

Universidad Autónoma Metropolitana

División de ciencias Biológicas y de la Salud

**Licenciatura en:
Biología experimental**

**Purificación y caracterización inicial de la proteína de
choque térmico de 16kDa de *Streptococcus thermophilus*
cepa PB18**

**Alumna:
Angela Díaz Aguayo.**

**Asesor:
Dr. Humberto González Márquez.**

Noviembre,2002

Purificación y caracterización inicial de la proteína de choque térmico de 16kDa de *Streptococcus thermophilus* cepa PB18

Angela Díaz Aguayo.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son cadenas compuestas de residuos de aminoácidos, que tienen una función específica dentro de las células y los organismos vivos. Dentro de estas están: las enzimas, que son catalizadores biológicos que deben su actividad a su estructura tridimensional; las proteínas estructurales y las proteínas de choque térmico, que son parte de la respuesta al estrés. Algunas de las proteínas de choque térmico (HSP) protegen a otras proteínas de la acción de agentes externos capaces de modificar la estructura de la proteína y, por lo tanto, su función. Algunos de estos agentes pueden ser el calor, el frío, la salinidad, el potencial redox o el pH del medio que desnaturalizan a las enzimas y demás proteínas dentro de las células y las dañan en distinto grado, debido a modificaciones en su estructura tridimensional. Las HSP las protegen mediante un mecanismo simple, toman a las proteínas desnaturalizadas e impiden interacciones entre las zonas hidrófobas de distintas proteínas, estas interacciones provocarían su precipitación por lo que se les llama chaperonas moleculares. No es necesario que exista una situación de estrés en la célula para producir a las proteínas de estrés. En realidad, siempre se transcriben en grandes cantidades durante la vida normal de las células. Algunas veces funcionan para el transporte de proteínas en el citosol o a través de membranas o como ensambladoras de péptidos.

Streptococcus thermophilus es una bacteria láctica utilizada en la industria lechera que tiene como característica soportar temperaturas de 60 °C durante 30 minutos, así como pH ácido del medio (González 1997). No es necesario que exista una situación de estrés en la célula para producirlas en realidad se transcriben grandes cantidades de estas durante la vida normal de las células, algunas veces funcionan como transporte de proteínas no terminadas en el citosol, o como ensambladoras de péptidos.

ANTECEDENTES

Los estudios clásicos *in vitro* de Anfinsen, que dieron lugar a su premio Nobel en química de 1972 demostraron que la secuencia primaria del aminoácido de una proteína puede contener toda la información necesaria para dirigir el plegamiento de un encadenamiento del polipéptido a la estructura final correcta (Anfinsen 1973). Sin embargo, las condiciones de temperatura, pH, concentración de sales, y especialmente de la concentración de la proteína total *in vivo* tienden a promover una gran cantidad de reacciones laterales, que compiten con la ruta de plegamiento correcto que conducirá a la estructura final correcta. (Miernyk 1999)

El plegamiento es parte del proceso mediante el cual las proteínas adquieren la estructura tridimensional que les da su actividad específica, durante este proceso las partes de una proteína ó péptidos tienden a agregarse de forma desordenada. Las chaperonas moleculares, son proteínas que previenen la asociación o la agregación inadecuada de las superficies hidrofóbicas, expuestas en proteínas plegadas o parcialmente plegadas y las dirige en el proceso de plegamiento adecuado, también las transporta o las marca para llevarlas a las rutas de degradación. Su función es, en general, reducir al mínimo la agregación de la proteína y promover la disociación de los agregados que se pudieran haber formado (Boston 1996, Miernyk, 1997; Netzer y Hartl, 1998, Sigler 1998). El estado de "molten globule" (globulo semifundido) es una etapa intermedia donde una proteína esta solo plegada en parte y se piensa que en este estado es cuando son reconocidas por las chaperonas.

Las chaperonas moleculares asisten en el ensamble y desensamble de proteínas pero no son componentes de las estructuras proteicas. Las chaperonas moleculares no tienen un papel activo en el plegamiento de la proteína, esto es, no aceleran las reacciones de plegamiento ni proporcionan la información que dirige el plegamiento de la proteína. Pero son responsables de mantener la uniformidad de los intermediarios de plegamiento. Las chaperonas moleculares se unen reversiblemente a los segmentos ya plegados, adhiriéndose a polipéptidos que actuarían de otra manera como lugares para la agregación de otros péptidos, esto lo logra al hacer de barrera contra otros péptidos o proteínas y evitar la agregación. Las chaperonas moleculares se caracterizan por su capacidad de prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas por acción del ácido y el calor. A pesar de los altos niveles de expresión bajo condiciones normales, el término HSP o proteínas de choque térmico se emplea tanto para las que son una respuesta a estrés como para las que no lo son. Bajo condiciones de estrés, como por ejemplo el choque térmico, es la síntesis de chaperonas moleculares la que permite que las proteínas celulares eviten y/o se recuperen de la agregación.

Existen seis familias importantes de chaperonas, cada una con representantes en distintos lugares y tipos celulares, así como en gran diversidad de especies. Estas seis familias se nombran según su peso molecular.

Proteínas de estrés 100/Clp

La proteína de estrés de 100-kDa se encuentra en todos los organismos. Con un peso molecular real que va de 84 a 104 kDa.

Hay dos subclases importantes: proteínas de la clase 1 (A, B, C, y D) tienen dos sitios de unión a ATP, y las proteínas de la clase 2 (M, N, X, y Y) tienen un solo sitio de unión a ATP (Schirmer et al., 1996).

Las HSP100 se han estudiado extensivamente en *E. coli*. Esta clase de chaperonas moleculares, tiene subunidades que forman a la proteasa calcinolítica dependiente de ATP (Clp) que es quien da el nombre a la familia, las dos subunidades son la clpP que no tiene actividad de chaperona y la clpA,B,C,X que son de reconocimiento específico de la chaperona. Estas

funcionan hidrolizando ATP para producir los cambios de plegamiento y el ensamblaje de la proteína. (Boston 1996, Hoskins et al., 1998).

En células vegetales HSP 100/Clp se encuentra en el citoplasma y dentro de los organitos (dentro de plastidos y de mitocondrias). La HSP 100 / Clp se localiza en distintos lugares de las células vegetales y en distintas etapas del desarrollo. (Schirmer 1994).

Proteínas de estrés 90

Las proteínas de estrés 90-kDa, con un peso real de 82 a 96 kDa, se han conservado en muchas especies y son abundantes en el citoplasma de las células eucariontes y procariontes (Csermely 1998).

La HSP90 es una chaperona molecular dependiente de ATP que se une transitoriamente a estructuras intermediarias de plegamiento, previniendo que estas se agreguen. Mientras que la mayoría de la HSP90 celular está en el citoplasma también se le encuentra en distintos organitos como en el retículo endoplásmico rugoso (ER), plastidos, y en mitocondrias (Boston 1996, Mogelsvang y Simpson, 1998). La HSP90 puede funcionar independientemente como una chaperona o también actuar en concierto con un grupo de proteínas que forman el foldosoma, o el hetero-complejo de chaperonas citoplasmático (CCH). El CCH en las células de mamíferos desempeña un papel importante en la transducción de la señal de las hormonas esteroideas y de las proteínas quinasas (Buchner, 1999). CCH es capaz de ensamblarse in vitro a partir de componentes aislados. Aunque el CCH se ha caracterizado mejor en sistemas de mamíferos, un complejo que es muy similar en la composición y la función se puede también encontrar en levadura, vegetales y hongos filamentosos (Brunt1998).

Proteínas de estrés 70

Las proteínas de estrés 70-kDa abarcan un conjunto ubicuo de las chaperonas moleculares altamente conservadas con un peso molecular real de 68 a 110 kDa (Vierling, 1991; Boston 1996, Miernyk, 1997). Se refieren a menudo algunos miembros de la familia como HSC70 (choque térmico 70-kDa cognado). Otros miembros de la familia solamente se expresan cuando el organismo es enfrentado a presiones ambientales tales como temperatura extrema , anoxia y metales pesados. Estos miembros de la familia se refieren generalmente como HSP70 (proteína de choque térmico 70- kDa), incluso cuando un choque frío las induce.

