en centrifuga Sorval ST16R (Thermo Fisher Scientific). Seguidamente, se resuspendió el pellet en 2 mL de Buffer 1 (Tris 20 mM pH 8, NaCl 150 mM) y se volvió a centrifugar 6 min a 6.200 g a 4°C. Luego, se resuspendió el pellet en un volumen $V = DO_{600nm} \times \text{mL de cultivo} \times 100 \mu\text{L}$, de Buffer 2 (Tris 20 mM pH 8, EDTA 0,1 mM, 20 % sacarosa), que se suplementó con lisozima (concentración final 1 mg/mL) y PMSF (concentración final 0,5 mM), y se incubó durante 30 min con agitación suave, a 4 °C. Posteriormente se centrifugó 4 min a 6.200 g a 4 °C en centrifuga Sorval ST16R (Thermo Fisher Scientific) y el pellet se resuspendió en un volumen V de Buffer 3 (Tris 20 mM pH 8, sacarosa 20 %). Finalmente se realizó otra centrifugación de 4 min a 6.200 g a 4 °C en centrifuga Sorval ST16R (Thermo Fisher Scientific)) y el pellet se resuspendió en un volumen V de Buffer de Proteólisis (Tris 20 mM pH 8, CaCl₂ 10 mM).

5.10.2. Ensayo de susceptibilidad a Proteinasa K

Inicialmente se preparó una muestra de esferoplastos como se explicó en la Sección 5.10.1. Se separaron cinco alícuotas de 140 µL. A una de ellas se le agregó directamente Buffer de Siembra 5X para SDS-PAGE (esferoplastos a tiempo 0 min) y el resto fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 min con distintas concentraciones de Proteinasa K (0, 100, 500, 1000 µg/mL). La reacción se frenó mediante el agregado de PMSF en una concentración final de 5 mM, con el fin de inhibir la actividad de la Proteinasa K, y las muestras luego se centrifugaron 3 min a 4.700 g a 4 °C en centrifuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific), se resuspendió el pellet en Buffer de Siembra 1X y se agregó nuevamente PMSF en una concentración final de 5 mM. Las muestras se hirvieron por 5 minutos con el fin

de inhibir la actividad de la Proteinasa K y desnaturalizar las proteínas, para luego ser resueltas por SDS-PAGE.

5.10.3. Ensayos de unión al antibiótico Bocilina-FL

Inicialmente se preparó una muestra de esferoplastos como se explicó en la Sección 5.10.1, con la diferencia de que antes de resuspender el pellet en un volumen V de Buffer de proteólisis, este se resuspendió en un volumen V/3 de Buffer de proteólisis para obtener una muestra más concentrada y se tomó una alícuota de 80 μ L para el ensayo de unión a Bocilina-FL (Invitrogen). Se alicuotaron 3 muestras de 25 μ L. Todas ellas fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos en diferentes condiciones: una en ausencia de Bocilina-FL; las otras dos con Bocilina-FL en una concentración final de 10 μ M, pero una de ellas fue incubada con agitación para producir la ruptura de los esferoplastos. Luego del ensayo, se agregó un volumen adecuado de Buffer de Siembra 5X, para luego resolver las proteínas de la muestra mediante SDS-PAGE. Las proteínas unidas al antibiótico fluorescente Bocilina-FL fueron visualizadas mediante escaneo del gel sin teñir en el equipo Typhoon-FLA 7000 (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente, el gel fue tenido con Coomassie para visualizar las proteínas totales.

6. Resultados y Discusión

6.1. Evaluación de la expresión, purificación y topología de la proteína BlaR1JH1 como fusión a Mystic

6.1.1. Construcción del plásmido pET41a(+)_H6x-mistic-TEV-blaR1JH1

En el laboratorio se contaba con el gen sintético *blaR1JH1* optimizado para la expresión en *E. coli* (GenScript), que codifica para la proteína BlaR1JH1 de la cepa de *S. aureus* JH1. Previo al inicio de este trabajo, el gen *blaR1JH1*, junto con el sitio TEV introducido en el extremo 5' del mismo, fue amplificado por PCR empleando oligonucleótidos que introducían un sitio *BglII* en 5' y *BamHI* en 3'. La construcción fue clonada en el vector pET41a(+) digerido con *BglII*. A partir del plásmido pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1* se procedió a la construcción del plásmido pET41a(+)_H6x-mistic-TEV-*blaR1JH1*, que permitiría la expresión de la proteína BlaR1JH1 como fusión a Mystic (Mistic-BlaR1JH1).

El gen que codifica para la proteína Mystic fue amplificado por PCR utilizando el vector pET15b_*mistic* como molde y los cebadores OLL_29 y OLL_30 diseñados de manera tal que introdujeran los sitios de restricción *NdeI* y *BglII* en los extremos 5' y 3' respectivamente, lo cual permite la inserción en fase del gen de interés en el plásmido pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1* (**Figura 6.1**). Además, el cebador OLL_29 fue diseñado para permitir la introducción de una secuencia que codifica para una cola de poli-histidina (H6x o His-tag) en el extremo N-terminal del gen *mistic*, la cual podría ser utilizada para la posterior detección y purificación de la proteína de interés.

La mezcla conteniendo el producto de PCR fue sembrada en un gel de agarosa al 1% (**Figura 6.2 A**) y se purificó la banda correspondiente al gen *H6x-mistic* amplificado. El inserto purificado fue luego digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BglII* (Promega). Se realizó una única digestión ya que las endonucleasas empleadas comparten el mismo medio de reacción. Luego de la digestión, la mezcla fue sembrada en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de

ADN resultante (355 pb) fue purificado a partir del gel realizando el corte de la banda de interés.

La digestión del vector pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1* con las enzimas de restricción *NdeI* y *BglII* (Promega), libera el fragmento de ADN correspondiente a la proteína GST. El vector fue digerido simultáneamente con las enzimas de restricción *NdeI* y *BglII* (Promega). Luego de la digestión, la mezcla fue sembrada en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de ADN correspondiente al vector pET41a(+)_*blaR1JH1* *NdeI/BglII*, de aproximadamente 6380 pb, fue purificado a partir del gel (**Figura 6.2 B**).

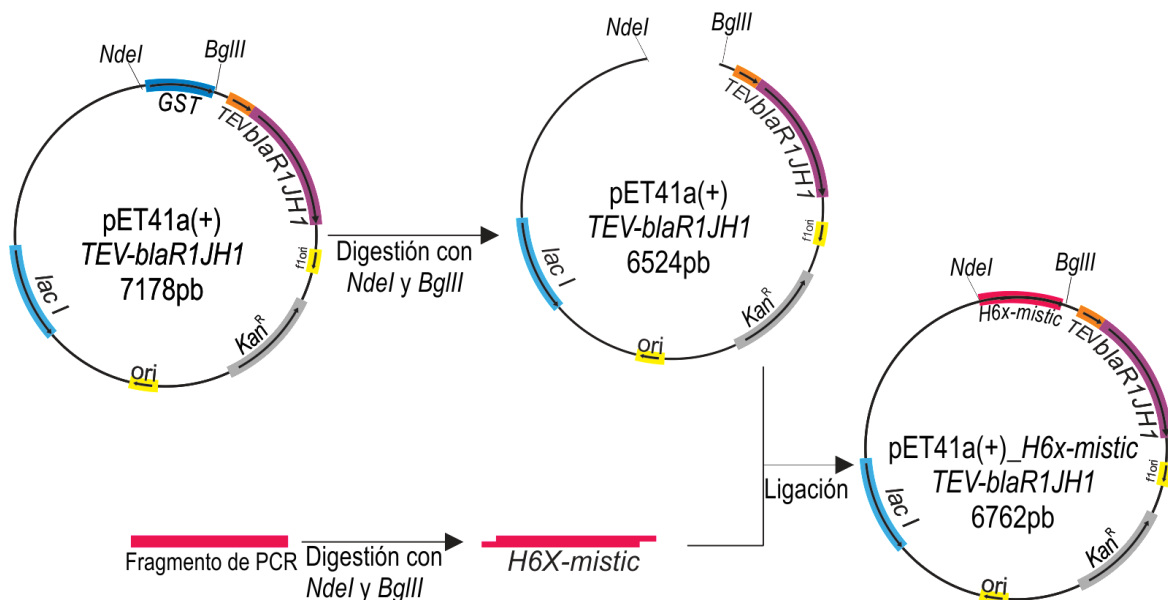


Figura 6.1. Esquema de la estrategia de clonado empleada para la construcción del vector pET41a(+)_H6X-mistic-TEV-*blaR1JH1*.

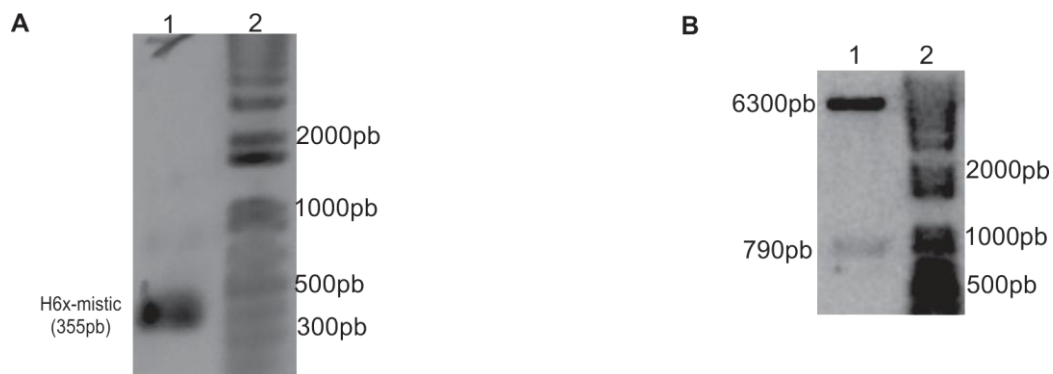


Figura 6.2. Fragmentos de ADN resultantes de la digestión con enzimas de restricción. Alícuotas de cada una de las reacciones de digestión con enzimas de restricción adecuadas fueron resueltas en gels de agarosa 1%, visualizado con Syber Safe DNA gel stain. **A.** Producto de la reacción de PCR para amplificar el gen *H6x-mistic*. **1-** producto de PCR

digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BglII*; **2-** Marcador de peso molecular, 1 Kbp Plus. **B.** Vector pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1* luego de ser digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BglII*. **1-** vector pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1* luego de haber sido sometido a digestión con las enzimas *NdeI* y *BglII*. Se observa una banda correspondiente al fragmento del gen *gst* (aproximadamente 790 pb) liberado luego de la digestión y una banda correspondiente al vector pET41a(+)_TEV-*blaR1JH1* linealizado (aproximadamente 6300 pb). **2-** Marcador de peso molecular, 1 Kbp Plus.

Ambos fragmentos digeridos y purificados fueron cuantificados midiendo absorbancia a 260 nm. Luego, se procedió a la ligación de los mismos utilizando una relación 7:1 de inserto:plásmido (50 ng de vector y 350 ng de inserto). Una alícuota de la mezcla de ligación fue utilizada para la transformación de células de *E. coli* DH5 α competentes. Como control se religó el vector solo. Se seleccionaron colonias transformantes en placas con LB-Agar-Kanamicina (Kan). Se verificó la presencia del inserto en algunas colonias transformantes por PCR en colonia y se seleccionaron 2 colonias positivas para realizar preparaciones de ADN plasmídico y verificar la presencia del inserto de interés mediante digestión con las enzimas *NdeI/BglII* y *NdeI/XhoI* (**Figura 6.3**). El ADN de ambas colonias fue secuenciado, lo que permitió corroborar la correcta secuencia del gen *H6x-mistic-TEV-blaR1JH1* y el clonado en fase.

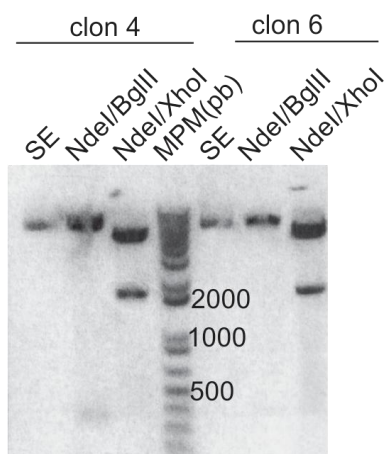


Figura 6.3. Verificación de la presencia del inserto *H6x-mistic* y *H6x-mistic-TEV-blaR1JH1* en los plásmidos aislados de colonias *E. coli* DH5 α transformadas con la mezcla de ligación, que dieron positivas en la PCR en colonia. En cada caso se resolvió una alícuota de la mezcla de digestión en un gel de agarosa 1%, visualizado con Syber Safe DNA gel stain. **SE-** pET41a(+)_*H6x-mistic-TEV-blaR1JH1*, superenrollado. ***NdeI/BglII*-** Clon correspondiente digerido con las enzimas *NdeI* y *BglII*, la banda correspondiente al fragmento *H6x-mistic* (355 pb) puede que no se haya logrado observar debido a su bajo peso molecular. ***NdeI/XhoI*-** Clon correspondiente digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, se observa una banda

correspondiente al fragmento *H6x-mistic-TEV-blaR1JH1* (aproximadamente 1775 pb). **MPM-** Marcador de peso molecular, 1 Kbp Plus.

6.1.2. Evaluación de las condiciones de expresión de la proteína *Mistic-BlaR1JH1* utilizando distintas cepas

Se prepararon células competentes de las cepas *E. coli* BL21 StarTM (DE3), C41 (DE3) y C43 (DE3), empleando el método de CaCl₂ y las mismas fueron transformadas con el plásmido pET41a(+)_*H6x-mistic-TEV-blaR1JH1*. A partir de cultivos saturados iniciados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una

dilución 1:100 de los mismos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta una DO_{600nm} aproximadamente igual a 0,8 - 0,9 y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. Se probaron tres condiciones de inducción diferentes; esta se realizó durante 2 y 4 h a 37 °C, con una agitación de 220 rpm y también durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm (**Figura 6.4**).

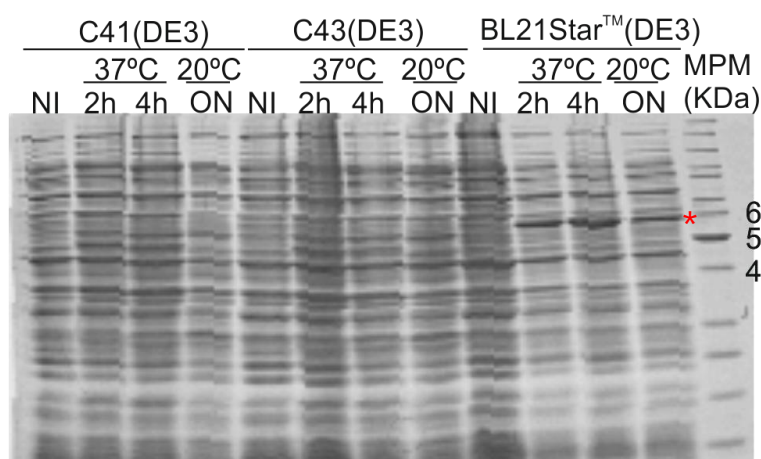


Figura 6.4. Evaluación de las condiciones de expresión de Mistic-BlaR1JH1 utilizando distintas cepas, tiempos y temperaturas de inducción.

Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3), pET41a(+)_{H6x-mistic-TEV-blaR1JH1} fueron

resueltas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomassie. **NI**: extractos de proteínas totales del cultivo no inducido. **2 h**: extractos de proteínas totales del cultivo inducido durante 2 h, 37 °C, 220 rpm. **4 h**: extractos de proteínas totales del cultivo inducido durante 4 h, 37 °C, 220 rpm. **ON**: extractos de proteínas totales del cultivo inducido durante 16 h, 20 °C, 220 rpm. **MPM**: Marcador de peso molecular, PageRuler Unstaine. Todas las inducciones se realizaron a DO_{600nm} aproximadamente igual a 0,8 - 0,9 y empleando una concentración final de IPTG igual a 1 mM. En todas las calles se sembró un total de 2x10⁸ células. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa).

En la **Figura 6.4**, puede observarse que la proteína Mistic-BlaR1JH1 (peso molecular 63 kDa) se sobre-expresó utilizando la cepa BL21 StarTM (DE3). A partir de este ensayo seleccionamos como cepa de trabajo para la sobre-expresión de la proteína de interés a *E. coli* BL21 StarTM (DE3) y nos propusimos continuar estudiado otras condiciones de inducción.

6.1.3. Evaluación de la densidad óptica óptima para la expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1

Se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) con el plásmido pET41a(+)_{H6x-mistic-TEV-blaR1JH1} y con el plásmido pET41a(+), utilizado como control negativo, empleando el método de CaCl₂. A partir de cultivos saturados iniciados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de cada uno de ellos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta la DO_{600nm}

propuesta (se propusieron 3 valores de DO_{600nm} : 0,65, 0,8 y 0,9) y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 0,5 mM. Los cultivos fueron inducidos durante 4 h a 37 °C y durante 16 h a 20 °C, según los resultados obtenidos en la **Figura 6.4**, con una agitación de 220 rpm en ambos casos.

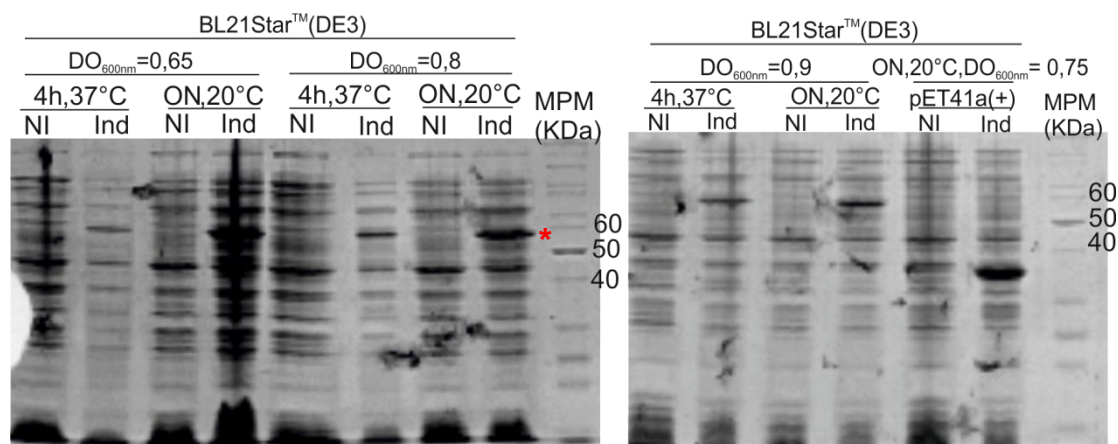


Figura 6.5. Evaluación de la densidad óptica (DO_{600nm}) óptima para la expresión de la proteína Mystic-BlaR1JH1. Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/pET41a(+)_H6x-mistic-TEV-blaR1JH1 y pET41a(+), obtenidas de cultivos inducidos durante 4 h a 37 °C y 16 h a 20 °C, a tres DO_{600nm} diferentes (0,65, 0,8 y 0,9), fueron resultas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomasie. **NI**: extractos de proteínas totales del cultivo no inducido. **Ind**: extracto de proteínas totales del cultivo inducido, con una concentración final de IPTG de 0,5 mM. En todas las calles se sembró un total de 2×10^8 células. **MPM**: Marcador de peso molecular, PageRuler Unstained. Con el * se marca a la proteína Mystic-BlaR1JH1 (63 kDa).

En la **Figura 6.5** puede observarse que la proteína Mystic-BlaR1JH1 (63 kDa), se sobre-expresó en todas las condiciones planteadas. Sin embargo, seleccionamos como condición de inducción para los próximos ensayos de sobre-expresión, DO_{600nm} de 0,65, temperatura 20 °C y período de inducción 16 h, ya que es la condición en la que se observó mayor sobre-expresión de la proteína de interés.

6.1.4. Evaluación de la concentración óptima de inductor (IPTG) para la expresión de la proteína Mystic-BlaR1JH1

Se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) con el plásmido pET41a(+)_H6x-mistic-TEV-blaR1JH1, empleando el método de $CaCl_2$. A partir de cultivos saturados iniciados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de cada uno de ellos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta la DO_{600nm} de 0,65 (seleccionada anteriormente, Sección 6.1.3) y luego se agregó el

inductor (IPTG) en dos concentraciones finales diferentes, 0,5 mM y 1 mM. Los cultivos fueron inducidos durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm (**Figura 6.6**). Además, se realizó el mismo ensayo pero, transformando células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) y *E. coli* BL21 (DE3) para comparar los niveles expresión en estas cepas (**Figura 6.7**).

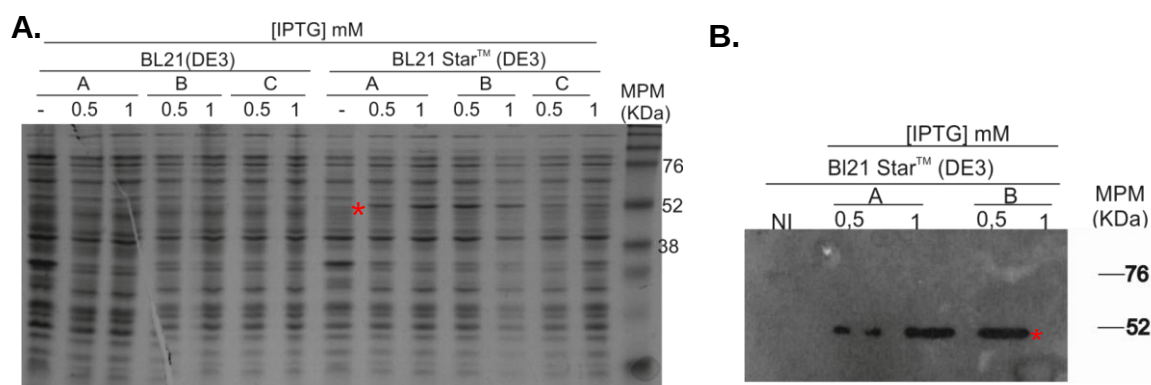
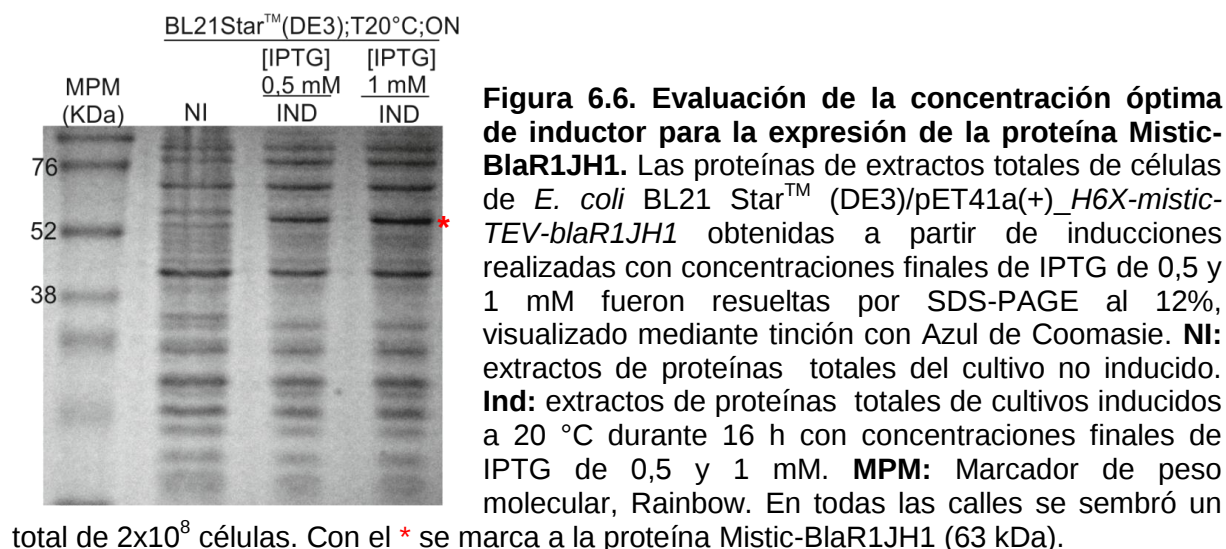


Figura 6.7. Evaluación de la concentración óptima de inductor para la expresión de la proteína Mystic-BlaR1JH1 en BL21 StarTM (DE3) y BL21 (DE3). A- Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/pET41a(+)_{H6X-mistic-TEV-blaR1JH1} y BL21 (DE3)/pET41a(+)_{H6X-mistic-TEV-blaR1JH1} obtenidas a partir de inducciones realizadas con concentraciones finales de IPTG de 0,5 y 1 mM, fueron resueltas por SDS-PAGE al 12%, visualizado mediante tinción con Azul de Coomassie. **(-):** extracto de proteínas totales del cultivo no inducido. **0,5 y 1:** extracto de proteínas totales de cultivos inducidos a 20 °C durante 16 h con concentraciones finales de IPTG de 0,5 y 1 mM, respectivamente. **MPM:** Marcador de peso molecular, Rainbow. En todas las calles se sembró un total de 2×10^8 células. **B-** Detección de Mystic-BlaR1JH1 en los extractos de células totales de los cultivos de BL21 StarTM (DE3)/pET41a(+)_{H6X-mistic-TEV-blaR1JH1} colonias A y B mediante Western Blot (gel de poliácridamida al 12% transferido a una membrana de nitrocelulosa). Se utilizó como anticuerpo primario, anti-BlaR^S (dilución 1/1.000) y como anticuerpo secundario, goat-anti-rabbit-HRP conjugated (dilución 1/10.000). El revelado se realizó con el reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Dura. La

detección también se intentó realizar utilizando el anticuerpo anti-His-tag-HRP, debido a la presencia de una cola de histidina N-terminal, pero no fue posible detectar la proteína. En todas las calles se sembró un total de 2×10^8 células. Con el * se marca a la proteína Mystic-BlaR1JH1 (63 kDa).

Como se observa en la **Figura 6.7**, la proteína Mystic-BlaR1JH1 (63 kDa) se sobre-expresó cuando la inducción fue realizada utilizando la cepa BL21 StarTM (DE3), no así cuando se utilizó la cepa BL21 (DE3). Además, como se observa en las **Figura 6.6** y **Figura 6.7**, la proteína de interés se sobre-expresó utilizando tanto 0,5 como 1 mM de IPTG como concentración final, pero la inducción fue mayor al utilizar una concentración final de inductor de 1 mM (para la colonia A). Por lo tanto, decidimos continuar trabajando con la cepa BL21 StarTM (DE3) y realizar la inducción con una concentración final de IPTG de 1 mM.

6.1.5. Evaluación de la localización sub-celular de la proteína Mystic-BlaR1JH1

Con el objetivo de determinar la localización sub-celular de la proteína Mystic-BlaR1JH1 sobre-expresada en *E. coli*, se procedió a realizar una preparación de proteínas de membrana (Sección 5.9.2), ya que es el sitio donde esperamos encontrarla. Se tomaron alícuotas de cada fracción obtenida durante la preparación.

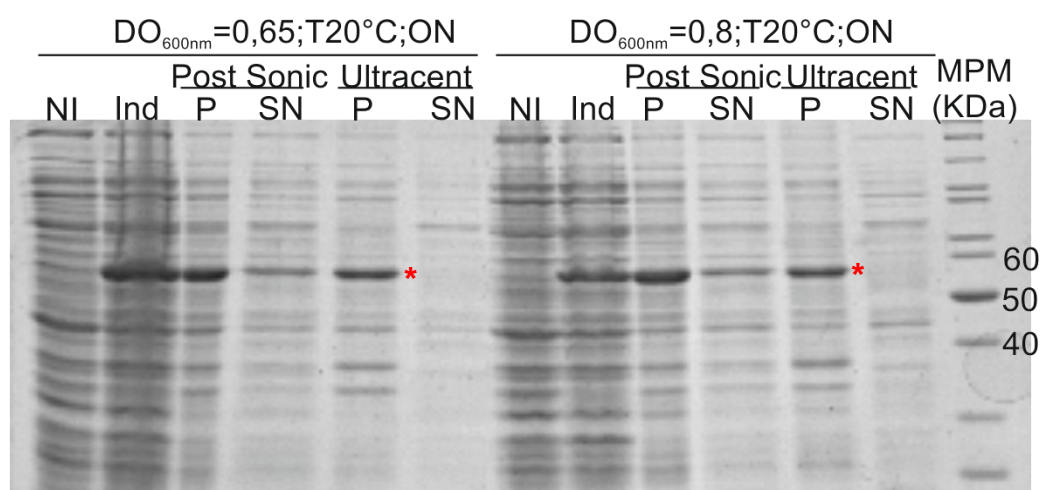


Figura 6.8. Evaluación de la localización sub-celular de la proteína Mystic-BlaR1JH1. Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/pET41a(+)_{H6X-mistic-TEV-blaR1JH1} fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomassie. **NI**: extractos de proteínas totales del cultivo no inducido (se sembró un total de 2×10^8 células). **Ind**: extracto de proteínas totales de cultivos inducidos a DO_{600nm} de 0,65 y 0,8, a 20 °C, durante 16 h con concentración final de IPTG de 1 mM (se sembró un total de 2×10^8 células). **Post Sonic P**: pellet obtenido en la centrifugación post-sonicada (cuerpos de inclusión, células intactas y fragmentos grandes de membrana). **Post Sonic SN**: sobrenadante obtenido en la centrifugación post-sonicada (proteínas solubles y proteínas de membrana). **Ultracent P**: pellet obtenido luego de la ultracentrifugación (proteínas de membrana). **Ultracent SN**: sobrenadante obtenido luego de la

ultracentrifugación (proteínas solubles). En todas las calles se sembraron 5 µg de proteínas totales, donde la cantidad de muestra a sembrar fue calculada a partir de la construcción de una curva de calibración utilizando el Kit Pierce™ BCA Protein Assay. **MPM**: Marcador de peso molecular, PageRuler Unstained. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa).

Como se observa en la **Figura 6.8**, la proteína Mistic-BlaR1JH1 sobre-expresada en *E. coli* BL21 Star™ (DE3), se encuentra en gran proporción en membrana, lo que indica una sobre-expresión exitosa de esta proteína de membrana de *S. aureus*. Sin embargo, también se detectó que parte de la proteína de interés se encontraba en la fracción correspondiente al pellet obtenido luego de la centrifugación del extracto sonificado (Post Sonic P), indicándonos que ésta podría localizarse parcialmente en cuerpos de inclusión, en células sin romper y/o en grandes fragmentos de membrana.

