

# PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

## EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA MERR DE LA BACTERIA PSICRÓFILA *BIZIONIA* *ARGENTINENSIS*

**Mogni, Guido – LU 1050017**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Smal, Clara, Fundación Instituto Leloir**

Co-Tutor:

**Cardozo, Julián, UADE**

**Mayo 29, 2018**



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## Resumen

La bacteria psicrotolerante *Bizionia argentinensis*, perteneciente al clado marino de la familia *Flavobacteriaceae*, resulta un modelo interesante para el estudio de proteínas con actividad biológica a bajas temperaturas. Dichas proteínas se encuentran adaptadas a las múltiples condiciones que dificultan la vida en estas temperaturas como la reducción de la actividad enzimática, la alteración de la fluidez de la membrana y la disminución de las tasas de transcripción, traducción y división celular. Por estas razones, resulta de gran utilidad el estudio de la estructura y función de dichas proteínas, en especial aquellas que conducen el metabolismo y el ciclo celular de estos organismos.

En este trabajo se presenta el estudio factores de transcripción de la familia MerR de esta especie, en particular, su estructura secundaria, su termoestabilidad y su interacción con el ADN. En este contexto, se realizó el clonado molecular de 3 construcciones generadas a partir de la proteína MerR-G con el sistema Gateway® Clonase with enzyme II, y se realizaron purificaciones de MerRG-HTH (una de estas construcciones) y de dos formas del factor de transcripción BA40, de la misma familia, una forma completa y una troncada, sin parte del extremo C-terminal.

Un estudio estructural, realizado mediante métodos de Dicroísmo circular, demostró el perfil predominante de  $\alpha$ -hélice en los dominios hélice-vuelta-hélice (HTH) de estas proteínas, así como la termoresistencia y reversibilidad de la termodesnaturalización de BA40 y MerRG-HTH.

Así mismo, pudo demostrarse mediante experimentos analizando la anisotropía de fluorescencia de ADN marcado con Fluoresceína, que tanto BA40 como MerRG-HTH interactúan con el ADN en forma dimérica a través de su dominio HTH, y que para la dimerización de BA40 resulta importante la presencia del extremo C-terminal.

De esta forma, los resultados obtenidos en este trabajo, contribuyen al mayor entendimiento de la estructura, estabilidad y funcionamiento molecular de las proteínas adaptadas al frío, así como también aportan potenciales líneas de estudios subsiguientes en el mismo campo para el laboratorio de RMN de Fundación Instituto Leloir.

## Abstract

Expression and characterization of transcription factors of the MerR family of the psychrophilic bacteria *Bizionia argentinensis*:

The psychrotolerant bacterium *Bizionia argentinensis*, belonging to the marine clade of the Flavobacteriaceae family, is an interesting model for the study of proteins with biological activity at low temperatures. These proteins are adapted to the multiple conditions that make life difficult in these temperatures, such as the reduction of enzymatic activity, the alteration of membrane fluidity and a decrease in the rates of transcription, translation and cell division. For these reasons, it is very useful to study the structure and function of cold-adapted proteins, especially those that drive the metabolism and cell cycle of these organisms.

In this work we present the study of transcription factors of the MerR family of this species, in particular, its secondary structure, its thermostability and its interaction with DNA. In this context, the molecular cloning of 3 constructs generated from the MerR-G protein was carried out with the Gateway® Clonase system with enzyme II, and purifications of MerRG-HTH (one of these constructions) and two forms of the transcription factor BA40, from the same family, a complete form and a truncated one without part of the C-terminal end, were performed.

A structural study, carried out using Circular Dichroism methods, showed the predominant  $\alpha$ -helix profile in the helix-turn-helix (HTH) domains of both proteins, as well as their thermoresistance and reversibility of the thermal denaturing.

Likewise, it was demonstrated, through the analysis of fluorescence anisotropy of Fluorescein-labeled DNA, that both BA40 and MerRG-HTH interact with the DNA in dimeric form through its HTH domain, and that for the dimerization of BA40, the presence of the C-terminal end seems to be important.

Thus, the results obtained in this work contribute to a greater understanding of the structure, stability and molecular functioning of cold-adapted proteins, as well as provide lines of work for subsequent studies in the laboratory of NMR of Fundación Instituto Leloir.