Los tipos específicos de las proteínas de estrés 70 se encuentran en todos los compartimentos intracelulares (Boston 1996, Miernyk, 1997).

Las proteínas de estrés 70 de las células procarióticas y de los organitos no funcionan como chaperonas por sí mismas, sino en conjunto con dos proteínas co-chaperonas. A la asociación funcional de estos componentes se le llama a menudo como la máquina de las chaperonas de estrés 70 (Miernyk, 1997; Bukau y Horwich, 1998)

La función de la maquina inicia cuando DnaJ se une al Péptido no plegado estas dos unidades interactúan con el complejo binario que forman ATP ligado a DnaK (estado abierto) promueve la hidrólisis del ATP de DnaK y esto produce un cambio conformacional en el Péptido, este ciclo se repite hasta que el obtiene una estructura estable.

Las Chaperoninas

Las chaperoninas abarcan la familia mejor estudiada de chaperonas moleculares (Boston et al., 1996; Netzer y Hartl, 1998; Sigler 1998). Son estructuras oligoméricas de doble anillo, que proporcionan un cerrado que protege a las proteínas plegadas del ambiente celular. Basados en relaciones evolutivas, hay dos grupos distintos de chaperoninas. El de las chaperoninas del grupo I, el arquetipo es GroEL, que se encuentra en el citoplasma de las eubacterias y dentro de los mitocondrias y de los plastidos de las células eucariotes, donde se les conoce como cpn60 (Boston et al., 1996).

Los chaperoninas del grupo II incluyen el complejo citoplásmico eubacterial termosoma y el complejo de chaperoninas citoplásmicas eucariotes llamado, TriC (complejo del anillo TCP-1). Los miembros de ambos grupos requieren la energía derivada de la hidrólisis del ATP para conducir el plegamiento de la proteína, y comparten el mismo modo básico de acción. Sin embargo, los detalles en el nivel molecular difieren considerablemente (Sigler 1998). Las chaperoninas del grupo I dependen de una proteína asociada, la chaperonina 10 (cpn10, o GroES en bacterias). El grupo I chaperoninas que median el plegamiento de la proteína, son una estructura de doble anillo asimétrica, GroES / cpn10 está ligado a un extremo solamente que actúa como el aceptor del polipéptido. Se une al anillo de GroEL/cpn60 que esta libre. Entra el ATP que al hidrolizarse desprende a GroES/cpn 10 del otro anillo y lo intercambia esto mueve al péptido hacia el centro del anillo donde se plegará. Se repite este ciclo hasta que el polipéptido alcanza la estructura nativa final (Bakau y Horwich, 1998; Sigler et al., 1998).

Las estructuras y los ciclos de la reacción de las chaperoninas en mitocondrias vegetales son altamente homólogos a las de GroEL/S. El ciclo de reacción de las chaperoninas de los plastidos es también homólogo a el de los procariontes aun que con diferencias estructurales.

En células de mamíferos, TriC forma una estructura del doble-anillo que es muy similar en aspecto a GroEL. El TriC es heterooligomérica; se han caracterizado nueve diversas subunidades. TriC se ha caracterizado mejor en chaperonas para la actina y la tubulina en células de mamíferos (Boston 1996; Sigler 1998). En contraste con las chaperoninas de los organitos, se sabe relativamente poco sobre TriC en células vegetales.

Calnexina y Calreticulina

Calnexina (CNX) es una chaperona del ER rugoso que tiene baja afinidad, y alta capacidad para ligarse a calcio (Helenius 1997 Crofts y Denecke,1998). CNX es una proteína integral de la membrana no glicosilada del tipo I que se encuentra poco en citoplasma y mucho mas en el ER rugoso. La CNX tiene una región rica en prolina que es de reconocimiento de glicanos y chaperona, esta se une a ATP pero no tiene acción de ATPasa. (Chapman 1997). CNX obra con una amplia gama de proteínas recién sintetizadas, después se disocia de estas

proteínas antes de la exportación y después del ensamblaje (Helenius 1997). CNX es un componente del ER rugoso del sistema de control de calidad de proteínas que permite solamente secretar a las proteínas que han adquirido una conformación nativa final (Boston 1996).

Calreticulina, (CRT) es una proteína soluble del lumen del ER rugoso. Como CNX, la CRT es una proteína de baja afinidad y alta capacidad para ligarse a calcio (Borisjuk 1998). La CRT se ha encontrado asociada con otras proteínas en el lumen del ER rugoso, tiene especificidad similar a la de CNX. El reconocimiento y la unión con CRT precede a la acción del ER rugoso y a las enzimas sobre péptidos no plegados y que aceleran la reacción del plegamiento.

Muchas de las interacciones deben ocurrir secuencialmente en el orden adecuado para que las proteínas alcancen la estructura nativa correcta. CNX y CRT promueven el plegamiento correcto de las proteínas en el ER rugoso mediante la inhibición de la agregación, previniendo la oxidación y oligomerización prematuras, y suprimiendo la degradación de intermediarios incompletos o mal plegados.

Las Proteínas de estrés de bajo peso molecular

Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular con un peso real de 12-30 kDa (smHSPs) son ubicuas entre eucariontes, y representan una clase determinada e importante de chaperonas moleculares (Vierling, 1991). Las smHSPs comparten un dominio conservado C-terminal con una de las proteínas del cristalino de los mamíferos, o α -cristalina. Los análisis bioquímicos indican que *in vivo* los smHSPs no están como monómeros /dímeros sino en agregados de alto peso molecular de 200 a 400 kDa. A pesar de la gran variedad de las especies de smHSPs, aparecen como homo-complejos separados de alto peso molecular, más bien que como hetero-complejos o mezclas de subunidades, se unen e interaccionan más entre ellas que con otras familias. Esto sugiere sutiles y diversas funciones para las smHSPs, incluso cuando están presentes en el mismo compartimento (Muchowski 1999) celular.

In vitro, las smHSPs conservan y facilitan la reactivación de proteínas químicamente desnaturadas y previenen la agregación de proteínas desnaturada por calor (Boston et al., 1996). De acuerdo con estas observaciones, es probable que las smHSPs puedan también actuar *in vivo* como chaperonas moleculares. En contraste con los miembros de las otras clases de chaperonas moleculares, la actividad de las smHSPs es ATP independiente. En plantas superiores, se han descrito seis familias de genes nucleares que codifican para smHSPs. Cada familia codifica proteínas que se encuentran en compartimentos celulares distintos, incluyendo el citoplasma, los plástidos, el ER rugoso, y las mitocondrias (Waters 1996). Además, las smHSPs específicas se expresan durante varias fases del desarrollo vegetal (Boston et al., 1996). Este es el caso de la del girasol o hsp17.6 G1. El mRNA de este gene se acumula en las semillas durante las últimas etapas de desecación de la embriogénesis pero no como respuesta a choque térmico. Este promotor tiene poca semejanza con los del choque del calor. Existe una

divergencia evolutiva en la regulación de los genes vegetales de smHSP que ha originado genes que responden al estrés y miembros no sensibles al calor (Carranco 1997)

En fríjol de soya las smHSPs tienen entre 15 a 18 kDa, se encuentran codificadas por distintas familias de genes principalmente de la clase I y clase VI, y son el Gmhs18.5-C y el Gmhs17.9-D. Además, están regulados como respuesta al choque térmico, tienen cierta homología en su estructura secundaria y en el dominio C-terminal con otras proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, se sabe que los genes presentan regiones ricas en A y T pero su función todavía no está dilucidada. (Reschke, Baumann y Schoffl 1988)

En eucariontes parecen estar regulados de la misma forma, pues al transfectar genes de este tipo estos se expresaron, por lo que parecen tener reguladores comunes. El análisis de la secuencia de los genes de choque térmico de *Drosophila* reveló una secuencia conservada que es esencial para la inducción del calor. (Taguay 1983)