6.1.6. Determinación de las condiciones de solubilización de Mistic-BlaR1JH1, a partir de preparaciones de membrana de *E. coli* BL21 Star™ (DE3)

Con el fin de purificar la proteína Mistic-BlaR1JH1 de las membranas de *E. coli* donde se había logrado sobre-expresarla, se procedió en una primera instancia a evaluar condiciones que permitan solubilizarla. Se evaluaron diez detergentes, utilizando la concentración final de cada uno de ellos sugerida por el fabricante (Kit ProteoPrep Detergent Sample (SIGMA-ALDRICH)). La solubilización se llevó a cabo como se explica en la Sección 5.9.3, incubando 100 µL de suspensiones de preparación de membrana de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) que contenían la proteína de interés, con 200 µL de una solución del correspondiente detergente a una concentración 1.5 X durante 16 h a 4 °C con agitación suave.

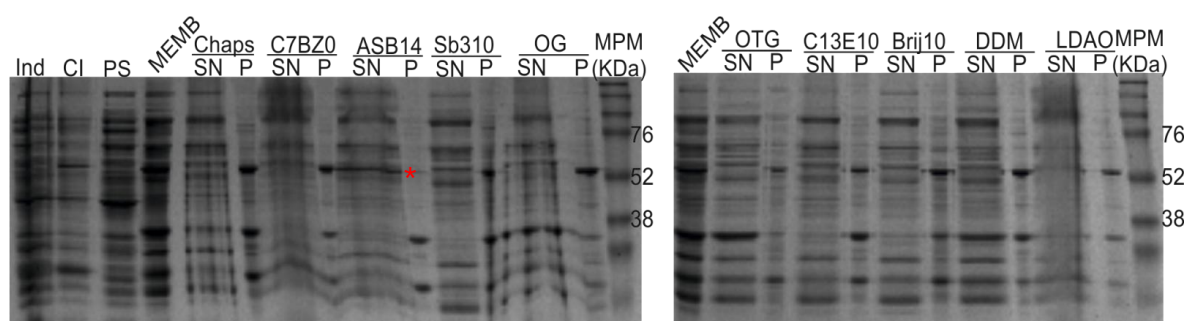


Figura 6.9. Solubilización de Mistic-BlaR1JH1 a partir de preparaciones de membrana utilizando diferentes detergentes. Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 Star™ (DE3)/pET41a(+)_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1 fueron resueltas mediante SDS-

PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomasie. **Ind:** extractos de proteínas totales de cultivos inducidos a DO_{600nm} de 0,65, a 20 °C, durante 16 h con concentración final de IPTG de 1 mM (se sembró un total de 2×10^8 células). **CI:** pellet obtenido en la centrifugación post-sonicado (cuerpos de inclusión, células intactas y fragmentos grandes de membrana). **PS:** sobrenadante obtenido en la centrifugación post-sonicado (proteínas solubles y proteínas de membrana). **MEMB:** fracción de membrana antes del tratamiento con detergente (pellet obtenido luego de la ultracentrifugación). En las calles **CI**, **PS** y **MEMB** se sembraron 20 µg de proteínas totales, donde la cantidad de muestra a sembrar fue calculada a partir de la construcción de una curva de calibración utilizando el Kit Pierce™ BCA Protein Assay. **Chaps:** membrana tratada con Chaps 3,7% P/V. **C7BZ0:** membrana tratada con C7BZ0 2% P/V. **ASB-14:** membrana tratada con ASB14 2% P/V. **Sb310:** membrana tratada con Sb310 0,5% P/V. **OG:** membrana tratada con OG 7,3% P/V. **OTG:** membrana tratada con OTG 0,5% P/V. **C13E10:** membrana tratada con C13E10 0,5% P/V. **Brij-C-10:** membrana tratada con Brij-C-10 0,5% P/V. **DDM:** membrana tratada con DDM 0,5% P/V. **LDAO:** membrana tratada con LDAO 0,5% P/V. En todos los casos, **SN:** sobrenadante obtenido luego de centrifugar la membrana tratada. **P:** pellet obtenido luego de centrifugar la membrana tratada. Para todos los detergentes la cantidad sembrada fue el triple que la cantidad correspondiente a la fracción de membrana sin tratar. **MPM:** Marcador de peso molecular, Rainbow. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa).

Como se observa en la **Figura 6.9**, la solubilización de la proteína de interés se logró utilizando el detergente ASB-14 en una concentración final de 2% P/V. Este fue el único detergente que permitió obtener la mayor proporción de proteína en el sobrenadante respecto del pellet, luego del tratamiento. Por lo tanto, se decidió utilizar este detergente en los experimentos posteriores de purificación.

6.1.7. Purificación de la proteína Mistic-BlaR1JH1 mediante cromatografía de afinidad

Dado que la proteína Mistic-BlaR1JH1 posee una cola de poli-histidina (H6X) en su extremo N-terminal, se empleó una resina de Níquel Sefarosa (Ni-Sepharose, GE Healthcare Life Sciences), con el objetivo de lograr su purificación mediante cromatografía de afinidad. La purificación se realizó como se explica en la Sección 5.9.4.

A partir de la inducción de la proteína de interés en un cultivo de 100 mL, se procedió a la preparación de proteínas de membrana que luego fueron solubilizadas en ASB-14 2% P/V por 16 h a 4 °C, con agitación suave. Posteriormente se realizó una centrifugación de 30 min a 21.000 g y 4 °C, para poder separar el pellet del sobrenadante con la fracción solubilizada de la proteína de interés. Esta última, fue luego incubada con la resina de Níquel Sefarosa durante 1,5 h a 4 °C con agitación suave. La resina fue empacada en una columna, y se recolectó el sobrenadante donde se encontraba la fracción de proteína no unida a la resina (*flow-*

through). Posteriormente se realizaron dos lavados con dos volúmenes de columna de Buffer de Unión, conteniendo una concentración final de imidazol de 20 mM. Luego, se realizaron eluciones utilizando un volumen de columna de cada una de las soluciones de concentración creciente de imidazol siendo las mismas 50, 100, 250 y 500 mM.

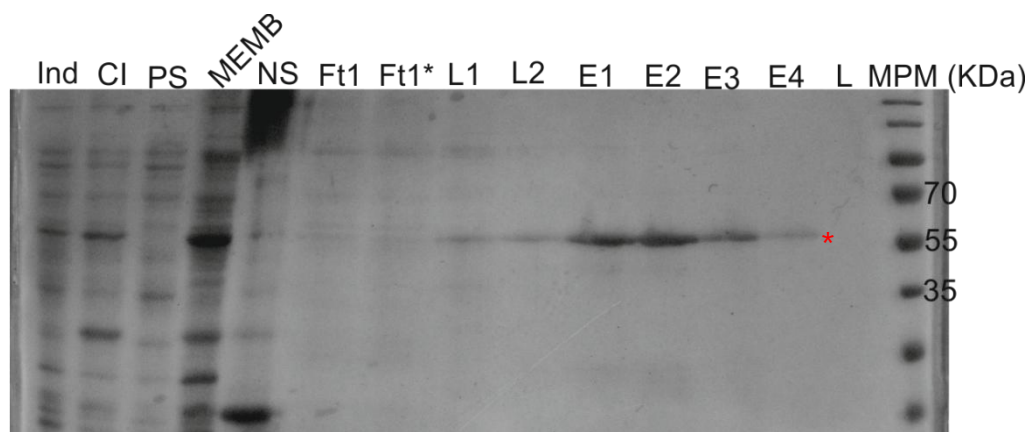


Figura 6.10. Purificación de Mistic-BlaR1JH1 mediante cromatografía de afinidad, empleando una resina de Níquel Sefarosa. SDS-PAGE al 12 %, de las fracciones de proteínas obtenidas durante la preparación de membrana y la purificación de Mistic-BlaR1JH1, visualizado por tinción con Azul de Coomasie. **Ind:** extractos de proteínas totales del cultivo inducido a DO_{600nm} de 0,65, 20 °C, durante 16 h con concentración final de IPTG de 1 mM (se sembró un total de 2×10^8 células). **CI:** pellet obtenido en la centrifugación post-sonicado (cuerpos de inclusión, células intactas y fragmentos grandes de membrana). **PS:** sobrenadante obtenido en la centrifugación post-sonicado (proteínas solubles y proteínas de membrana). **MEMB:** fracción de proteínas de membrana antes del tratamiento con detergente (pellet obtenido luego de la ultracentrifugación). En las calles **CI**, **PS** y **MEMB** se sembraron 20 μ g de proteínas totales, donde la cantidad de muestra a sembrar fue calculada a partir de la construcción de una curva de calibración utilizando el Kit PierceTM BCA Protein Assay. **NS:** fracción de proteína no solubilizada con ASB-14 2% P/V. **Ft1 y Ft1*:** flow-through, proteínas no unidas a la resina. **L1 y L2:** lavados de la columna, realizados con Buffer de Unión conteniendo una concentración final de imidazol de 20 mM. **E1- 4:** eluciones de la proteína de interés unida a la resina, utilizando concentraciones finales de imidazol de 50, 100, 250 y 500 mM, respectivamente. **L:** lavado final de la columna, utilizando buffer sin detergente con imidazol 500 mM. Para todas las fracciones de columna, se sembraron 30 μ L de muestra por calle. **MPM:** Marcador de peso molecular, PageRuler Prestained. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa).

Como se observa en la **Figura 6.10**, la solubilización de la proteína Mistic-BlaR1JH1 a partir de preparaciones de membrana, utilizando el detergente ASB-14 en una concentración final de 2% P/V fue completa, ya que no se detectó la presencia de la misma en la fracción de proteínas no solubles (NS, calle 5) luego de la solubilización y posterior centrifugación. Por otra parte, la proteína Mistic-BlaR1JH1 pudo purificarse en mayor proporción utilizando las Soluciones de Elución que contenían concentraciones finales de imidazol 50 y 100 mM, respectivamente

(E1 y E2, calles 10 y 11). Sin embargo, parte de la proteína de interés también fue perdida durante los primeros dos lavados, utilizando Buffer de Unión que contenían una concentración final de imidazol 20 mM (L1 y L2, calles 8 y 9).

Se juntaron las fracciones con proteína eluída con 50 y 100 mM de imidazol, que, como se observó en la **Figura 6.10**, fueron las fracciones en las cuales se detectó la proteína de interés en mayor proporción y se procedió a realizar una diálisis de las mismas para luego poder cuantificar la cantidad de proteína purificada. La diálisis se realizó como se explica en la Sección 5.9.5, incubando 200 μ L de muestra contra 200 mL de un buffer compuesto por PBS 1X, suplementado con NaCl 0,3 M, durante 16 h a 4 °C, con agitación. Posteriormente se procedió a centrifugar la muestra dializada, durante 20 min a 4 °C a 6200 g, para poder separar la proteína soluble de proteínas que pudieran haber precipitado durante la diálisis.

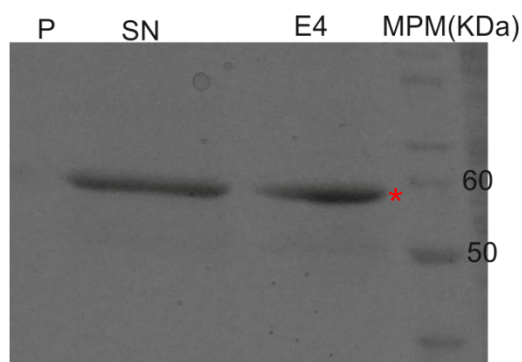


Figura 6.11. Diálisis de las fracciones obtenidas durante la purificación. SDS-PAGE al 12%, de las fracciones eluídas con 50 y 100 mM de imidazol dializadas contra buffer compuesto por PBS 1X suplementado con NaCl 0,3 M, visualizado por tinción con Azul de Coomassie. **P:** pellet obtenido en la centrifugación posterior a la diálisis. **SN:** sobrenadante obtenido en la centrifugación posterior a la diálisis. **E4:** fracción eluída en la purificación utilizando imidazol 500 mM. En todos los casos se sembraron 30 μ L de muestra. **MPM:**

Marcador de peso molecular, PageRuler Unstained. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa).

La proteína Mistic-BlaR1JH1, luego de ser dializada y centrifugada, se encontró en mayor proporción en la fracción soluble (**Figura 6.11**). Posteriormente, se procedió a realizar la cuantificación de la misma a partir de la construcción de una curva de calibración utilizando el Kit Pierce™ BCA Protein Assay, obteniéndose una concentración final de 0,08 μ g/ μ L. Por lo tanto, pudimos estimar que el rendimiento fue de 0,8 mg por litro de cultivo.

6.1.8. Puesta a punto del revelado de Western Blot empleando un anticuerpo secundario fluorescente

Como se mostró en la **Figura 6.7** y a lo largo de este trabajo, se realizaron distintos ensayos de Western Blot utilizando el anticuerpo primario Anti-BlaR^S (específico para el dominio sensor de la proteína BlaR1), obtenido de conejo, y como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra específico para detectar IgG de

conejo, conjugado a peroxidasa de rabanito (*goat-anti-rabbit-HRP conjugated*). En estos casos, el revelado se realizó con el reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Pierce). Debido a la falta de este reactivo, fue necesario poner a punto una forma alternativa de revelado utilizando el mismo anticuerpo primario. Por lo tanto, se decidió utilizar como anticuerpo secundario, un anticuerpo de cabra específico para detectar IgG de conejo, conjugado a compuesto fluorescente anaranjado Cy3[®] (*goat-anti-rabbit-Cy3 conjugated*), el cual nos permitiría visualizar las bandas de proteína que reaccionan con el anticuerpo primario empleando el escáner de fluorescencia Typhoon-FLA 7000, excitando a 532 nm y utilizando el filtro de emisión para Cy3.

Para poner a punto esta técnica se realizaron ensayos de inducción utilizando las condiciones en las cuales se daba la expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1, es decir, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) con el plásmido pET41a(+)_H6x-mistic-TEV-blaR1JH1. A partir de cultivos saturados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de cada uno de ellos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta la DO_{600nm} 0,65, luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. Los cultivos fueron inducidos durante 16 h a 20 °C. Se probaron distintas diluciones de los anticuerpos primario y secundario para poder detectar la presencia de la proteína de interés.