## Contenidos

Resumen .....	1
Abstract .....	2
Contenidos.....	3
Introducción.....	5
Antecedentes .....	5
Biodiversidad.....	5
Filo <i>Bacteroidetes</i> .....	8
Clado marino de <i>Flavobacteriaceae</i> .....	9
Estudio de la estructura y función de proteínas de <i>Bizionia argentinensis</i> .....	13
Superfamilia de factores de transcripción MerR .....	15
Clonado y Expresión .....	20
Sistema Gateway® .....	22
Dicroísmo Circular .....	26
Anisotropía de fluorescencia .....	28
Hipótesis.....	30
Metodología.....	30
Cepas bacterianas y cultivo .....	30
Bioinformática.....	31
Clonado .....	32
PCR .....	32
Sistema Gateway® .....	35
Análisis de ADN y Proteínas.....	36
Expresión y purificación .....	37
Expresión.....	37
Purificación por cromatografía de afinidad.....	38
Purificación por cromatografía de intercambio iónico.....	38
Western Blot.....	38
Determinación de estructura secundaria.....	39
Dicroísmo circular .....	39
Termodesnaturalización .....	40

---

Interacción al ADN .....	40
Espectrometría de fluorescencia.....	40
Resultados .....	40
Clonado .....	40
Expresión y purificación de MerR-G .....	43
Corte con TEV.....	46
Expresión y purificación de BA40 y BA40- $\Delta$ H5.....	47
Estructuras secundarias .....	51
Predicción bioinformática .....	51
Dicroísmo circular .....	51
Termodesnaturalización .....	54
Anisotropía de Fluorescencia .....	56
Espectrometría de masa.....	57
Verificación de expresión de MerRG-HTH .....	58
Segundo protocolo de purificación de MerRG-HTH.....	59
Conclusiones .....	64
Bibliografía.....	67
Anexos.....	76

## Introducción

### Objetivo general

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo general el de llevar a cabo la caracterización biofísica de dominios HTH de dos proteínas, pertenecientes a la superfamilia de factores de transcripción MerR, encontradas en la bacteria psicrófila *Bizionia argentinensis*, comparar los resultados obtenidos para ambos dominios y analizar la promesa futura que estos mismos tengan para ser estudiados en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Fundación Instituto Leloir.

### Objetivos específicos

Diseño y puesta a punto de protocolos para MerR-G: clonación (utilizando el sistema Gateway<sup>®</sup>), expresión y purificación del dominio HTH del factor de transcripción MerR-G.

Expresión y purificación de BA40: expresión y purificación de dos formas del factor de transcripción BA40, BA40 y BA40- $\Delta$ H5, cuyo clonado fue llevado a cabo previamente en el laboratorio.

Caracterización biofísica y comparación: Utilización de técnicas de dicroísmo circular, para estudiar las estructuras secundarias y la termodesnaturalización de las construcciones, y realización de ensayos de anisotropía de fluorescencia, para medir la interacción de las proteínas estudiadas con moléculas de ADN de secuencia aleatoria marcadas con fluoresceína.

## Antecedentes

### Biodiversidad

A lo largo del extenso proceso evolutivo en nuestro planeta, múltiples y variadas formas de vida se desarrollaron con la capacidad de sobrevivir, crecer y desarrollarse en condiciones ambientales que otros organismos considerarían verdaderamente extremas, se trata de los denominados “extremófilos” (Islas et al., 2007). La supervivencia y desarrollo de los organismos en un determinado hábitat dependen de una compleja suma de factores ambientales, tanto bióticos como abióticos.

La mayoría de los organismos extremófilos se incluyen dentro de los “microorganismos”, estos han sido seleccionados para ambientes altamente hostiles. Estos organismos son clasificados más comúnmente en función de sus capacidades de tolerancia,

como los termófilos, capaces de sobrevivir a temperaturas tan altas como 113°C (Burgess et al., 2007), o los psicrófilos, a temperaturas tan bajas como -20°C (Bakermans, 2008). También los hay halófilos, adaptados a concentraciones salinas superiores a 25% (Oren, 2007); acidófilos, pH inferior a 2 (Johnson, 2007); y alcalófilos, adaptados a pH superior a 10 (Yumoto, 2007); entre otras variantes de organismos extremófilos.

Debido a lo extremo de las condiciones en estos ambientes, la biodiversidad en ellos es relativamente baja (comparada, por ejemplo, con la abundancia de formas de vida mesófilas, adaptadas a ambientes moderados). Por esta misma razón, los organismos extremófilos presentan características verdaderamente únicas y de enorme interés, tanto desde un punto de vista académico como desde su potencial utilización en diversos procesos industriales y biotecnológicos (Herbert, 1992).

El descubrimiento de microorganismos aislados a partir de alimentos congelados en hielo data de la década de 1890, pero fue muy avanzado en el siglo pasado que comenzó a conocerse más sobre los organismos extremófilos. A finales de la década del 60 se habían logrado aislar bacterias presentes en los geiseres del parque nacional Yellowstone en Estados Unidos, los cuales podía crecer a temperaturas entre 70 y 100 °C. Algunos organismos hipertermófilos son capaces de soportar temperaturas superiores a 110 °C, y unos pocos pueden desarrollarse en las proximidades de surgentes hidrotermales submarinas, donde el agua emergente puede alcanzar temperaturas de hasta 350 °C (Zierenberg et al., 2000).