Dentro de las smHSPs se encuentra la α -cristalina, proteína del cristalino bovino esta tiene la función de chaperona molecular ya que impide la desnaturalización de otras proteínas al estabilizarlas, lo consigue mediante una acción surfactante al reaccionar hidrofólicamente con monómeros aniónicos. Las proteínas de esta familia tienen en común la región C-terminal, la que seguramente está relacionada con la acción de chaperona molecular, es una región estable de 90-100 residuos, es la estabilidad la que las capacita para soportar distintas condiciones y ser ubicuas. Tienen una amplia gama de funciones desde antígenos en membrana hasta replegadoras de proteínas desnaturalizadas. Se cree que tienen un papel importante en su autorregulación (Merck 1993)

Las smHSPs se encuentran muy diversificadas en plantas en estas se encuentran en cinco familias de genes y una en hongos. Estas tienen homologías y se encuentran relacionadas filogenéticamente, sus genes parecen haber sufrido duplicaciones, divergencias y convergencias, lo que indica que evolucionan a distintos ritmos y es muy probable que hayan cambiado de función y localización celular. (Waters 1995)

La cepa PB18 de *Streptococcus thermophilus* sobre-expresa una proteína de peso molecular de 16kDa en condiciones ácidas. Al acidificarse el medio en que crece este microorganismo (pH <5) la proteína aumenta en concentración. La comparación de la secuencia génica de las proteínas de esta bacteria láctica demostró tener homología con el dominio del α -cristalino lo que hace suponer que quizá ésta es una proteína de choque térmico, aunque su papel fisiológico todavía no está bien determinado (González 1997). Si esto es cierto entonces se espera encontrarla en forma nativa como un agregado de alto peso molecular.

Se han purificado otras proteínas de choque térmico de bajo peso molecular en microorganismos, y una de peso molecular similar (16.6 kDa) en cianobacterium *Synechocystis* sp la cual fue aislada y clonada en el plásmido pGEMT, esta es una proteína de respuesta al calor (Segyong 1998)

JUSTIFICACIÓN

Las proteínas de choque térmico no han sido totalmente estudiadas, la forma específica en que se ligan a otras proteínas y como actúan para amortiguar las agresiones del medio no están totalmente dilucidadas. La purificación y posterior estudio de la estructura de estas proteínas daría respuesta a las interrogantes sobre su funcionamiento.

Las proteínas de choque térmico son de gran importancia para los procesos biológicos no solo por la cantidad de estos en que intervienen sino por su amplio dominio de las funciones celulares y de las distintas especies en que estas se expresan, ya que algunas de estas familias son ubicuas en especial la familia de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, la diversidad de funciones de estas dan un marco para reconocer la importancia de conocer las estructuras y funciones de esta familia de sHSPs y en especial la familia de 16 kDa que se encuentra en un microorganismo de importancia comercial como es el *Streptococcus thermophilus*.

En particular las HSPs de bajo peso molecular están muy poco estudiadas, esto no está relacionado con su importancia, ya que son capaces de interacciones con otras proteínas y entre ellas mismas formando complejos de alto peso molecular, de los cuales se conoce su función como replegadoras de proteínas desnaturalizadas. En algunos casos no se sabe como funcionan ni como logran las interacciones que les permiten llevar a cabo su función, este es el caso de la sHSP de 16 kDa ya mencionada. El presente trabajo se centrará en dar información y conocimiento en torno a este grupo de HSPs de 16Kd en *S. Thermophilus* pb 18 .

OBJETIVOS

Encontrar la cepa que produzca la Hsp de 16kD, montar la técnica de purificación de proteínas de bajo peso molecular por cromatografía de intercambio iónico como pre-purificación y purificación por cromatografía en fase reversa, a partir de la proteína purificada. Caracterizar los agregados por medio de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o Nativa.

METODOLOGIA

Cultivo y sonicación.

Se realizaron pre-cultivos de *S. thermophilus* en leche descremada en polvo al 10% y se incubaron por 16 hrs. a 42 grados centígrados. Una vez obtenida la consistencia de cuajo se inoculó medio M17 con 1% del precultivo y se incubaron por 5-7 horas hasta que las bacterias floclaron.

Se centrifugó el medio con las bacterias a 6000 x g por diez minutos a 4 grados centígrados. Para recuperarlas, se lavó el botón con amortiguador de fosfatos (NaHPO₄ 50 mM, Na₂HPO₄ 50mM, pH 7) hasta lograr un pH neutro.

El botón se resuspende en amortiguador de sonicación (glicerol 10%, DTT 0.01%, Tris-HCl 50mM pH 7). Se sonicó por 10 min. intermitentemente al límite de la resistencia de la micro-punta. Se centrifugó a 6000 x g por diez minutos a 4 grados centígrados, se colectó el sobrenadante.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación se realizó por el método de Bradford. Este se basa en la unión del colorante (azul de Coomassie brillante) a las proteínas. Propio para la cuantificación de 1 a 10 µg de proteína, usamos un estándar de ABS, haciendo distintas diluciones y determinaciones por duplicado para formar una curva patrón (0.025, 0.05, 0.75, 0.1 µg/ml de ABS con una solución de NaCl 0.15M). Se le añadió 1 ml de reactivo de Bradford (100 mg de azul de Coomassie brillante G-250, etanol al 95% 50 ml, ácido fosfórico al 85% 100ml, aforar a un litro y filtrar). Se agitó y dejó reposar 2 min. Se leyó en un espectrofotómetro (Beckman 480, programado para hacer los cálculos del método) a 595nm.

Se hicieron dos diluciones, cada una por duplicado, para cuantificar la proteína total. Estas fueron 1:20 y 1:50 en solución salina. A 100µl de estas diluciones se les agregó 1 ml de reactivo de Bradford, se dejó reposar por dos minutos y se leyó a 595nm.

SDS-PAGE

Gel de Separación

El gel de separación al 14% se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 4.66 ml de acrilamida al 30 %, (Acrilamida Bio-Rad en solución (30 % Acrilamida/Bis acrilamida 37.5:1(2.6 % C) 2.68 ml de agua desionizada, 2.5 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8 se desgasificó con bomba de vacío durante 10 minutos. Inmediatamente después se agregaron 100 µl de SDS, 50µl de APS al 10 % y 5 µl de TEMED 0.01 %. La cámara electroforética (Miniprotein II Bio-Rad.) previamente armada con separadores de 0.75 mm, se llenó con la mezcla ya mencionada. Se añadieron unas gotas de isobutanol y se dejó polimerizar al menos una hora.

Gel de Compactación

El gel de compactación al 4 % se preparó con 1.33 ml de Acrilamida al 30 %, 6.1 ml de agua desionizada, 2.5 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, se desgasificó con una bomba de vacío durante 10 minutos. Se agregaron 100 µl de SDS, 50µl de APS al 10 % y 10 µl de TEMED, se dejó polimerizar.

Preparación de las muestras

Las muestras para electroforesis se prepararon a una concentración de 1 mg/ml de proteína. En caso de que el volumen de la muestra fuera demasiado grande, las proteínas se precipitaron agregándoles 4 volúmenes de acetona fría, se incubaron en hielo durante 15 minutos. Se centrifugaron a 23,641 x g. durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón se secó y se le agregó el amortiguador de muestra (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, Glicerol 8%, SDS 1.6%, azul de bromofenol 0.025% y justo antes de usarse se le agregaron 400µl de β-mercaptoetanol por cada 10 ml de amortiguador de muestra). En los geles ya polimerizados se colocaron aproximadamente 25 µg de proteína, 5µl de marcadores (Los marcadores de peso

molecular utilizados fueron estándares de bajo rango Bio-Rad.) y se sometieron a un campo eléctrico de 200 V durante 45 minutos.

Coloración de los geles.

Los geles se colocaron en una solución fijadora de etanol al 30 % y ácido acético al 10 % durante 30 minutos, posteriormente se sumergieron en una solución (A) de Azul de Coomassie al 0.025 %, propanol al 10 % y ácido acético al 10 % durante 30 minutos, después se sumergieron en la solución (B) Azul de Coomassie al 0.0025 % propanol al 10 % y ácido acético al 10 % durante 30 minutos. Para decolorar el fondo y el exceso de colorante se sumergieron en una solución de ácido acético al 10 %.