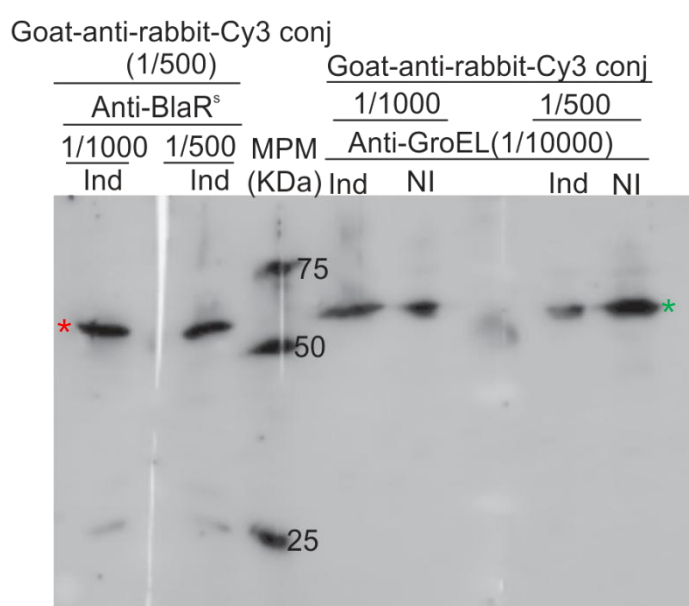


Figura 6.12. Puesta a punto revelado de Western Blot empleando un anticuerpo secundario fluorescente en el equipo Typhoon-FLA 7000. Western Blot (gel de poliacrilamida al 12% transferido a una membrana de nitrocelulosa), utilizando distintas diluciones tanto de anticuerpo primario como secundario para determinar la presencia de la proteína Mistic-BlaR1JH1 luego de ensayos de inducción. Se utilizaron dos diluciones del anticuerpo primario Anti-BlaR^s

(1/1.000 y 1/500) y en ambos casos se utilizó una dilución 1/500 del anticuerpo secundario

Goat-anti-rabbit-Cy3 conjugated. Además se realizó una prueba utilizando el anticuerpo primario Anti-groEL en una dilución 1/10.000 y se ensayaron dos concentraciones del anticuerpo secundario *Goat-anti-rabbit-Cy3 conjugated* (1/1.000 y 1/500). Se utilizó como marcador de peso molecular (MPM), Precision PlusWesternC. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa). Con el * se marca la proteína GroEl (60 kDa).

A partir de los ensayos mostrados en la **Figura 6.12**, se decidió utilizar una dilución 1/1.000 del anticuerpo primario Anti-BlaR^S y una dilución 1/500 del anticuerpo secundario *goat-anti-rabbit-Cy3 conjugated* para ensayos posteriores de Western Blot utilizando el equipo Typhoon-FLA 7000 para la visualización de los mismos.

6.1.9. Estudios de la topología de la proteína Mistic-BlaR1JH1 en esferoplastos de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), empleando ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K y unión al antibiótico fluorescente Bocilina-FL.

La información estructural disponible de la proteína Mistic indica que el extremo C-terminal de la misma quedaría localizado en el periplasma al ser expresada en *E. coli* (correspondiente a una localización extracelular en la bacteria Gram-positiva *B. subtilis*; **Figura 3.6**). Al expresarla fusionada a BlaR1JH1, de acuerdo a la topología propuesta por nuestro grupo para la misma (**Figura 3.5**, compuesta por el dominio citoplasmático, una hélice transmembrana y el dominio sensor extracelular), la fusión se haría con el N-terminal de BlaR1JH1, que tendría localización citoplasmática. La fusión a Mistic podría entonces forzar a una topología diferente a la nativa para BlaR1JH1, con el extremo C-terminal citoplasmático, en lugar de ser extracelular (periplasmático al expresarla en *E. coli*). Si la proteína BlaR1JH1 se encuentra en la orientación adecuada según lo planteado por el modelo molecular de la misma y la función que debe cumplir el dominio sensor (BlaR^S), el mismo debería orientarse hacia el espacio extracelular.

Con el fin de evaluar si la fusión de la proteína Mistic a la proteína BlaR1JH1 modifica su orientación en la membrana bacteriana, se procedió a realizar un ensayo de susceptibilidad a Proteinasa K. La Proteinasa K es una serin-proteasa de amplio espectro, cuyo sitio predominante de escisión es el enlace peptídico adyacente al grupo carboxilo de aminoácidos alifáticos y aromáticos con grupos alfa-amino bloqueados. Al tratar esferoplastos de células *E. coli* BL21 StarTM (DE3) transformadas con el plásmido pET41a(+)_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1 que expresan

la proteína de interés en membrana con Proteinasa K, si se emplea para la detección el anticuerpo primario específico para el dominio sensor de BlaR1 y el mismo posee localización extracelular, la intensidad de la banda correspondiente a Mistic-BlaR1JH1 debería disminuir gradualmente a medida que se aumenta la concentración de proteasa. Como se observa en la **Figura 6.13 A**, a concentraciones crecientes de Proteinasa K disminuye la intensidad de la banda de expresión correspondiente a la construcción Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa). Como control de la integridad de los esferoplastos durante el tiempo de incubación con Proteinasa K, se monitoreó a la proteína BCP (Biotin Carrier Protein), que es una proteína de localización citoplasmática de 22 kDa (**Figura 6.13 B**). Las bandas correspondientes a Mistic-BlaR1JH1 y BCP en los esferoplastos incubados a temperatura ambiente por 5 minutos, se cuantificaron utilizando el programa ImageJ (**Figura 6.13 C**). Para cada proteína se estableció como 100% la intensidad de la banda de los esferoplastos incubados 5 minutos a temperatura ambiente sin Proteinasa K, y como puede observarse en la **Figura 6.13 C**, las intensidades de las bandas correspondientes a Mistic-BlaR1JH1 disminuyen hasta un 0 % cuando aumenta la concentración de Proteinasa K, mientras que la intensidad de la banda correspondiente a BCP disminuye hasta un 40-60 %. Si bien la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a BCP muestra que algunos de los esferoplastos no se mantuvieron intactos durante el tiempo de incubación, la desaparición más rápida y completa (a 500 µg/mL de Proteinasa K) de Mistic-BlaR1JH1 indica que el dominio sensor se encuentra expuesto en esferoplastos, confirmando la correcta orientación de la proteína. De esta forma, el análisis cuantitativo nos permite corroborar que la proteína Mistic-BlaR1JH1 se encuentra en la orientación correcta, es decir, con el dominio sensor ubicado del lado extracelular, en esferoplastos de *E. coli*.

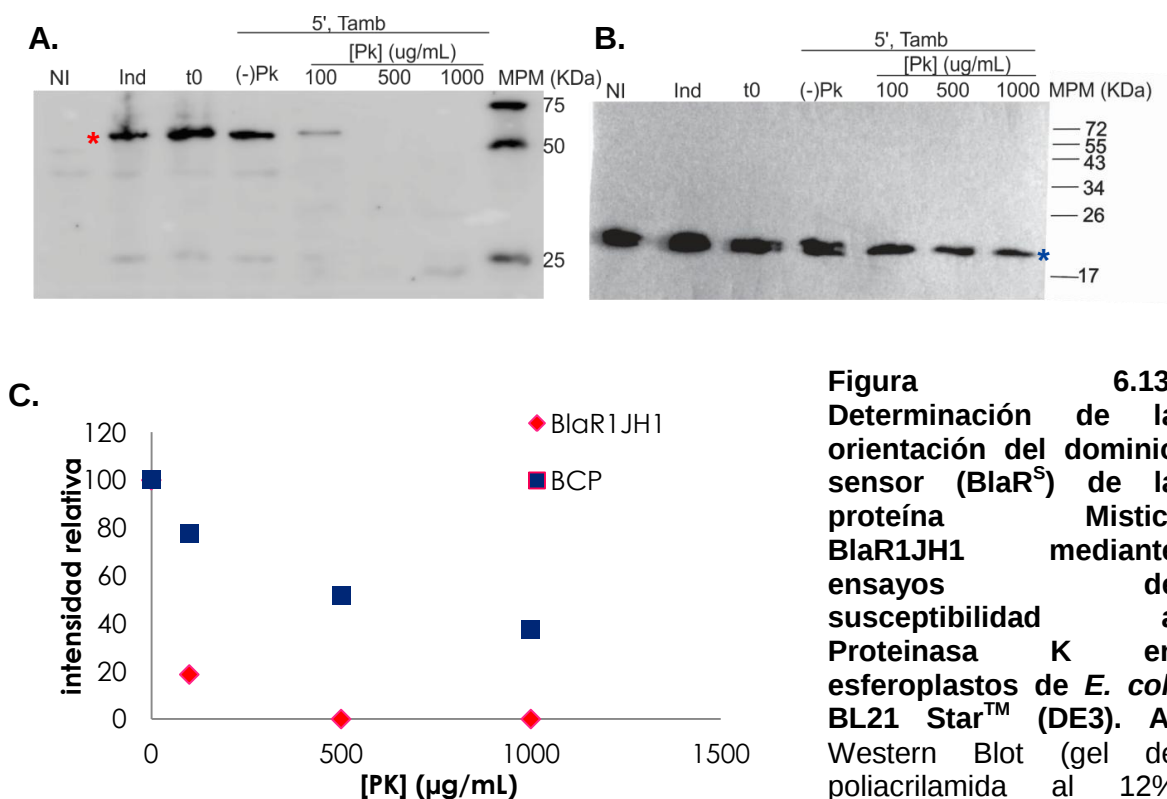


Figura 6.13. Determinación de la orientación del dominio sensor (BlaR^S) de la proteína Mistic-BlaR1JH1 mediante ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K en esferoplastos de *E. coli* BL21 StarTM (DE3). **A.** Western Blot (gel de poliacrilamida al 12% transferido a una

membrana de nitrocelulosa), utilizando como anticuerpo primario Anti-BlaR^S (dilución 1/1.000) y anticuerpo secundario Goat-anti-rabbit-Cy3 (dilución 1/500), revelado en el equipo Typhoon-FLA 7000 (filtro Cy3; 800 V). Se utilizó como marcador de peso molecular (MPM), Precision Plus. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa). **B.** Western Blot (gel de poliacrilamida al 16% transferido a una membrana de nitrocelulosa), utilizando Streptactin-HRP (dilución 1/5.000), revelado con el reactivo quimioluminiscente Super SignalTM West Pico. Se utilizó como marcador de peso molecular (MPM), Page Ruler Prestained. Con el * se marca a la proteína BCP (22 kDa). En ambos casos, se sembró el extracto de proteínas totales del cultivo no inducido (NI) e inducido (Ind), junto con la preparación de esferoplastos sin incubar e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos con concentraciones crecientes de Proteinasa K (0, 100, 500 y 1000 μg/mL). La cantidad de células sembradas fue de 1x10⁸. **C.** Cuantificación de las bandas de los Western Blot anteriores utilizando el programa ImageJ.

Además de los ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K, se realizaron ensayos de unión al antibiótico fluorescente Bocilina-FL, también utilizando esferoplastos de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) transformadas con el plásmido pET41a(+)_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1. Este antibiótico, es capaz de unirse al dominio sensor de la proteína BlaR1JH1 (BlaR^S) si el mismo se encuentra correctamente plegado y expuesto al espacio extracelular, ya que el antibiótico se cree que no es capaz de difundir dentro de la membrana celular. Como se observa en la **Figura 6.14** pudimos determinar que al agregar el antibiótico Bocilina-FL a la

preparación de esferoplastos, el mismo se une al dominio sensor de la proteína Mistic-BlaR1JH1, lo cual nos indicó que el dominio sensor se encuentra correctamente plegado y expuesto al espacio extracelular, en concordancia con la función que cumple este dominio en la estructura de la proteína BlaR1. Este ensayo fue un complemento a los resultados obtenidos por ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K.

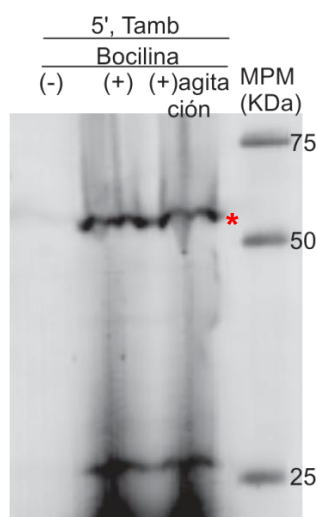


Figura 6.14. Determinación de la orientación del dominio sensor de la proteína Mistic-BlaR1JH1 mediante ensayos de unión al antibiótico Bocilina-FL en esferoplastos de *E. coli* BL21 Star™ (DE3). SDS-PAGE al 12%, revelado en el equipo Typhoon-FLA 7000 (filtro FAM, 800 V), de las muestras preparadas a partir de esferoplastos de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformadas con el plásmido pET41a(+)_{H6X-mistic-TEV-blaR1JH1}. **(-):** fracción de esferoplastos no incubados con el antibiótico Bocilina-FL. **(+):** fracción de esferoplastos incubados con el antibiótico Bocilina-FL, en una concentración final de 10 μ M, a temperatura ambiente por 5 minutos. **(+)agitación:** fracción de esferoplastos incubados con el antibiótico Bocilina-FL, en una concentración final de 10 μ M, a temperatura ambiente por 5 minutos y con agitación. **MPM:** marcador de peso molecular, Precision Plus WesternC. Con el * se marca a la proteína Mistic-BlaR1JH1 (63 kDa).

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos mostrados anteriormente, en las figuras **Figura 6.13** y **Figura 6.14**, planteamos las posibles conformaciones que podría adoptar la proteína BlaR1JH1 una vez fusionada a Mistic. Una de ellas, es que la inserción correcta de BlaR1JH1 en membrana, fuerce al último paso transmembrana de Mistic a quedar en el espacio citoplasmático (**Figura 6.15 A**). La otra posibilidad, es la inserción correcta de Mistic en membrana, quedando la proteína BlaR1JH1 en el espacio extracelular (**Figura 6.15 B**), no respondiendo al modelo planteado para esta proteína en membrana. Si la topología fuese la descrita en el último caso, aún cuando tenemos evidencia que el dominio C-terminal es funcional, es probable que el dominio metalo-proteasa sea no funcional. De hecho, a pesar de que BlaR1JH1 debería presentar actividad metalo-proteasa, por tratarse de la versión salvaje de BlaR1, no se observó auto-proteólisis de la misma cuando se realizaron las pruebas de sobre-expresión. Esta última observación sería consistente con la arquitectura propuesta en la **Figura 6.15 B**, en la cual el dominio metalo-proteasa de BlaR1JH1 no se encuentra correctamente plegado e insertado en membrana, y por lo tanto no se manifestaría la actividad

auto-proteolítica. Para poder evaluar la arquitectura de la proteína Mistic-BlaR1JH1, podríamos realizar en un futuro diferentes ensayos. Uno de ellos sería un ensayo de susceptibilidad a la proteasa TEV en esferoplastos, ya que la misma podría actuar sobre el sitio específico para ella únicamente si este se encuentra en el espacio extracelular (**Figura 6.15 B**), en tanto que en el espacio citoplasmático (**Figura 6.15 A**) este quedaría inaccesible para la proteasa. También, podríamos evaluar el correcto plegamiento del dominio metalo-proteasa incubando vesículas de membrana que contienen a la proteína Mistic-BlaR1JH1 con su sustrato, la proteína represora Blal, para la cual contamos con anticuerpos policlonales específicos. Además, podríamos medir los niveles de metal (Zn(II)) unido a la proteína, ya que únicamente se unirá, si la proteína se encuentra correctamente plegada. Planeamos escalar la purificación de Mistic-BlaR1JH1 para determinar en el futuro mediante Dicroísmo Circular el porcentaje de estructura secundaria (y comparar con los porcentajes esperados a partir de nuestro modelo) y para evaluar la cristalización de la misma para poder eventualmente obtener una estructura mediante difracción de RayosX.