Los organismos extremófilos poseen sistemas de catálisis enzimática, capaces de alcanzar similares niveles de actividad a los de organismos mesófilos, con la particularidad de que estos se desarrollan en temperaturas extremas. Esto los convierte en una interesante fuente de enzimas capaces de catalizar una gran variedad de procesos bioquímicos que requieren temperaturas demasiado extremas para las enzimas provenientes de la mayor parte de organismos conocidos en el planeta (Gerday et al., 2000).

Dentro de este grupo de fascinantes microorganismos, aquellos adaptadas a las más bajas temperaturas, pueden ser empleados como “fábricas” para la producción de compuestos inestables a temperatura ambiente o fisiológica, como así también en la biorremediación de suelos y de aguas residuales frías. Además, sus enzimas y proteínas adaptadas a las bajas temperaturas han encontrado ya numerosas aplicaciones en campos como la investigación médica, la industria de alimentos, detergentes y cosméticos.

Este grupo de organismos adaptados al frío puede dividirse a su vez en otros dos grupos. Aquellos microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento es superior a los 15 °C, pero que mantienen su capacidad de división a 0 °C (denominados psicrotróficos o psicrotolerantes), y aquellos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra por debajo de los 15 °C y no son capaces de soportar temperaturas superiores a 20 °C (denominados psicrófilos estrictos). Considerando que la biosfera terrestre posee una temperatura promedio de 15 °C y que, aproximadamente, el 80% de esta tiene temperaturas inferiores a 5°C en promedio, se puede asumir que la misma es capaz de albergar a un enorme número de organismos psicrotróficos y psicrófilos estrictos, generando así un gran interés en la profundización de conocimiento respecto a los mismos y en la potencial aplicación biotecnológica de ellos.

No resulta extraño entonces que este asombroso grupo de microorganismos haya despertado el interés y la curiosidad de biólogos y bioquímicos alrededor del mundo, atraídos estos por las sin duda únicas adaptaciones que estos requirieron para lograr una adecuada estabilidad estructural y un óptimo funcionamiento de los componentes celulares en condiciones extremas.