PRECIPITACIÓN Y PURIFICACIÓN.

Se agregó sulfato de amonio hasta 10% de saturación . Se recuperó el sobrenadante y precipitó con sulfato de amonio al 85% de saturación, se conservó el precipitado.

El botón se dializó contra H₂O dd por 12 hrs, la concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford.

El siguiente paso de purificación consistió en el paso de la proteína por una columna de intercambio iónico (cartucho High Q 5ml Bio-Rad) con un gradiente de 300mM (Tris-HCl pH 7.5 50mM + NaCl 1M) a 750mM en 45 min .

Las fracciones con la proteína de interés se dializaron, liofilizaron y se prepararon para la cromatografía en fase reversa (columna C4) con un gradiente de 35% al 55% CH₃CN-TFA 0.1% y agua-TFA 0.1% . La elución de las proteínas se siguió mediante la densidad óptica a 280nm y 215nm. Comprobando la presencia de la proteína de 16 kDa y su pureza mediante PAGE-SDS al 14% la presencia de la proteína en las fracciones con un patrón adecuado .

CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS.

Liofilizadas las fracciones de interés se resuspendieron en buffer para muestras nativas (Tris 250mM, glicina 1.94M, EGTA 2mM, 1000ml H₂O dd y glicerol 10%) cuidando que se tuviera la máxima cantidad de proteína en el mínimo volumen, y se corrió un gel nativo al 10% (acrilamida 4ml, H₂O dd 6.72ml, buffer Tris 250mM, glicina 1.94M, EGTA 2mM 1000ml H₂O dd pH 6.8) en buffer para geles nativos (10X-Tris 250mM, glicina 1.94M, EGTA 2mM, 1000ml H₂O dd).

Coloración de los geles.

Los geles se colocaron en una solución fijadora de etanol al 30 % y ácido acético al 10 % durante 30 minutos, posteriormente se sumergieron en una solución (A) de Azul de Coomassie al 0.025 %, propanol al 10 % y ácido acético al 10 % durante 30 minutos, después se sumergieron en la solución (B) Azul de Coomassie al 0.0025 % propanol al 10 % y ácido acético al 10 % durante 30 minutos. Para decolorar el fondo y el exceso de colorante se sumergieron en una solución de ácido acético al 10 %.

RESULTADOS.

Una vez obtenida la cepa PB18 de *Streptococcus thermophilus* se sonicó para extraer las proteínas totales intracelulares. Se cuantificaron las proteínas y se corrió un gel SDS-PAGE al 14% en condiciones reductoras con el propósito de verificar la presencia de la proteína de choque térmico de 16kDa.

Las cuantificaciones se hicieron por el método de Bradford contra un estándar de ABS en distintas proporciones, a partir de la cual se hizo un análisis de regresión lineal para interpolar las absorbancias obtenidas de las diluciones de proteína total (1:100 y 1:200).

En la tabla 1 se muestran los resultados de las estimaciones hechas a partir de los cultivos de *S. thermophilus* cepa PB18, a partir de un volumen de 1.5l de medio de cultivo cada uno.

Tabla 1. Cuantificación de las proteínas liberadas por las *S. thermophilus* PB18 después de sonicación.

<i>Cultivo</i>	<i>M-17 XII</i>	<i>M-17 XIII</i>
<i>Abs promedio 1:100</i>	<i>0.2697</i>	<i>0.7625</i>
<i>Abs promedio 1:200</i>	<i>0.16155</i>	<i>0.7067</i>
<i>proteína en ug/ml 1:100</i>	<i>53.1522</i>	<i>160.2826</i>
<i>proteína en ug/ml 1:200</i>	<i>29.6413</i>	<i>148.1522</i>
<i>Factor de dilucion 100</i>	<i>5315.2174</i>	<i>16028.261</i>
<i>Factor de dilucion 200</i>	<i>5928.2609</i>	<i>29630.435</i>
<i>Proteína promedio en mg/ml</i>	<i>5.6517</i>	<i>30.8412</i>

Las determinaciones se realizaron por separado en dos distintas diluciones 1:100 y 1:200 respectivamente, así como su promedio y cuantificación final en mg el nombre del cultivo corresponde al numero de cultivo .

Una vez que obtenida la concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$), se multiplicó por el numero de mililitro en los que el botón se resuspendió, el volumen depende de cuan grande es el botón y cuanto es el volumen en conjunto con el buffer de sonicación. Por esta razón el volumen final de las proteínas cuantificadas varia un poco tomando en cuenta que era una técnica a estandarizar es un buen resultado el saber en cuanto volumen de buffer se pueden sonicar sin perder solubilidad de la proteína.

En la Tabla 2 se muestran los resultados totales y los promedios de mg de proteína así como los volúmenes de solución a partir de la cual se cuantifico.

Tabla 2. Volúmenes por cultivo en mililitros, miligramos totales por cultivo

<i>cultivo</i>	<i>M-17XII</i>	<i>M-17 XIII</i>
<i>Volumen en ml</i>	<i>10</i>	<i>12.5</i>
<i>mg totales</i>	<i>56.51</i>	<i>385.51</i>

El extracto total de proteínas obtenida de *S. thermophilus* PB18 se cuantifico por método de Bradford, se dializó contra el buffer usado para lacromatografía de intercambio iónico y se diluye la muestra a ~10mg/ml. Se verifica que la banda de interés se encuentre en la muestra y se determina su M_r . La figura X corresponden a la(SDS-PAGE) hechas a partir de los cultivos en medio M-17 de *S. thermophilus* PB18, el numero del cultivo y los pesos moleculares se encuentran indicados en los márgenes de la figura.

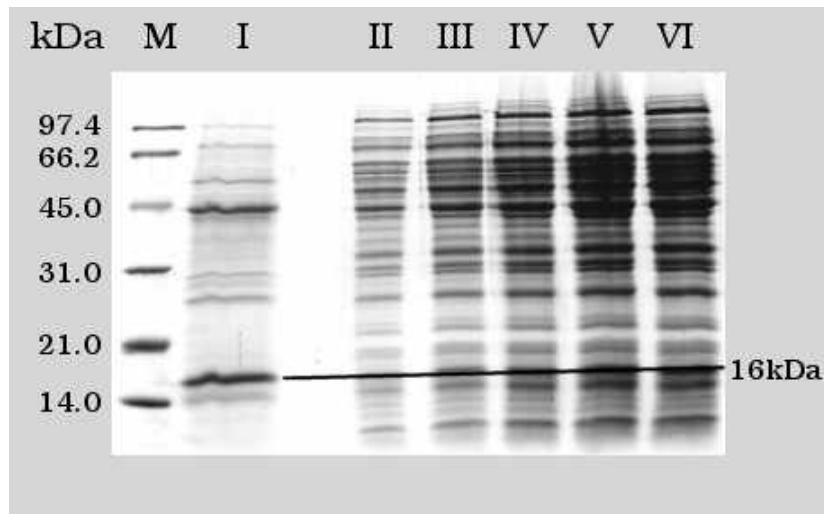
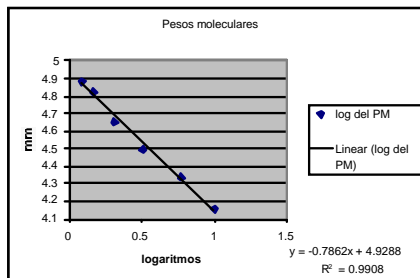


Fig. 1. Ejemplo de SDS-PAGE al 14 % , M, marcador de peso molecular (BioRad low range) que tiene varias bandas de proteínas purificadas que van de los 97.4 kDa a los 14 kDa. I, estándar de semipurificación de proteína *S. thermophilus* PB18, del carril II al VI se ve la muestra de proteína total de *S. thermophilus* PB18 en diferentes cantidades de solución en buffer de muestra. La proteína se choque térmico de 16 kDa se encuentra identificada en los carriles con una línea que indica el peso molecular.