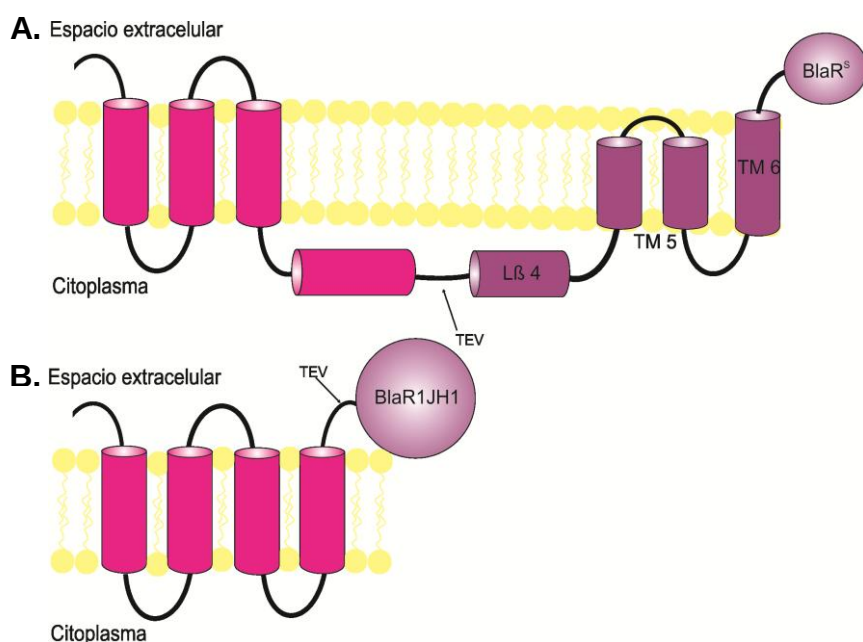


Figura 6.15. Posibles conformaciones adoptadas por la proteína BlaR1JH1 fusionada a Mistic. En color rosado se muestra a la proteína Mistic y en violeta a la proteína BlaR1JH1. Además se muestran los posibles sitios de acción de la proteasa TEV.

6.2. Evaluación de la expresión de las proteínas TM3BlaR1(E202A) y BlaR1(E202A) como fusión a Mistic.

Debido a la exitosa sobre-expresión, solubilización y purificación de la proteína BlaR1JH1 fusionada a Mistic, decidimos intentar expresar como fusión a Mistic a la proteína completa (BlaR1 de *S. aureus* NRS128) y a una versión que

carece sólo de los dos primeros pasos transmembrana (TM3BlaR1). Teniendo en cuenta la estructura de Mystic, estas dos versiones permitirían una correcta orientación tanto de Mystic como de nuestra proteína, ya que en ambos casos el extremo C-terminal extracelular de Mystic sería conectado al extremo N-terminal extracelular de BlaR1 o de TM3BlaR1 (**Figura 6.16**), de acuerdo a nuestro modelo para la proteína homóloga MecR1. En ambos casos planteamos emplear una mutante que carece de actividad metalo-proteasa (E202A).

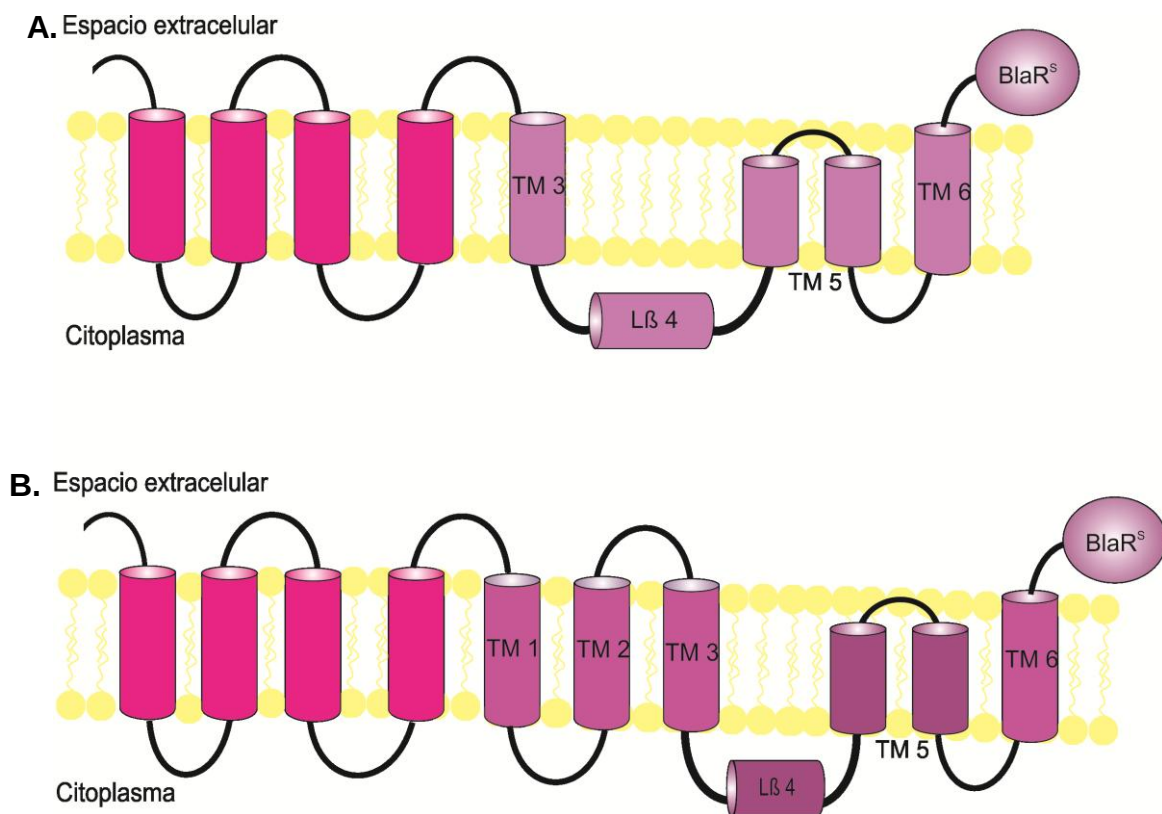


Figura 6.16. Esquemas de la arquitectura propuesta de las fusiones de TM3BlaR1 (A) y BlaR1 (B) a la proteína Mystic. En rosado se muestra la proteína Mystic.

6.2.1. Construcción de los plásmidos pET24a(+)_{H6X-mistic-TEV-TM3blaR1(E202A)} y pET24a(+)_{H6X-mistic-TEV-blaR1(E202A)}.

Para estudiar la expresión de las proteínas Mystic-BlaR1(E202A) y Mystic-TM3BlaR1(E202A) en *E. coli*, los genes *blaR1(E202A)* y *TM3blaR1(E202A)* de *S. aureus* NRS128 fueron clonados en el plásmido pET24a(+)_{H6X-mistic-TEV} (pHmT), construido en nuestro laboratorio, el cual permite la expresión inducible de

las proteínas de interés bajo el control del promotor *pLac* inducible por IPTG. En el laboratorio se contaba con el gen *blaR1(E202A)* clonado en el vector pET24a(+), amplificado a partir del plásmido pI258 de *S. aureus* NRS128³². La mutación E202A elimina la actividad metalo-proteasa (auto-proteólisis y degradación de la proteína blanco Blal).

El gen *blaR1(E202A)* de *S. aureus* NRS128 fue amplificado mediante PCR utilizando el vector pET24a(+)-*blaR1(E202A)*-H6X como molde y los cebadores OLL_92 y OLL_94, diseñados de manera tal que introdujeran los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI*, en los extremos 5' y 3' respectivamente, para la posterior inserción en fase del gen de interés en el plásmido *pHmT*. El fragmento de ADN *TM3blaR1(E202A)*, que codifica para la versión trunca de *BlaR1(E202A)* que incluye desde la tercera hélice transmembrana predicha hasta el dominio sensor C-terminal, también fue amplificado por PCR utilizando como molde el vector pET24a(+)-*blaR1(E202A)*-H6X y los cebadores OLL_93 y OLL_94. Los cebadores, también fueron diseñados de manera tal que introdujeran los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI*, en los extremos 5' y 3' respectivamente, lo cual permitió la inserción en fase del gen de interés en el plásmido *pHmT* (**Figura 6.17**).

La mezcla conteniendo el producto de PCR de cada una de las amplificaciones fue sembrada en un gel de agarosa al 1% (**Figura 6.18 A**) y se purificó la banda correspondiente al gen *blaR1(E202A)* y *TM3blaR1(E202A)* amplificado. Cada inserto purificado fue luego digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* (Promega). Se realizaron digestiones secuenciales, ya que las endonucleasas empleadas requieren distintos medios de reacción. En primer lugar, se realizó la digestión con la enzima *BamHI* utilizando su medio de reacción correspondiente. Posteriormente, el fragmento de PCR fue purificado y sometido a una segunda reacción de digestión con la enzima *EcoRI* en su medio de reacción correspondiente. Luego de la digestión, la mezcla fue sembrada en un gel de agarosa al 1% y los fragmentos de ADN resultantes (*blaR1(E202A)*, 1770 pb; *TM3blaR1(E202A)*, 1490 pb) fueron purificados a partir del gel.

En el laboratorio se contaba con el vector pET24a(+)_H6X-mistic-TEV (pHmT), el cual permite fusionar las proteínas de interés a la proteína Mistic. El vector fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (Promega) en reacciones secuenciales, ya que las endonucleasas utilizadas no comparten el mismo medio de reacción. En primer lugar, se realizaron dos digestiones independientes con cada una de las enzimas (*Bam*HI y *Eco*RI) en su medio de reacción correspondiente, para verificar la actividad de las mismas. Posteriormente, el vector linealizado en cada reacción fue purificado y sometido a una segunda reacción de digestión con la otra enzima, utilizando el medio de reacción correspondiente y la cantidad de enzima que se había utilizado para la digestión anterior con esa misma enzima. Este procedimiento nos permitió asegurarnos que el plásmido haya sido correctamente digerido con ambas enzimas de restricción, lo cual no puede ser visualizado en el gel por la liberación de un fragmento de ADN, debido al pequeño tamaño del mismo. Luego de las digestiones, las mezclas de reacción fueron sembradas en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 5670 pb fue purificado a partir del gel. (Figura 6.18 B).

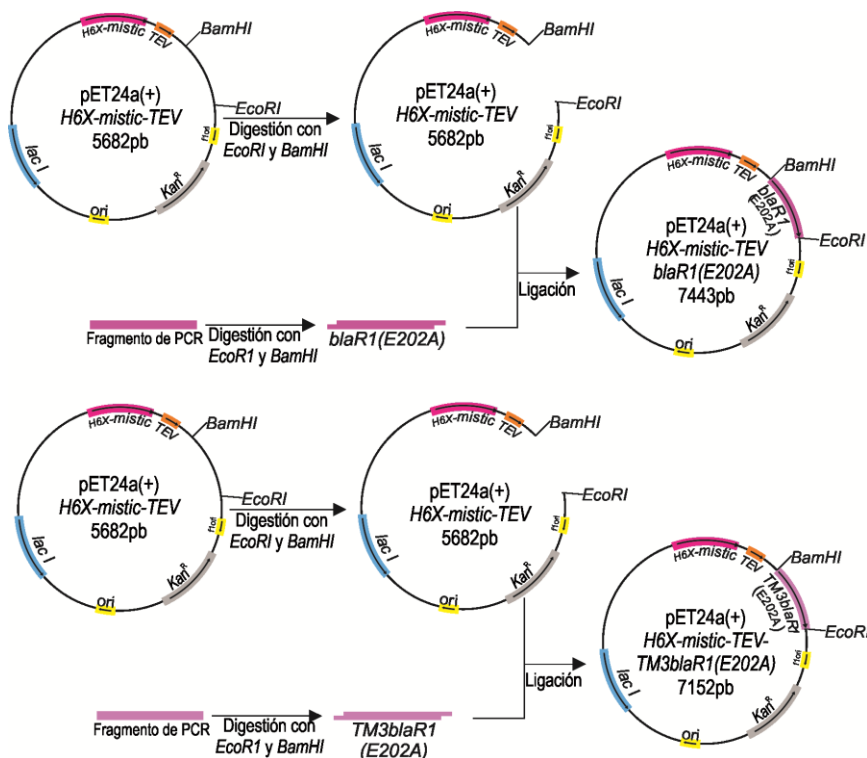


Figura 6.17. Esquema de las estrategias de clonado empleadas para la construcción de los vectores pET24a(+)_H6X-mistic-TEV-*blaR1*(E202A) (pHmT_ *blaR1*(E202A)) y pET24a(+)_H6X-mistic-TEV-TM3*blaR1*(E202A) (pHmT_ TM3*blaR1*(E202A)).

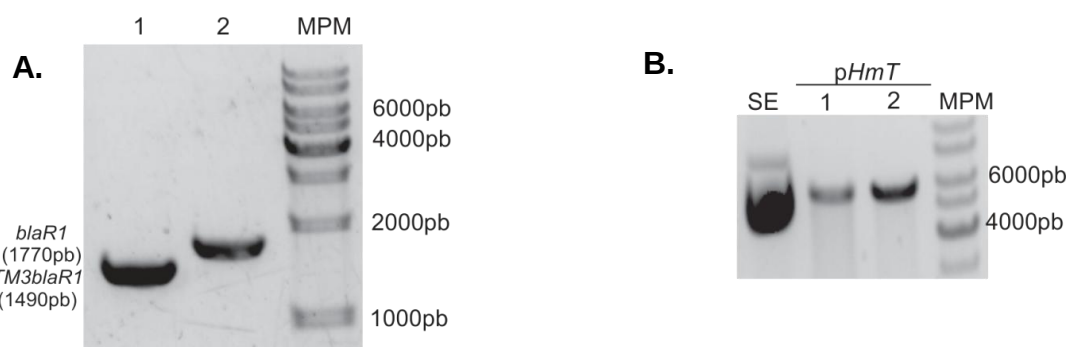


Figura 6.18. Fragmentos de ADN resultantes de la digestión con enzimas de restricción para el clonado de *pHmT_blaR1(E202A)* y *pHmT_TM3blaR1(E202A)*. Alícuotas de cada una de las reacciones de digestión con las enzimas de restricción adecuadas fueron resueltas en geles de agarosa 1%, visualizado con Syber Safe DNA gel stain. **A.** Producto de la reacción de PCR para amplificar los genes *blaR1(E202A)* y *TM3blaR1(E202A)*. **1-** producto de PCR amplificado con los cebadores OLL_93 y OLL_94 correspondiente al gen *TM3blaR1(E202A)*, digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*; **2-** producto de PCR amplificado con los cebadores OLL_92 y OLL_94 correspondiente al gen *blaR1(E202A)*, digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*; **MPM-** Marcador de peso molecular 1 Kbp Plus. **B.** Vector *pET24a(+)_H6x-mistic-TEV (pHmT)* luego de ser digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*. **SE-** vector *pHmT* sin digerir, superenrollado; **1-** vector *pHmT* luego de haber sido sometido a digestión con la enzima *EcoRI*; **2-** vector *pHmT* luego de haber sido sometido a digestión con la enzima *BamHI*; **MPM-** Marcador de peso molecular 1 Kbp Plus. En las calles 1 y 2 se observa una banda correspondiente al vector *pHmT* linealizado (aproximadamente 5676 pb).