Podemos ver (figura 1) la banda fácilmente en el extremo inferior del gel muestra, el cálculo del peso molecular de la banda se hizo con un análisis de regresión lineal, usando como valores de regresión la migración de las bandas en el gel expresado en mm.

Ejemplo de regresión lineal hecha para el cálculo del peso molecular de la banda que se presume la proteína de choque térmico de 16kDa.

<i>milímetros</i>	<i>log del PM</i>
<i>0.085</i>	<i>4.88</i>
<i>0.17</i>	<i>4.8208</i>
<i>0.31</i>	<i>4.6532</i>
<i>0.51</i>	<i>4.4913</i>
<i>0.77</i>	<i>4.3324</i>
<i>1</i>	<i>4.1583</i>



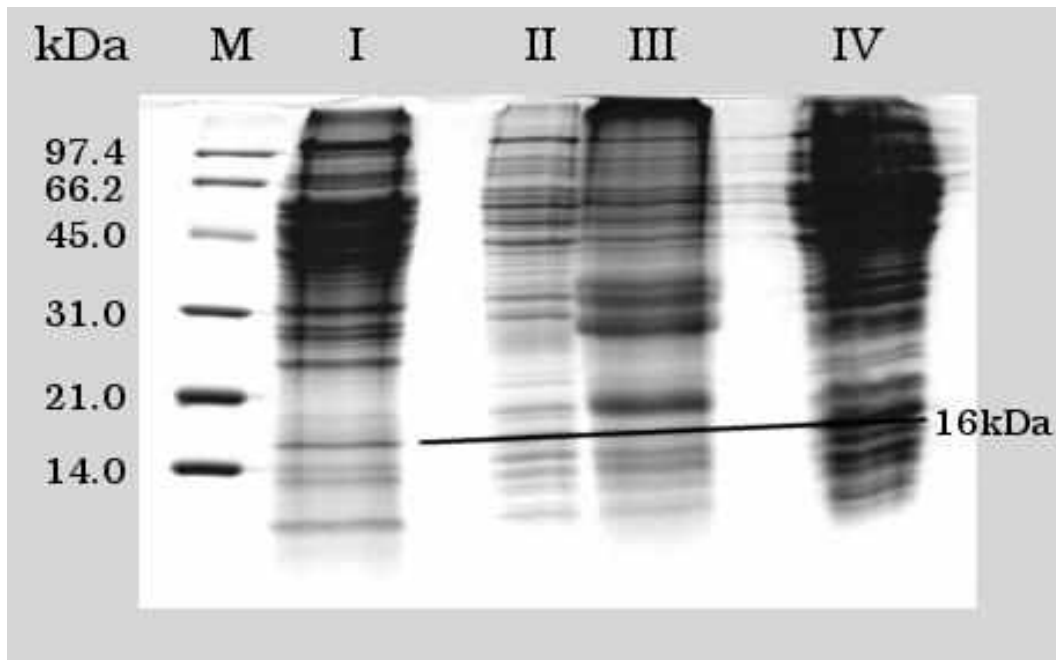


Fig. 2. M-17 XII SDS-PAGE al 14 % , M, marcador de peso molecular (BioRad low range) que tiene varias bandas de proteínas purificadas que van de los 97.4 kDa a los 14 kDa. I, estándar de semipurificación de proteína *S. thermophilus* PB18, del carril I al III se ve la muestra de proteína total de *S. thermophilus* PB18 M-17 XII en diferentes cantidades de solución en buffer de muestra, I proporción 2:1, II Proporción 1:1 y III proteína total. La proteína de choque térmico de 16 kDa se encuentra identificada en los carriles con una línea que indica el peso molecular.

Los cultivos se procesaron para obtener la proteínas intracelulares el resultado es una mezcla de todas las proteínas intracelulares de la bacteria láctica *S. thermophilus*, una vez que se obtuvo este preparado de proteínas celulares y se identifica la banda perteneciente a la proteína de 16 kDa (Fig.2 y 3), se procede a cuantificar las proteínas totales y a precipitarlas con sulfato de amonio.

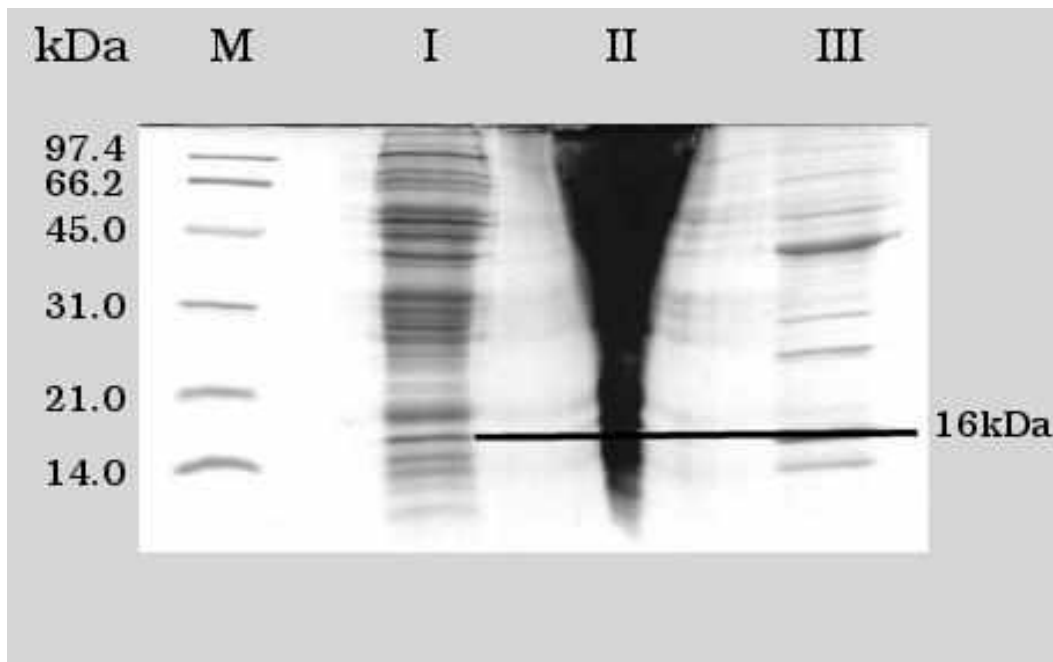


Fig. 3. M-17 XIII SDS-PAGE al 14 % , M, marcador de peso molecular (BioRad low range) que tiene varias bandas de proteínas purificadas que van de los 97.4 kDa a los 14 kDa. E, estándar de semipurificación de proteína *S. thermophilus* PB18, carril I y II se ve la muestra de proteína total de *S. thermophilus* PB18 M-17 XIII en diferentes cantidades de solución en buffer de muestra, I proporción 2:1, II Proporción 1:0.5 . La proteína de choque térmico de 16 kDa se encuentra identificada en los carriles con una línea que indica el peso molecular.

En los geles (fig. 2 y 3) podemos ver la proteína total en la cual se encuentra la banda de 16 kDa perteneciente a la proteína de choque térmico (sHSP) que nos interesa.

El paso siguiente fue el inicio de la purificación el cual se realiza por medio de una cromatografía de intercambio iónico, en un cartucho High Q, se inyectó un mililitro de muestra 10mg/ml y se corrió con un gradiente de 400mM a 900mM de NaCl en buffer Tris-HCl pH7.5 en 30 minutos con un flujo de 1 ml /min. En el cromatograma (Fig. 4) podemos observar el pico de inyección y los picos pertenecientes a las diversas fracciones de . Una identificada la eproteína de interes por medio de un SDS-PAGE (Fig. 5) .

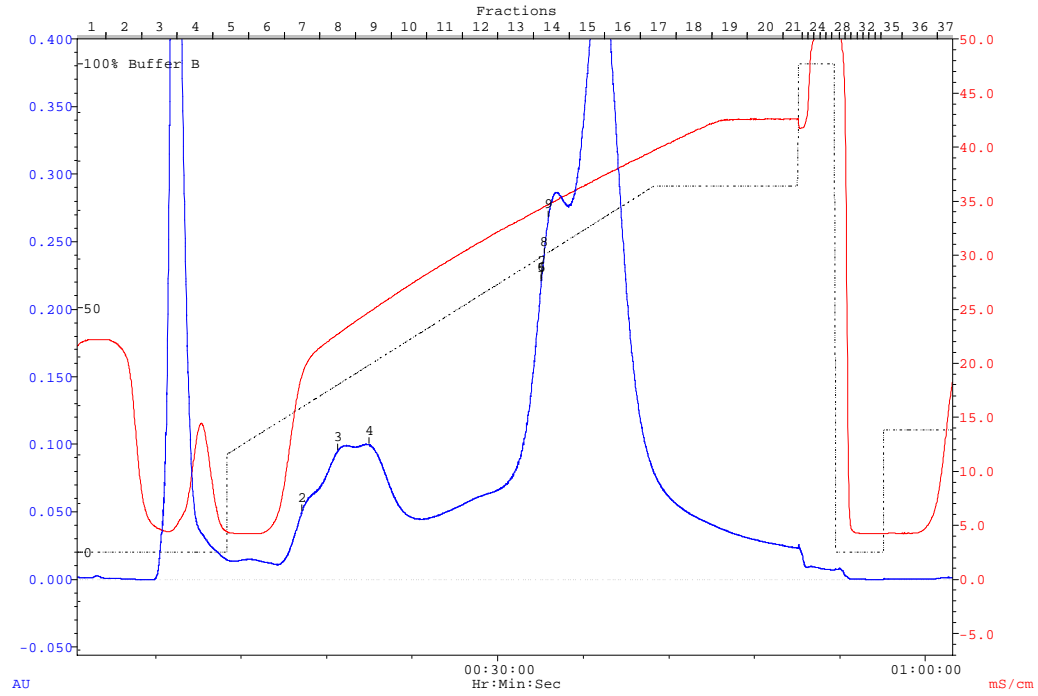


Fig. 4 Cromatograma de la proteína total al pasar por un cartucho High Q de intercambio iónico. El pico 1 es el pico de inyección, la zona marcada como 2 corresponde a las fracciones 3 y 4, la zona marcada como 3 es el pico de la fracción ocho en la que se encuentra la proteína de 16 kDa, el resto de las zonas marcadas corresponde a otras fracciones donde no se encontró la proteína buscada.

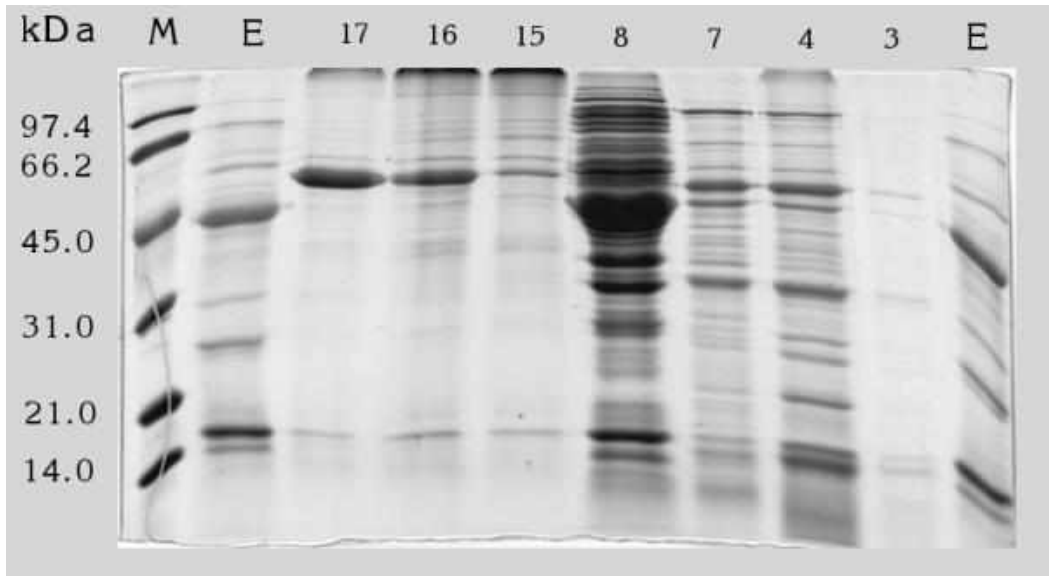


Fig.5 SDS-PAGE al 14 % , M, marcador de peso molecular (BioRad low range) que tiene varias bandas de proteínas purificadas que van de los 97.4 kDa a los 14 kDa. E, estándar de semipurificación de proteína *S. thermophilus* PB18.

Comentario: poner el pie de figura del cartel

La purificación por medio de una cromatografía en fase reversa, esta se hizo en un gradiente de 35% a 55% (H₂O-TFA 1% contra acetonitrilo-TFA 1%) se identifico el pico mayor a 280nm y se corrió un SDS-PAGE para verificar la banda (Fig. 6)

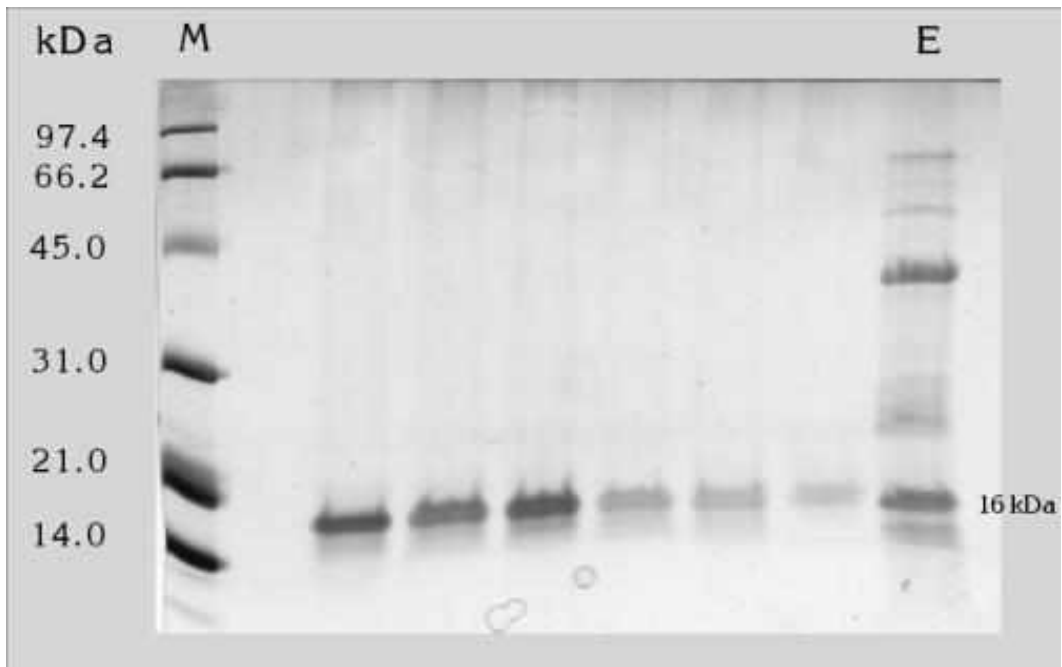


Fig 6 Fig. SDS-PAGE al 14 % , M, marcador de peso molecular (BioRad low range) que tiene varias bandas de proteínas purificadas que van de los 97.4 kDa a los 14 kDa, resultado de la cromatografía en fase reversa de la fracción ocho, las bandas se obtuvieron entre el minuto 38 y 42 de la cromatografía