Los fragmentos digeridos y purificados fueron cuantificados midiendo la absorbancia a 260 nm. Luego, se procedió a la ligación de los mismos utilizando una relación 5:1 de inserto:plásmido (89,7 ng de vector y 448,5 ng de inserto, para el clonado del gen *TM3blaR1(E202A)* y 85,8 ng de vector y 429 ng de inserto, para el clonado del gen *blaR1(E202A)*). La transformación de células de *E. coli* DH5 α competentes se realizó con 5 y 15 μ L de la mezcla de ligación. Se seleccionaron colonias transformantes en placas de LB-Agar suplementadas con Kanamicina. Como control se religó el vector solo. A partir de algunas colonias transformantes, seleccionadas de las placas en las cuales las digestiones del vector había sido utilizando la secuencia *BamHI/EcoRI* y se había transformado con 15 μ L de mezcla de ligación, se verificó la presencia del inserto por PCR en colonia y se seleccionaron 2 colonias positivas de cada construcción para realizar preparaciones de ADN plasmídico y verificar la presencia del inserto de interés mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* (**Figura 6.19**). El ADN de las cuatro colonias fue secuenciado, lo que permitió corroborar la correcta secuencia del gen *H6X-mistic-TEV-blaR1(E202A)* y *H6X-mistic-TEV-TM3blaR1(E202A)*, y el clonado en fase.

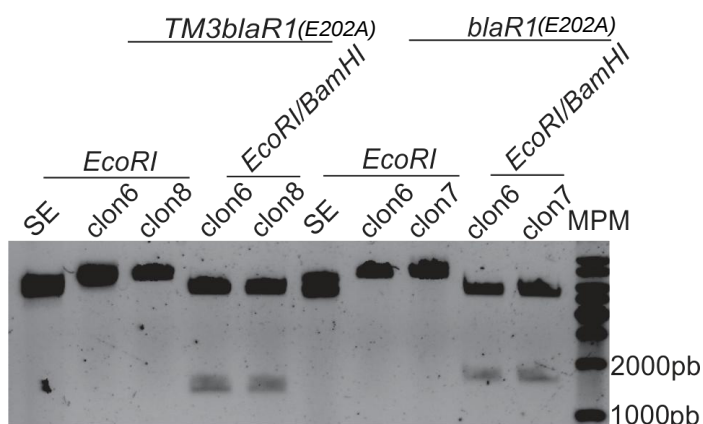


Figura 6.19. Verificación de la presencia del inserto *TM3blaR1(E202A)* y *blaR1(E202A)* en los plásmidos aislados de colonias de *E. coli* DH5 α transformantes, que dieron positivas en la PCR en colonia. En cada caso se resolvió una alícuota de la mezcla de digestión en un gel de agarosa 1%, visualizado con Syber Safe DNA gel stain. **SE- vector *pHmT* sin digerir, superenrollado. **EcoRI**-**

clon correspondiente digerido con la enzima *EcoRI* para observar la linealización del plásmido. **EcoRI/BamHI**- Clon correspondiente digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, se observan las bandas correspondientes a los insertos liberados (*blaR1(E202A)* 1770 pb y *TM3blaR1(E202A)* 1490 pb). **MPM**- Marcador de peso molecular 1 Kbp Plus.

6.2.2. Evaluación de la expresión de las proteínas **Mistic-TM3BlaR1(E202A)** y **Mistic-BlaR1(E202A)**.

Se prepararon células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), empleando el método de CaCl_2 . Las mismas fueron transformadas con los plásmidos *pHmT_blaR1(E202A)* y *pHmT_TM3blaR1(E202A)*. A partir de cultivos saturados, desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de los mismos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Las condiciones de expresión utilizadas fueron aquellas puestas a punto para la expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1, es decir, los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,65 y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. La inducción se realizó durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm. Las proteínas fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomasie (**Figura 6.20 A**).

Debido a que la sobre-expresión de las proteínas no pudo visualizarse por tinción con Azul de Coomasie, se realizó un ensayo de unión al antibiótico fluorescente Bocilina-FL para verificar si el mismo se unía al dominio sensor de las proteínas de interés corroborando la expresión de las mismas. Los cultivos inducidos se incubaron con el antibiótico Bocilina-FL en una concentración final de 5 μM durante 15 minutos a 37 °C y las proteínas unidas al antibiótico fluorescente fueron visualizadas utilizando el equipo Typhoon-FLA 7000, el filtro FAM con distintos potenciales, observándose una banda tenue correspondiente a las proteínas Mistic-TM3BlaR1(E202A) y Mistic-BlaR1(E202A) completas y una banda mayoritaria de

masa algo superior a 25 kDa, correspondiente muy probablemente a un fragmento del dominio sensor resultante de proteólisis por proteasas nativas de *E. coli* (**Figura 6.20 B**). En base a los resultados obtenidos, se decidió realizar un ensayo de Western Blot, ya que es una técnica de mayor sensibilidad la cual permitiría visualizar bajos niveles de expresión y además nos permitiría determinar comparando las muestras incubadas con y sin Bocilina-FL, si en el ensayo con el antibiótico, la proteólisis de las proteínas de interés se debió a la incubación a 37 °C para la reacción con el antibiótico fluorescente. Se utilizó el anticuerpo primario Anti-BlaR^S en una dilución de 1/1.000 y como anticuerpo secundario *goat-anti-rabbit-Cy3 conjugated* en una dilución 1/500 (estas condiciones ya habían sido puestas a punto previamente para la visualización de la sobre-expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1); luego se visualizaron las proteínas detectadas por los anticuerpos en el equipo Typhoon-FLA 7000. La sensibilidad de este ensayo no fue suficiente para detectar a las proteínas Mistic-BlaR1(E202A) y Mistic-TM3BlaR1(E202A).

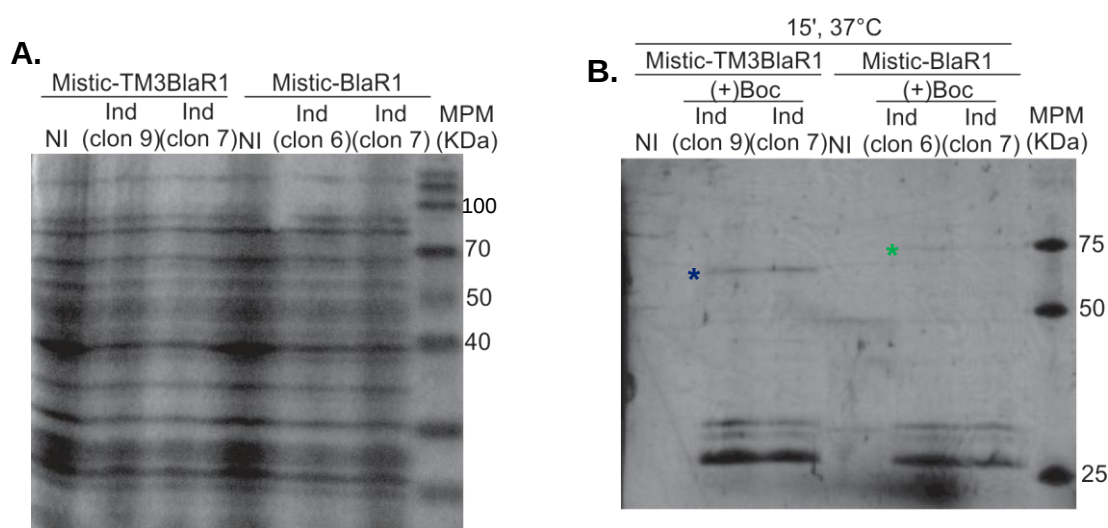


Figura 6.20. Evaluación de la expresión de las proteínas Mistic-BlaR1(E202A) y Mistic-TM3BlaR1(E202A) en *E. coli* BL21 StarTM (DE3). Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/pHmT_blaR1(E202A) y pHmT_TM3blaR1(E202A), obtenidas de cultivos inducidos a DO_{600nm} 0,65, durante 16 h a 20 °C y concentración final de IPTG de 1 mM fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 12%. **NI:** extractos de proteínas totales del cultivo no inducido. **Ind:** extractos de proteínas totales de cultivos inducidos. **A.** visualizado mediante tinción con Azul de Coomassie. **MPM:** marcador de peso molecular, Blue Plus III. En todas las calles se sembró un total de 2x10⁸ células. No se observó expresión. **B.** visualizado en el equipo Typhoon-FLA 7000 (filtro FAM, 900 V). Las muestras provenientes de cultivos inducidos, fueron incubadas 15 min a 37°C con el antibiótico Bocilina-FL en una concentración final de 5 µM. **MPM:** marcador de peso molecular, Precision Plus WesternC. En todas las calles se sembró un total de 2x10⁸ células. Con el * se marca a la proteína Mistic-TM3BlaR1(E202A) (69 kDa) y con el * se marca la proteína Mistic-BlaR1(E202A) (81kDa).

Debido a que no pudo detectarse la expresión de las proteínas de interés en la cepa BL21 StarTM (DE3), se procedió a realizar pruebas de inducción utilizando otras cepas.

Se prepararon células competentes de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3), a partir de stocks pertenecientes a nuestro laboratorio, empleando el método de CaCl₂. Las mismas fueron transformadas con los plásmidos *pHmT_blaR1(E202A)* y *pHmT_TM3blaR1(E202A)*. A partir de cultivos saturados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de los mismos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta una DO_{600nm} de 0,65 y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. La inducción se realizó durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm.

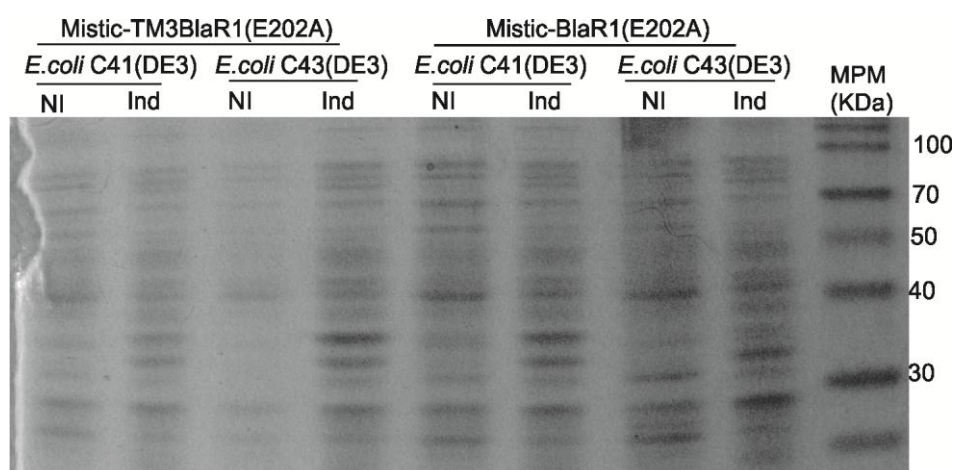


Figura 6.21. Evaluación de la expresión de las proteínas Mistic-BlaR1(E202A) y Mistic-TM3BlaR1(E202A) en *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3). Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* C43 (DE3) y C41 (DE3)/*pHmT_blaR1(E202A)* y *pHmT_TM3blaR1(E202A)* fueron resultas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomasie. **NI:** extractos de proteínas totales del cultivo no inducido. **Ind:** extractos de proteínas totales del cultivo inducido a DO_{600nm} 0,65, durante 16 h a 20 °C y concentración final de IPTG de 1 mM. **MPM:** Marcador de peso molecular, Blue Plus III. En todas las calles se sembró un total de 2x10⁸ células.

Según la **Figura 6.21**, no se observó expresión de ninguna de las proteínas de interés en ambas cepas. Por lo tanto, se procedió a realizar un ensayo de Wester Blot. Se utilizó el anticuerpo primario Anti-BlaR^S en una dilución de 1/1.000 y como anticuerpo secundario *goat-anti-rabbit-Cy3 conjugated* en una dilución 1/500, luego se visualizó en el equipo Typhoon-FLA 7000, filtro Cy3, utilizando diferentes potenciales, sin embargo, no pudo observarse a las proteínas de interés.

Por lo tanto, se decidió realizar el ensayo nuevamente en las cepas C41 (DE3) y C43 (DE3), pero partiendo de un stock de células diferentes, ante la duda de que el stock de nuestro laboratorio pudiera haber estado contaminado. Además se probaron nuevas condiciones de inducción.

Se prepararon células competentes de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3), a partir de stocks diferentes a los utilizados anteriormente, empleando el método de CaCl_2 . Las mismas fueron transformadas con los plásmidos *pHmT_blaR1(E202A)* y *pHmT_TM3blaR1(E202A)*. A partir de cultivos saturados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de los mismos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,65 y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. La inducción se realizó durante 4 h a 37 °C y durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm.

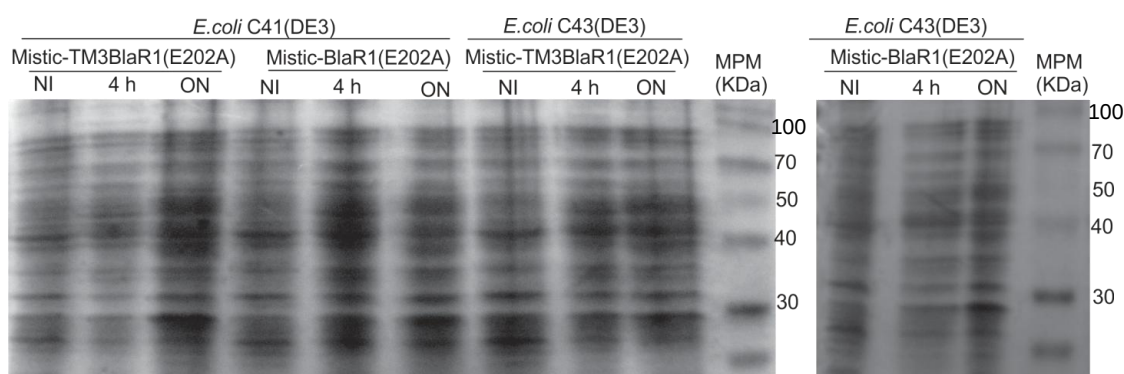


Figura 6.22. Evaluación de la expresión de las proteínas Mistic-BlaR1(E202A) y Mistic-TM3BlaR1(E202A) en *E. coli* C41 y C43 (DE3). Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3)/*pHmT_blaR1(E202A)* y *pHmT_TM3blaR1(E202A)* fueron resultas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomassie. **NI:** extractos de proteínas totales del cultivo no inducido. **4 h:** extractos de proteínas totales del cultivo inducido durante 4 h, 37 °C, 220 rpm. **ON:** extractos de proteínas totales del cultivo inducido durante 16 h, 20 °C, 220 rpm. **MPM:** Marcador de peso molecular, Blue Plus III. Todas las inducciones se realizaron a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,65 y utilizando una concentración final de IPTG igual a 1 mM. En todas las calles se sembró un total de 2×10^8 células.

Como se observa en la **Figura 6.22**, la expresión de las proteínas de interés no se produjo en ninguna de las dos cepas. Creemos que la falta de expresión puede deberse a que los genes utilizados para la expresión de las proteínas Mistic-BlaR1(E202A) y Mistic-TM3BlaR1(E202A) en *E. coli* no están optimizados para la expresión en la misma, sino que el uso de codones es el propio de *S. aureus*, a diferencia del caso de BlaR1JH1. Deberíamos corroborarlo utilizando los genes

mistic-blaR1(E202A) y *mistic-TM3blaR1(E202A)* optimizados para la expresión en *E. coli*.

6.3. Evaluación de la expresión de la proteína CytMecR1(E205A) como fusión a eGFP.

6.3.1. Construcción del plásmido pET24a(+)_cytmecR1(E205A)-TEV-egfp-H6X.

Para estudiar la expresión del dominio citoplasmático de la proteína MecR1, denominado CytMecR1, se decidió en primer lugar trabajar con la mutante que elimina la actividad metalo-proteasa (E205A, resultados no publicados de nuestro laboratorio). En el laboratorio contábamos con el gen que codifica para MecR1 de *S. aureus* NRS70 (N315), optimizado para la expresión en *E. coli* (Genscript). Durante su tesis doctoral, el Lic. Belluzo, clonó dicho gen en pET24a(+) y obtuvo el gen que codifica para la mutante E205A. Además, el Lic. Belluzo construyó el vector de expresión pET24a(+)_TEV-egfp-H6X (**Figura 6.23**), el cual permite la expresión inducible de la proteína de interés bajo el control del promotor *pLac* inducible por IPTG, fusionada en C-terminal a la proteína eGFP. Se ha observado que la fusión a la proteína eGFP aumenta los niveles de expresión de algunas proteínas de membrana.

El vector pET24a(+)_TEV-egfp-H6X fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (NEB y Promega, respectivamente), de manera secuencial ya que las endonucleasas utilizadas no comparten el mismo medio de reacción. En primer lugar, se realizaron dos digestiones independientes con cada una de las enzimas (*NdeI* y *BamHI*) en su medio de reacción correspondiente, para verificar la actividad de las mismas. Posteriormente, el vector linealizado en cada reacción fue purificado y sometido a una segunda reacción de digestión con la otra enzima, utilizando el medio de reacción correspondiente y la cantidad de enzima que se había utilizado para la digestión anterior con esa misma enzima. Luego de las digestiones, las mezclas fueron sembradas en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 6000 pb fue purificado a partir del gel realizando el corte de la banda de interés (**Figura 6.24 A**).

El gen *cytmecR1(E205A)* fue amplificado mediante PCR utilizando el vector pET24a(+)_{mecR1(E205A)} como molde y los cebadores OLL_40 y OLL_41, diseñados de manera tal que introdujeran los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, en los extremos 5' y 3' respectivamente, lo cual permitiría la inserción en fase del gen de interés en el plásmido pET24a(+)_{TEV-egfp-H6X}. La mezcla conteniendo el producto de PCR fue sembrada en un gel de agarosa al 1% y se purificó la banda de ADN que codifica para CytMecR1(E205A). El inserto purificado fue luego digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (NEB y Promega, respectivamente). Se realizaron digestiones secuenciales ya que las endonucleasas empleadas no comparten el mismo medio de reacción. En primer lugar, se realizó la digestión con la enzima *BamHI* utilizando su medio correspondiente. Posteriormente, el fragmento de PCR fue purificado y sometido a una segunda reacción de digestión con la enzima *NdeI* en su medio de reacción correspondiente y utilizando la cantidad de enzima que se había utilizado en la digestión del vector con esta enzima de manera independiente. Luego de la digestión, la mezcla fue sembrada en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de ADN resultante (490 pb) fue purificado a partir del gel (Figura 6.24 B).

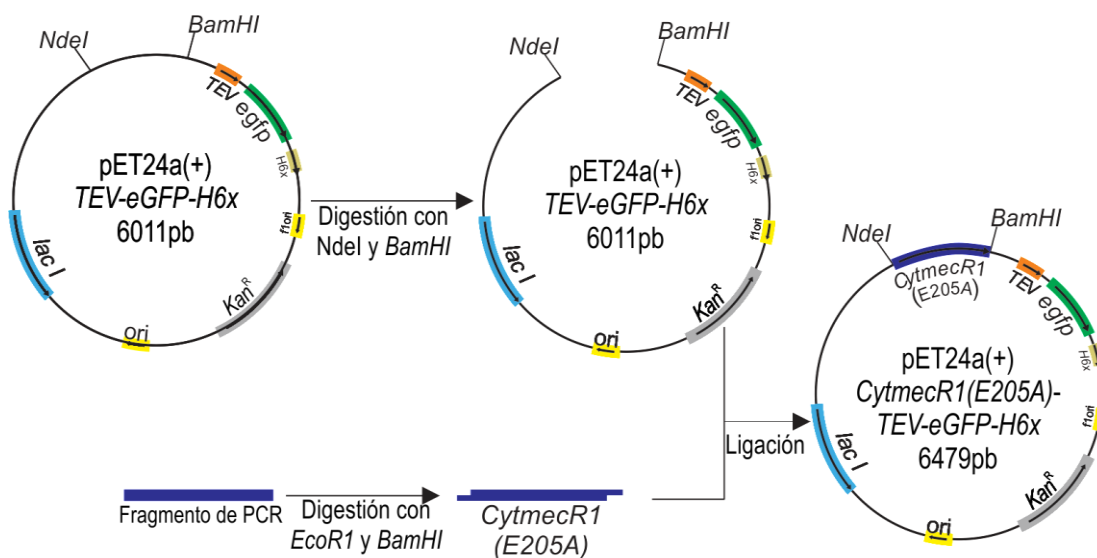


Figura 6.23. Esquema de la estrategia de clonado empleada para la construcción del vector pET24a(+)_{cytmecR1-TEV-egfp-H6X}.

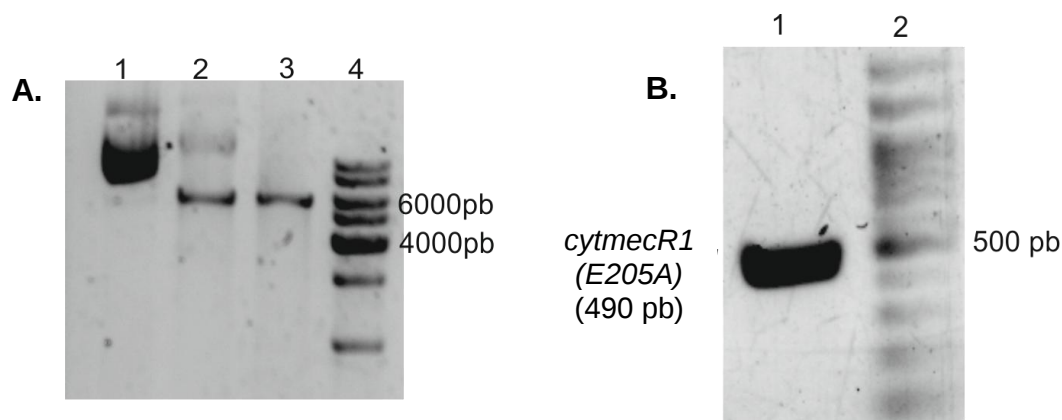


Figura 6.24. Fragmentos de ADN resultantes de la digestión con enzimas de restricción para el clonado de *cytmecR1(E205A)* en *pET24a(+)-TEV-egfp-H6X*. Alícuotas de cada una de las reacciones de digestión con enzimas de restricción adecuadas fueron resueltas en geles de agarosa 1%, visualizado con Syber Safe DNA gel stain. **A.** Vector *pET24a(+)-TEV-egfp-H6X* luego de ser digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*. **1-** vector *pET24a(+)-TEV-egfp-H6X* sin digerir, superenrollado; **2-** vector *pET24a(+)-TEV-egfp-H6X* luego de haber sido sometido a digestión con la enzima *NdeI*; **3-** vector *pET24a(+)-TEV-egfp-H6X* luego de haber sido sometido a digestión con la enzima *BamHI*; **4-** Marcador de peso molecular, 1 Kbp Plus. En las calles 1 y 2 se observa una banda correspondiente al vector *pET24a(+)-TEV-egfp-H6X* linealizado (aproximadamente 6000 pb). **B.** Producto de la reacción de PCR para amplificar el gen *cytmecR1(E205A)*. **1-** producto de PCR amplificado con los cebadores OLL_40 y OLL_41 correspondiente al gen *cytmecR1(E205A)*, 490 pb, digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*; **2-** Marcador de peso molecular 100 pb.

Ambos fragmentos digeridos y purificados fueron cuantificados midiendo absorbancia a 260 nm. Luego, se procedió a la ligación de los mismos utilizando una relación 5:1 de inserto:plásmido (50 ng de vector y 250 ng de inserto). La transformación de células de *E. coli* DH5 α competentes, se realizó con 5 y 15 μ L de mezcla de ligación. Se seleccionaron colonias transformantes en placas de LB-Agar suplementadas con Kanamicina. Como control se religó el vector solo. A partir de algunas colonias transformantes, seleccionadas de la placa en donde la digestión del vector se había realizado utilizando la secuencia *NdeI/BamHI* y se habían utilizado 15 μ L de mezcla de ligación para la transformación, se verificó la presencia del inserto por PCR en colonia y se seleccionaron 3 colonias positivas para realizar preparaciones de ADN plasmídico y verificar la presencia del inserto de interés mediante digestión con las enzimas *NdeI/BamHI*. El ADN de dos colonias fue secuenciado (clones 4 y 11), lo que permitió corroborar la correcta secuencia del gen *cytmecR1(E205A)-TEV-egfp-H6X* y el clonado en fase (**Figura 6.25**).

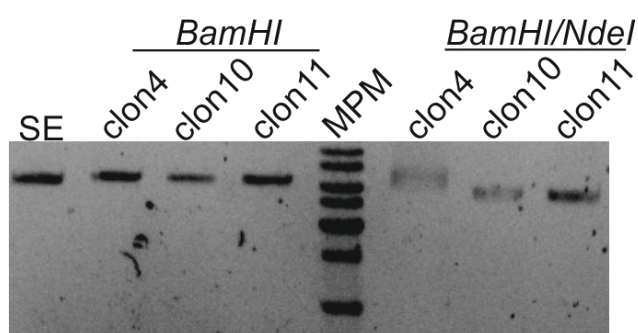


Figura 6.25. Verificación de la presencia del inserto *cytmecR1(E205A)* en los plásmidos aislados de colonias de *E. coli* DH5 α transformantes, que dieron positivas en la PCR en colonia. En cada caso se resolvió una alícuota de la mezcla de digestión en un gel de agarosa 1%, visualizado con Syber Safe DNA gel stain. **SE-** vector pET24a(+)-TEV-egfp-H6X sin digerir, superenrollado. **BamHI-** clon correspondiente digerido con la enzima *BamHI* para observar la linealización del plásmido. **BamHI/NdeI-** Clon correspondiente digerido con las enzimas *BamHI* y *NdeI*, para observar la liberación del inserto de interés (*cytmecR1(E205A)*, 490 pb). **MPM-** Marcador de peso molecular 1 Kbp Plus. No se logró observar la banda correspondiente al inserto liberado debido a su bajo peso molecular, pero por diferencia de tamaño de las bandas digeridas con una y dos enzimas de restricción pudimos corroborar la presencia del inserto en las colonias seleccionadas, que luego fue confirmado por secuenciación.

6.3.2. Evaluación de la expresión de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP.

Se prepararon células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), empleando el método de CaCl₂. Las mismas fueron transformadas con los plásmidos pET24a(+)-*cytmecR1(E205A)*-TEV-egfp-H6X de ambos clones que dieron correcta la secuenciación. A partir de cultivos saturados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de los mismos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Las condiciones de expresión utilizadas fueron aquellas puestas a punto para la expresión de la proteína Mistic-BlaR1JH1. Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta una DO_{600nm} de 0,65 y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. La inducción se realizó durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm.

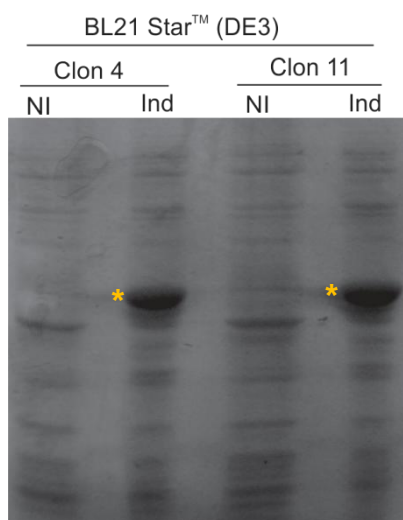


Figura 6.26. Evaluación de la expresión de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP en *E. coli* BL21 StarTM (DE3). Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/ pET24a(+)-*cytmecR1(E205A)*-TEV-egfp-H6X fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomassie. **NI:** extractos de proteínas totales del cultivo no inducido. **Ind:** extractos de proteínas totales del cultivo inducido a DO_{600nm} 0,65, durante 16 h a 20 °C y concentración final de IPTG de 1 mM. El Marcador de peso molecular utilizado fue Precision Plus WesternC, el cual no pudo

observarse por tinción con Azul de Coomasie. En todas las calles se sembró un total de 2×10^8 células. Con el * se marca a la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP (47 kDa).

En la **Figura 6.26**, puede observarse que se logró sobre-expresar la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP (peso molecular 47 kDa) en la cepa BL21 StarTM (DE3). Sin embargo, decidimos probar la expresión de la proteína de interés en otras cepas de *E. coli*, para ver si los niveles de expresión eran mayores.

Se prepararon células competentes de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3), empleando el método de CaCl_2 . Las mismas fueron transformadas con el plásmido pET24a(+)_cytmecR1(E205A)-TEV-egfp-H6X. A partir de cultivos saturados desde colonias transformantes aisladas, se realizó una dilución 1:100 de los mismos en 10 mL de LB suplementado con el antibiótico de selección (Kan). Los cultivos se crecieron a 37 °C, 220 rpm, hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,65 y luego se agregó el inductor (IPTG), en una concentración final igual a 1 mM. La inducción se realizó durante 4 h a 37 °C y durante 16 h a 20 °C, con una agitación de 220 rpm.

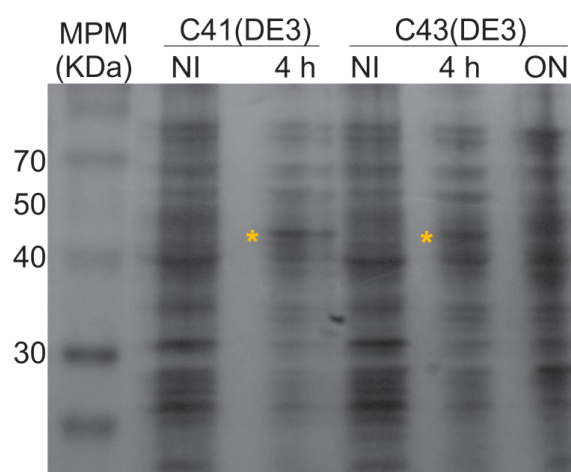


Figura 6.27. Evaluación de la expresión de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP en *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3). Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3)/pET24a(+)_cytmecR1(E205A)-TEV-egfp-H6X fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomasie. **NI:** extractos de proteínas totales del cultivo no inducido. **4 h:** extractos de proteínas totales del cultivo inducido durante 4 h, 37 °C, 220 rpm. **ON:** extractos de proteínas totales del cultivo inducido durante 16 h, 20 °C, 220 rpm. **MPM:** Marcador de peso molecular, Blue Plus III. Todas las inducciones se realizaron a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,65 y concentración final de IPTG igual a 1 mM. En todas las calles se sembró un total de 2×10^8 células. Con el * se marca a la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP (47 kDa).

proteínas totales del cultivo inducido durante 16 h, 20 °C, 220 rpm. **MPM:** Marcador de peso molecular, Blue Plus III. Todas las inducciones se realizaron a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,65 y concentración final de IPTG igual a 1 mM. En todas las calles se sembró un total de 2×10^8 células. Con el * se marca a la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP (47 kDa).