Comentario: poner pie de figura del cartel

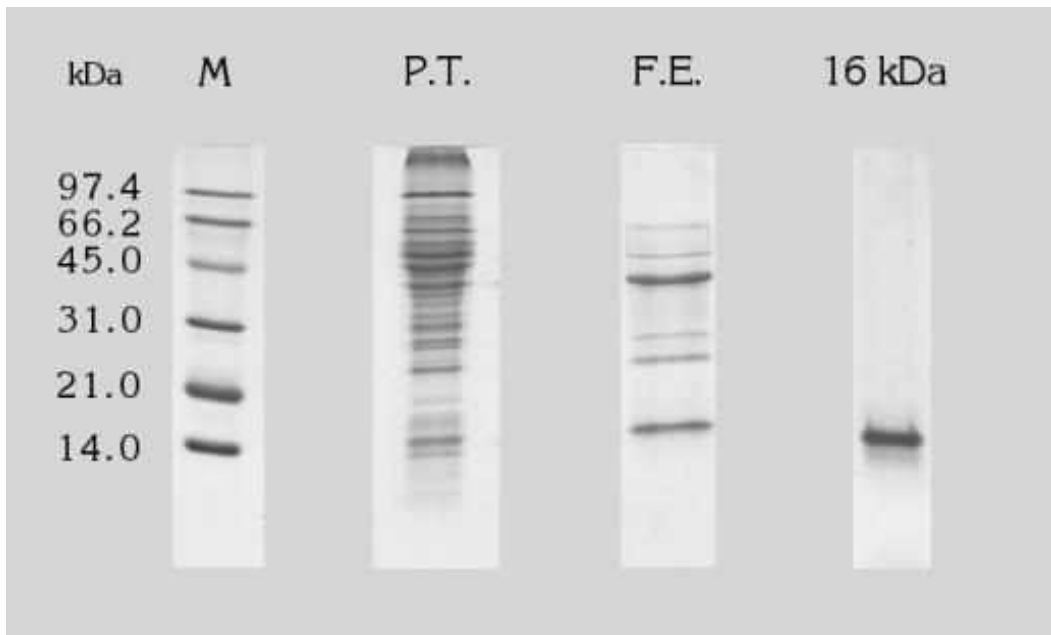


Fig 7 Este es un ejemplo de los Pasos consecutivos de purificación, podemos ver como se parte de una mezcla total de 4 proteínas intra celulares, y como se van eliminando las distintas proteínas (bandas) en cada paso. M es el marcador de peso molecular, PT la proteína total, FE la fracción estándar y finalmente la proteína pura marcada como 16 kDa

Una vez purificada la proteína (Fig 7) se liofilizó y resuspendió en buffer nativo para el siguiente paso, la caracterización primaria de agregados.

La muestra se trató con calor para inducir la formación de agregados de alto peso molecular, una vez calentada la muestra a 50⁰ C por 15 minutos se corrió en un gel nativo (Fig 8), los agregados pueden observarse en el gel nativo o en condiciones no desnaturizantes, una característica de este gel es que no se le agrega SDS el cual es un detergente usado en el SDS-PAGE para uniformar la carga de las proteínas desnaturizadas así como para evitar su replegamiento lo que permite ver a las proteínas como delgadas bandas que migran dentro del gel solo en base a su peso molecular. En cambio en una electroforesis nativa se permite este replegamiento y no se calienta la muestra a temperaturas de desnaturización, las proteínas corren en función de su carga y de su forma tridimensional, siendo identificables como líneas gruesas o como manchas en el gel ya teñido.

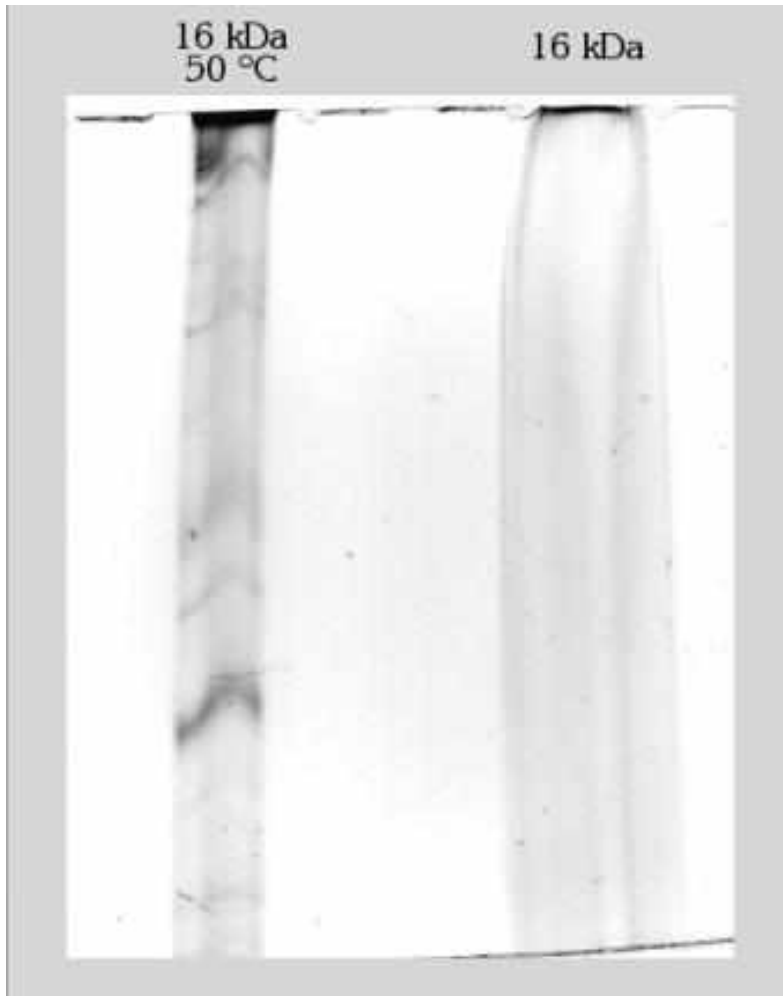


Fig.8 Gel nativo al 10 %, en los carriles podemos ver la proteína de de 16 kDa de *S. thermophilus* purificada, la proteína se calentó a 50⁰ C por 15 minutos para fomentar la formación de agregados de alto peso molecular, en el carril marcado como 16 kDa se corrió la proteína purificada sin calentamiento previo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Una vez obtenidas las bacterias, la sonicación es el paso siguiente para romper las membranas y obtener las proteínas intracelulares como un extracto multiproteínico producido por el microorganismo. Una vez cuantificadas, verificamos que la proteína de interés se encuentre en la mezcla de proteínas del extracto total mediante una electroforesis SDS-PAGE. Ya identificada por medio del peso molecular, procedemos a los distintos pasos de purificación.

La purificación de proteínas es un trabajo arduo ya que una célula típica contiene miles de especies diferentes. Además, todas las proteínas presentan una gran semejanza en sus propiedades físicas y químicas, asimismo, proteínas diferentes pueden desempeñar funciones idénticas.

Para aislar una proteína es necesario conseguir su disolución, esto se puede lograr con detergentes o disolventes orgánicos, pero estos se deben utilizar con precaución ya que pueden desnaturalizar la proteína de interés.

Una vez que se ha separado una proteína de su entorno natural, se halla expuesta a muchos agentes que pueden dañarla irreversiblemente. Estas influencias deben controlarse cuidadosamente en todas las fases de un proceso de purificación, si no el rendimiento en la proteína deseada puede reducirse mucho. El estado de pureza de una sustancia que se está aislando debe seguirse a lo largo del procedimiento de purificación mediante un método analítico.

Las proteínas se desnaturalizan con facilidad a temperaturas elevadas, por esta razón, la purificación de las proteínas se debe llevar a cabo una temperatura de 0-4°C, para la mayoría de los casos, sin embargo la proteína de choque térmico de 16 kDa demostró ser resistente a temperatura ambiente lo que hizo que no siempre fuera necesario mantenerla a 0-4°C.

Las proteínas se desnaturalizan frecuentemente cuando sus concentraciones son pequeñas y por contacto con agentes oxidoreductores, entonces una disolución de proteína debe conservarse concentrada y manipularla de modo que la formación de espuma sea la mínima posible, ya que las burbujas tienen una gran superficie de contacto con el medio. La oxidación es otro fenómeno que puede modificar a las proteínas en el momento de su purificación, esta se evita con agentes reductores como el DTT (ditiotreitól) o el β -mercaptoetanol

La electroforesis (migración de iones en un campo eléctrico), se emplea profusamente para la separación analítica de moléculas biológicas. En la electroforesis en gel se emplea como soporte geles de diferentes sustancias. El principal soporte es el de poliacrilamida-bisacrilamida con enlaces transversales. Si además se incluye SDS, las moléculas se separan principalmente de acuerdo con su tamaño. El SDS (dodecil sulfato de sodio) es un detergente aniónico que desnaturaliza a las proteínas y las recubre uniformemente dándoles una misma densidad de carga se parando la mezcla proteínica por peso molecular.