En la **Figura 6.27** puede observarse que la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP (peso molecular 47 kDa) se expresó en las cepas C41 (DE3) y C43 (DE3) al realizarse la inducción durante 4 h a 37 °C. Sin embargo, los niveles de expresión fueron más bajos que los obtenidos utilizando la cepa BL21 StarTM (DE3). Por lo tanto, decidimos continuar trabajando con *E.coli* BL21 StarTM (DE3) para la expresión de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP.

6.3.3. Evaluación de la localización sub-celular de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP.

Con el objetivo de determinar la localización sub-celular de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP sobre-expresada en *E. coli*, se procedió a realizar una preparación de proteínas de membrana como se explica en la Sección 5.9.2, ya que es el sitio donde esperamos encontrarla funcional. Se tomaron alícuotas de cada fracción obtenida durante la preparación.

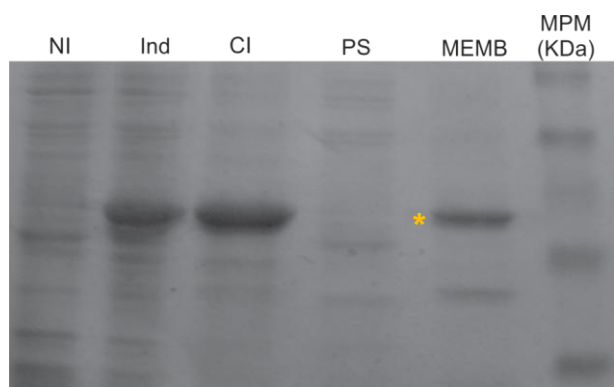


Figura 6.28. Evaluación de la localización sub-celular de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP. Las proteínas de extractos totales de células de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/pET24a(+)_cytmecR1(E205A)-TEV-egfp-H6X fueron resueltas por SDS-PAGE al 12%, visualizado por tinción con Azul de Coomassie. **NI:** extractos de proteínas totales del cultivo no inducido

(se sembró un total de 2×10^8 células). **Ind:** extractos de proteínas totales de cultivo inducido a DO_{600nm} de 0,65 a 20 °C, durante 16 h con concentración final de IPTG de 1 mM (se sembró un total de 2×10^8 células). **CI:** pellet obtenido en la centrifugación post-sonicada (cuerpos de inclusión, células intactas y fragmentos grandes de membrana). Se sembraron 20 μ g de proteínas totales. **PS:** sobrenadante obtenido en la centrifugación post-sonicada (proteínas solubles y proteínas de membrana). Se sembraron 10 μ g de proteínas totales. **MEMB:** pellet obtenido luego de la ultracentrifugación (proteínas de membrana). Se sembraron 40 μ L. La cantidad de muestra a sembrar en las calles **CI** y **PS** fue calculada a partir de la construcción de una curva de calibración utilizando el Kit PierceTM BCA Protein Assay. **MPM:** Marcador de peso molecular, Blue Plus III. Con el * se marca a la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP (47 kDa).

Como se observa en la **Figura 6.28**, una fracción importante de la proteína CytMecR1-eGFP sobre-expresada en *E. coli* BL21 StarTM (DE3), se encuentra en membrana, lo cual indica la factibilidad de purificar a este dominio de la proteína de membrana MecR1 de *S. aureus* para estudios estructurales empleando esta fusión. Sin embargo, la mayoría de la proteína de interés se encontró en la fracción insoluble correspondiente al pellet obtenido luego de la centrifugación del extracto sonicado (Post-Sonicación, CI), indicándonos que ésta podría localizarse en cuerpos de inclusión, en células sin romper y/o en grandes fragmentos de membrana. Para poder corroborar que nuestra proteína no se encuentre en cuerpos de inclusión, deberíamos realizar una purificación de cuerpos de inclusión a partir de dicho pellet y verificar la presencia de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP. Recuperar la proteína de cuerpos de inclusión conlleva la desnaturalización de la misma y la

posterior renaturalización con recuperación del plegamiento correcto, lo cual no podemos verificar fácilmente ya que estamos trabajando con una variante inactiva. Es por eso que para estudios posteriores se trabajará con la fracción de membrana.

7. Conclusiones

- ❖ Se logró la construcción del plásmido pET41a(+)_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1, empleando un gen optimizado para la expresión en *E. coli*, que permitió la sobre-expresión en membrana de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) de la proteína BlaR1JH1 (versión trunca de la proteína BlaR1, que carece de las primeras tres hélices transmembrana). Además se logró su solubilización utilizando el detergente ASB-14 y su posterior purificación por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Ni-Sefarosa.
- ❖ Mediante ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K y de unión al antibiótico Bocilina-FL utilizando esferoplastos de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), se pudo determinar que en Mistic-BlaR1JH1 el dominio sensor (BlaR^S) se ubica en el espacio extracelular, en concordancia con lo esperado de acuerdo a nuestro modelo de estos sensores y consistente con su función. Estos ensayos, también nos permitieron determinar que el dominio sensor se encuentra correctamente plegado.
- ❖ Se logró la construcción de los plásmidos pET24a(+)_H6X-mistic-TEV-TM3blaR1(E202A) y pET24a(+)_H6X-mistic-TEV-blaR1(E202A). Sin embargo no se logró expresar ninguna de las dos proteínas. Proponemos que esto podría deberse al uso de codones, ya que en estos dos casos no empleamos genes optimizados para la expresión de las proteínas en *E. coli*.
- ❖ El uso de versiones inactivas de BlaR1 no fue suficiente para lograr la sobre-expresión de la misma.
- ❖ Si bien se logró sobre-expresar la versión más corta BlaR1 de *S. aureus* JH1, no fue posible sobre-expresar la versión TM3BlaR1.
- ❖ El uso de Mistic fue exitoso para sobre-expresar BlaR1 JH1, pero no así para variantes más largas. El uso de genes optimizados para la expresión en *E. coli* parece ser clave para lograr la sobre-expresión de estas metalo-proteasas.
- ❖ Se logró la construcción del plásmido pET24_cytmecR1(E205A)-TEV-egfp-H6X, empleando un gen optimizado para la expresión en *E. coli*, que permitió la sobre-expresión de la proteína CytMecR1(E205A)-eGFP en membrana de *E. coli* BL21 StarTM (DE3).

8. Referencias bibliográficas

1. Boucher, H. W. *et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1–12 (2009).
2. Boucher, H. W. Challenges in Anti Infective Development in the Era of Bad Bugs, No Drugs: A Regulatory Perspective Using the Example of Bloodstream Infection as an Indication. *Clin. Infect. Dis.* **50**, S4–S9 (2010).
3. Loffler, C. A. & MacDougall, C. Update on prevalence and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **5**, 961–981 (2007).
4. Richards, M., Edwards, J., Culver, D. & Gaynes, R. Nosocomial infections in coronary care units in the United States. *Am. J. Cardiol.* **82**, 789–793 (2017).
5. Richards, M. J., Edwards, J. R., Culver, D. H., Gaynes, R. P. & Surveillance, I. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **21**, 510–515 (2000).
6. Chambers, H. F. Pathogenesis of *Staphylococcal* Infection: A Manner of Expression. *J. Infect. Dis.* **199**, 291–293 (2009).
7. Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. & Tiemersma, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet (London, England)* **368**, 874–85 (2006).
8. Nubel, U. *et al.* Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 14130–14135 (2008).
9. Nübel, U. *et al.* A Timescale for Evolution, Population Expansion, and Spatial Spread of an Emerging Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* . *PLoS Pathog.* **6**, e1000855 (2010).
10. Guzmán-Blanco, M. *et al.* Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**, 304–308 (2017).
11. Rodríguez-Noriega, E. *et al.* Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e560–e566 (2017).
12. Bermejo, V. *et al.* Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. *Med.*

- (Buenos Aires) **72**, 283–286 (2012).
13. Paganini, H., Della Latta, M. & Muller, B. Estudio multicéntrico sobre las infecciones pediátricas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente provenientes de la comunidad en la Argentina. *Arch Argent Pediatr* **106**, 397–403 (2008).
 14. Anodal, M. *et al.* Infecciones de piel y partes blandas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de la comunidad. Análisis molecular y genético. *Dermatol. Argent.* **18**, 213–220 (2012).
 15. Arias, C. A. & Murray, B. E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. *N. Engl. J. Med.* **360**, 439–443 (2009).
 16. Livermore, D. M. Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 29–36 (2009).
 17. Policy, I. P. The 10 × '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 1081–1083 (2010).
 18. Fuda, C. C. S., Fisher, J. F. & Mobashery, S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2617–2633 (2005).
 19. Clarke, S. R. & Dyke, K. G. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus* beta-lactamase operon are inducible. *Microbiology* **147**, 803–810 (2001).
 20. Arêde, P. & Oliveira, D. C. Proteolysis of *mecA* repressor is essential for expression of methicillin resistance by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2001–2002 (2013).
 21. Arêde, P., Milheirico, C., de Lencastre, H. & Oliveira, D. C. The anti-repressor MecR2 promotes the proteolysis of the *mecA* repressor and enables optimal expression of β -lactam resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* **8**, 13 (2012).
 22. Llarrull, L. I., Fisher, J. F. & Mobashery, S. Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new β -lactams that meet the challenge. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4051–4063 (2009).
 23. McKinney, T. K., Sharma, V. K., Craig, W. A., Archer, G. L. & Kinney, T. K. M. C. Transcription of the Gene Mediating Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) Is Corepressed but Not Coinduced by Cognate *mecA* and β -Lactamase Regulators. *J. Bacteriology* **183**, 6861–6868

- (2001).
24. Golemi-Kotra, D., Cha, J. Y., Meroueh, S. O., Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Resistance to β -lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **278**, 18419–18425 (2003).
 25. Blázquez, B. *et al.* Regulation of the expression of the β -lactam antibiotic-resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biochemistry* **53**, 1548–1550 (2014).
 26. Gregory, P. D., Lewis, R. a, Curnock, S. P. & Dyke, K. G. Studies of the repressor (BlaI) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **24**, 1025–1037 (1997).
 27. Cha, J., Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Characterization of the β -Lactam Antibiotic Sensor Domain of the MecR1 Signal Sensor/Transducer Protein from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **46**, 7822–7831 (2007).
 28. Thumanu, K. *et al.* Discrete steps in sensing of beta-lactam antibiotics by the BlaR1 protein of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10630–5 (2006).
 29. Wilke, M. S., Hills, T. L., Zhang, H. Z., Chambers, H. F. & Strymadka, N. C. J. Crystal structures of the apo and penicillin-acylated forms of the BlaR1 β -lactam sensor of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47278–47287 (2004).
 30. Llarrull, L. I., Toth, M., Champion, M. M. & Mobashery, S. Activation of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, its proteolytic processing, and recovery from induction of resistance. *J. Biol. Chem.* **286**, 38148–38158 (2011).
 31. Zhang, H. Z. A Proteolytic Transmembrane Signaling Pathway and Resistance to beta -Lactams in *Staphylococci*. *Science* **291**, 1962–1965 (2001).
 32. Llarrull, L. I. & Mobashery, S. Dissection of events in the resistance to β -lactam antibiotics mediated by the protein BlaR1 from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **51**, 4642–4649 (2012).
 33. Boudreau, M. A., Fishovitz, J., Llarrull, L. I., Xiao, Q. & Mobashery, S. Phosphorylation of BlaR1 in Manifestation of Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Its Abrogation by Small

- Molecules. *ACS Infect. Dis.* **1**, 454–459 (2016).
34. Ryffel, C., Kayser, F. H. & Berger-Bachi, B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 25–31 (1992).
 35. Jiang Bond, J. S, W. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS J.* **312**, 110–114 (1992).
 36. Kumarasiri, M. *et al.* An amino acid position at crossroads of evolution of protein function: Antibiotic sensor domain of BlaR1 protein from *Staphylococcus aureus* versus class D β -lactamases. *J. Biol. Chem.* **287**, 8232–8241 (2012).
 37. Borbulevych, O. *et al.* Lysine N-decarboxylation switch and activation of the β -lactam sensor domain of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **286**, 31466–31472 (2011).
 38. Hanique, S. *et al.* Evidence of an Intramolecular Interaction between the Two Domains of the BlaR1 Penicillin Receptor during the Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **279**, 14264–14272 (2004).
 39. Frederick, T. E., Wilson, B. D., Cha, J., Mobashery, S. & Jeffrey, W. Spectroscopy. **53**, 10–12 (2015).
 40. Hardt, K. *et al.* The penicillin sensory transducer, BlaR, involved in the inducibility of β -lactamase synthesis in *Bacillus licheniformis* is embedded in the plasma membrane via a four- α -helix bundle. *Mol. Microbiol.* **23**, 935–944 (1997).
 41. Roosild, T. P. NMR Structure of Mistic, a Membrane-Integrating Protein for Membrane Protein Expression. *Science* **307**, 1317–1321 (2005).
 42. Birck, C. *et al.* X-ray Crystal Structure of the Acylated β -Lactam Sensor Domain of BlaR1 from *Staphylococcus aureus* and the Mechanism of Receptor Activation for Signal Transduction. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13945–13947 (2004).
 43. Unbound and Acylated Structures of the MecR1 Extracellular Antibiotic-sensor Domain Provide Insights into the Signal-transduction System that Triggers Methicillin Resistance. *J. Mol. Biol.* **361**, 506–521 (2006).
 44. Kefala, G., Kwiatkowski, W., Esquivies, L., Maslennikov, I. & Choe, S. Application of Mistic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*. *J. Struct. Funct. Genomics* **8**,

- 167–172 (2007).
45. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38 (1996).
 46. Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N., Phillips Jr., G. N. & Phillips, G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1246–1251 (1996).
 47. Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 4068–76 (2000).
 48. Hsieh, J. M. *et al.* Bridging the gap: A GFP-based strategy for overexpression and purification of membrane proteins with intra and extracellular C-termini. *Protein Sci.* **19**, 868–880 (2010).
 49. An efficient strategy for high throughput screening of recombinant integral membrane protein expression and stability. *Protein Expr. Purif.* **78**, 6–13 (2011).
 50. Arpino, J. A. J., Rizkallah, P. J. & Jones, D. D. Crystal Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein to 1.35 Resolution Reveals Alternative Conformations for Glu222. *PLoS One* **7**, (2012).
 51. Kido, M. *et al.* RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 3917–3925 (1996).
 52. Hatfield, G. W. & Benham, C. J. Dna Topology Mediated Control of Global Gene Expression in *Escherichia Coli*. 175–203 (2002).
 53. Lopez, P. J., Marchand, I., Joyce, S. A. & Dreyfus, M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol. Microbiol.* **33**, 188–199 (1999).
 54. Berger-Bächi, B. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 764–770 (1999).
 55. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. & Vuillard, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: A comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif.* **37**, 203–206 (2004).
 56. Morán-Barrio, J., Limansky, A. S. & Viale, A. M. Secretion of GOB metallo- β -lactamase in *Escherichia coli* depends strictly on the cooperation between the cytoplasmic DnaK chaperone system and the Sec machinery: Completion of

folding and Zn(II) ion acquisition occur in the bacterial periplasm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2908–2917 (2009).

57. Overall, C. M. A microtechnique for dialysis of small volume solutions with quantitative recoveries. *Anal. Biochem.* **165**, 208–214 (1987).