La purificación es un procesos mediante el cual se separa a una proteína de una mezcla. Existen diferentes formas de separa una proteína, una de las más usadas es la cromatografía, la cual separa basada en propiedades físicas de las proteínas, factores como la carga y la afinidad por un soporte o matriz son básicas para la separación en fracciones de proteínas con propiedades similares. Así se utilizó primero la técnica de precipitación salina mediante sulfato de amonio con lo que se separaron las especies solubles en presencia de esta sal. La separación mediante una columna de intercambio iónico, la que separa proteínas con base en su afinidad iónica por la matriz, mientras se le hace pasar una mezcla de una disolución estándar contra una disolución con un Ion competidor, que compite por la afinidad por la matriz con las proteínas previamente adheridas por medio de enlaces de tipo polar a la matriz. Al aumentar la fuerza iónica de la dilución al manipular los porcentajes de la solución iónica contra la solución no iónica, las proteínas se desprenden de la matriz al ser igualada su fuerza iónica, obteniendo así a las proteínas con propiedades ionicas similares en la solución. Estas cantidades de solución llamadas fracciones se analizan por medio de una SDS-PAGE para identificar las especies

proteínicas en la fracción y continuar con la purificación de las proteínas o proteína en la que estemos interesados. El siguiente paso de purificación es una cromatografía, en fase reversa. La diferencia entre este tipo de cromatografía y la cromatografía de intercambio iónico es el tipo de interacción que se aprovecha. En la fase reversa se obliga a la proteína a tener un cambio estructural disolviéndola en un solvente orgánico acidificado. Esto favorece la exposición de las regiones hidrofóbicas de las proteínas de la fracción a purificar. Ahora el competidor será un solvente orgánico diluido en agua en condiciones ácidas, compitiendo con una matriz apolar.

La caracterización de agregados se lleva a cabo con una electroforesis en acrilamida en condiciones no desnaturizante. Se eliminan los reactivos y pasos de desnaturización como son el SDS y el precalentamiento de la muestra, los cuales desnaturizan las estructuras cuaternaria y terciaria de las proteínas.

Al no estar desnaturizada una proteína tiende de manera natural a replegarse, lo que nos permite analizar los agregados que la proteína replegada pueda formar de manera natural en condiciones *in vitro*. Los agregados se observan como manchas y bandas sumamente gruesas en el gel nativo, las condiciones de corrimiento son también distintas ya que la migración de los agregados dependerá de la carga y el tamaño así como la forma tridimensional de los agregados así los agregados más grande migran menos mientras los menores migran más, así podemos hacer un análisis de que tamaño de agregados que se obtienen cambiando las condiciones físicas de la solución de proteína, como cambiar la temperatura la cual se sabe promueve la formación de agregados.

En los resultados pudimos observar los distintos pasos de obtención (Fig. 2, 3 y 4) y purificación (Fig. 5, 6 y 7) del presente trabajo de proyecto de investigación docente.

Se obtuvo la proteína pura (fig. 6) a partir de la cual se procedió a la primera caracterización de agregados de alto peso molecular, se sabe que estos agregados son la forma funcional de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, habiendo demostrado nuestra proteína de 16 kDa tener homología con esta familia de proteínas de choque térmico. Se pudo constatar la formación de agregados de alto peso molecular al ser expuesta a un choque térmico de 50°C por 15 minutos (Fig8), siendo este un primer paso para la caracterización de esta proteína de choque térmico proveniente de la bacteria láctica *S. thermophilus* cepa PB18, y un paso importante para tener un conocimiento más completo del mecanismo mediante el cual estas proteínas de bajo peso molecular cumplen su función como respuesta a estrés y el cual no está aún dilucidado.

Bibliografía

- Boston, R. S., Viitanen, P. V. and Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol* **32**, 191-222.
- Brunt, S., Perdew, G., Toft, D. and Silver, J. (1998). Hsp90-containing multiprotein complexes in the eukaryotic microbe *Achlya*. *Cell Stress Chaperones* **3**, 44-56.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* **24**, 136-41.

Bukau, B. and Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-66.

Carranco, J., Almoguera, C. and Jordano, J. (1997). A plant small heat shock protein gene expressed during Zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *Biol Chem* **272**(43), 274-283.

Caver, J., Anquilina, J., Cooper, P., Williams, G. and Truscott, J. (1994). Alfa-crystallin molecular chaperone and protein surfactant. *Biochim Biophys Acta* **1204**, 195-206.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* **79**, 129-68.

Gebauer, M., Melki, R. and Gehring, U. (1998). The chaperone cofactor Hop/p60 interacts with the cytosolic chaperonin-containing TCP-1 and affects its nucleotide exchange and protein folding activities. *J Biol Chem* **273**, 29475-80.

González-Márquez, H., Perrin, C., Bracquart, P., Guimont, C. and Linden, G. (1997). A 16kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiol* **143**, 1-8.

Hemmingsen, S., Woolford, C., Van der Vies, S., Tilly, k., Dennis, D., Georgopoulos, C., Hendrix, R. and Ellis, R. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**, 330-334.

Hoskings, J., Pak, M., Maurizi, M. and Wickener, S. (1998). The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpP. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12135-12140.

Kantarow, M. and Piatigorsky, J. (1994). Alpha-crystallin/small heat shock protein has autokinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3112-3116.

Lindquist, S. (1992). Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 748-55.

Lindquist, S. and Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, 631-77.

Mayr, E. and Jaenicke, R. (1994). Domain interaction and connecting peptides in lens crystallins. *J Mol Biol* **235**, 84-88.

Miernyk, J. A. (1999). Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol* **121**, 695-703.

Mogelvang, S. and Simpson, D. (1998). Protein folding and transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in plants. *J Plnt Physiol* **153**, 1-15.

Muchowski, P. J., Hays, L. G., Yates, J. R., 3rd and Clark, J. I. (1999). ATP and the core "alpha-Crystallin" domain of the small heat-shock protein alphaB-crystallin. *J Biol Chem* **274**, 30190-5.

Netzer, W. J. and Hartl, F. U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* **23**, 68-73.

Nieto-Sotelo, J., Kannan, K. B., Martinez, L. M. and Segal, C. (1999). Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* **230**, 187-95.

Reddy, R. K., Kurek, I., Silverstein, A. M., Chinkers, M., Breiman, A. and Krishna, P. (1998). High-molecular-weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. *Plant Physiol* **118**, 1395-401.

Reschke, E., Baumann, G. and Schoffl, F. (1988). Nucleotid sequence analysis of soybean small heat shock protein genes belongin to two different multigene families. *J Mol Biol* **199**, 549-557.

Santoro, M. G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* **59**, 55-63.

Schirmer, E. C., Lindquist, S. and Vierling, E. (1994). An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* **6**, 1899-909.

Schoffl, F., Prandl, R. and Reindl, A. (1998). REgulation of the heat shock response. *Plnt Physiol* **117**, 1135-1141.

Sengyong, L., Daniel, J., Prochaska, Feng, F. and Barnum, S. (1998). A16.6-Kilodalton protein in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 plays a role in the heat shock response. *Cur Micro Biol* **37**, 403-407.

Sigler, P., Xu, Z., Rye, H., Burton, S., Fenton, W. and Horwich, A. (1998). Structere and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem* **67**, 579-620.

Taguay, R. (1983). Genetic regulation during heat shock and function of heat-shock proteins: a review. *Can J Biochem Cell Biol* **61**, 387-394.

Vierling, E. (1991). The roles of the heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **42**, 579-620.

Waters, E. R. (1995). The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* **141**, 785-95.

Waters, E. R. and Vierling, E. (1999a). Chloroplast small heat shock proteins: evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14394-9.

Waters, E. R. and Vierling, E. (1999b). The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses. *Mol Biol Evol* **16**, 127-39.