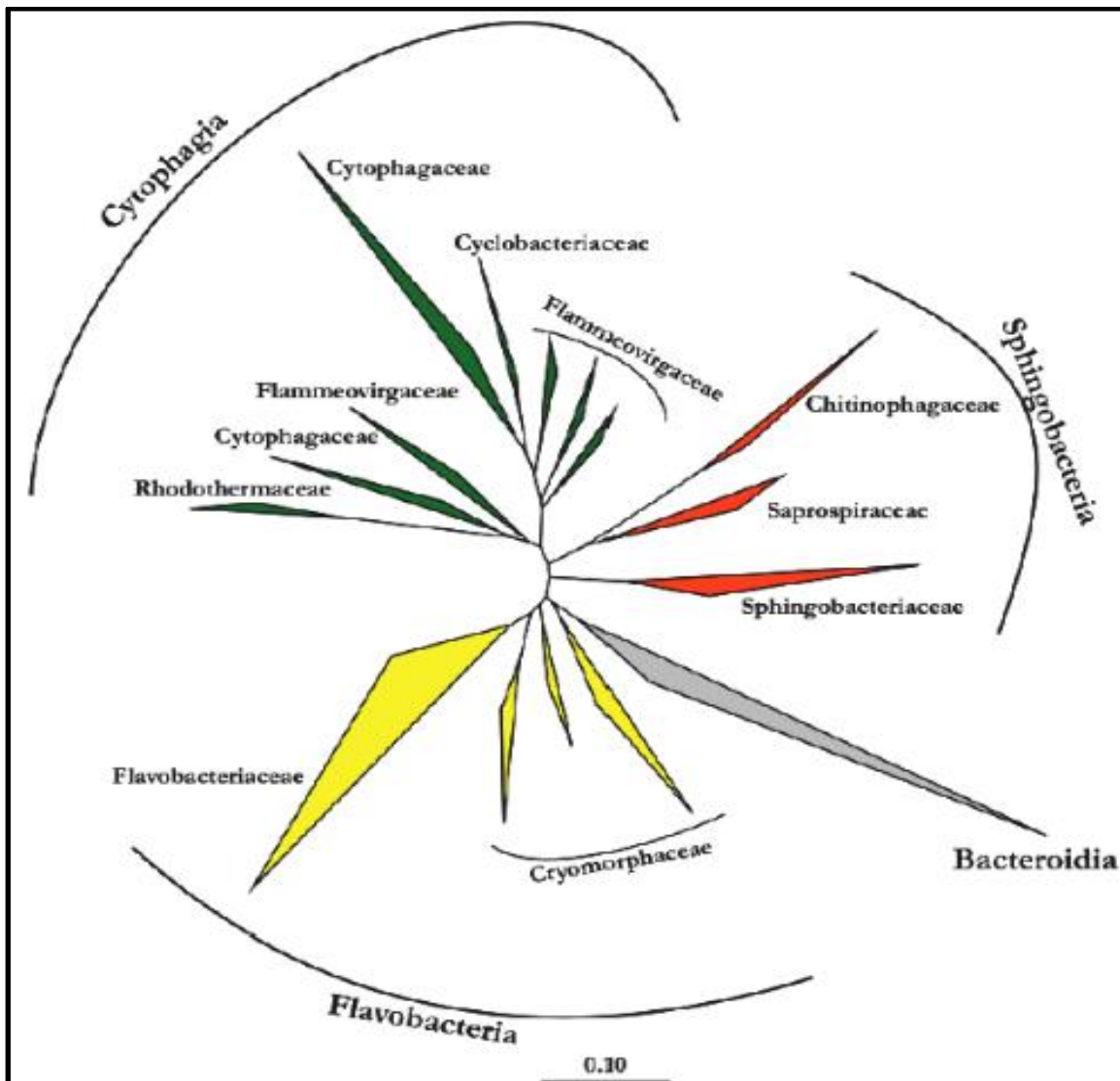
En este marco, en el año 2001, se inició en nuestro país un acuerdo entre Biosidus S.A. y el Instituto Antártico Argentino (IAA), con el objetivo de realizar tareas de investigación en la Antártida bajo el denominado Proyecto “Genoma Blanco”. Una primera parte de este proyecto consistía en la búsqueda y aislamiento de bacterias psicrotolerantes y psicrófilas estrictas en los alrededores de las bases Marambio, Jubany, Orcadas, Esperanza y Belgrano II, así como también en las aguas del Mar de Weddell, desde la superficie hasta unos 300 metros de profundidad. Como resultado de esto, una gran colección de más de 400 aislamientos fue creada y estos se mantienen criopreservados y liofilizados en los laboratorios de Biosidus S.A. y del IAA. Una de las bacterias aisladas, en el marco de este proyecto, fue *Bizionia argentinensis*, perteneciente al clado marino de la familia *Flavobacteria*, miembro del filo *Bacteroidetes*.



### **Filo *Bacteroidetes***

Los miembros del filo *Bacteroidetes* han logrado colonizar una enorme diversidad de nichos ecológicos, ocupando desde ambientes terrestres y acuáticos hasta microfloras intestinales humanas. Este grupo de bacterias heterotróficas es uno de los más abundantes en los ecosistemas marinos, siendo superado en este ámbito únicamente por el filo Proteobacteria (Kirchman, 2002; Fernandez-Gomez et al., 2013; Amaral Zettler et al., 2010). *Bacteroidetes* está compuesto por bacterias Gram-negativas, en su mayoría aerobias, presentes en aguas marinas abiertas, costas, sedimentos marinos y regiones polares, entre otros varios ambientes (Bowman, 2006).

Un análisis filogenético realizado en base a la secuencia del ARN ribosomal 16s, permite dividir este filo en 4 clases: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Sphingobacteria* y *Flavobacteria*. Dentro de esta última, se encuentra la familia *Flavobacteriaceae*, la cual contiene más de 90 géneros descubiertos hasta la fecha, representando la familia más importante del filo (Figura 1).



**Figura 1.** Descripción del árbol filogenético del filo Bacteroidetes basado en la identidad de secuencia del rRNA 16S. El árbol incluye clases y algunas familias. Este fue adaptado de "All-Species Living Tree" (Yarza et al., 2008). La figura fue tomada de la Tesis Doctoral de Christin M. Bennke.

### Clado marino de *Flavobacteriaceae*

La mayoría de las especies de la familia Flavobacteriaceae, informalmente llamada “flavobacterias”, se encuentra conformando un clado marino. En la última década, se ha generado una rápida expansión del mismo, tras el descubrimiento de un gran número de especies, entre ellas *Bizionia argentinensis*. Los miembros de esta familia son bacilos Gram-negativos, no esporulantes, quimioorganotrofos con un metabolismo primario respiratorio. La mayoría de las especies son aerobias obligadas, aunque existen especies aerobias facultativas en la familia. Uno de los rasgos más característicos, sin embargo, es su nivel de pigmentación

amarillo-naranja. Los dos tipos de pigmentos, hallados en la casi totalidad de las flavobacterias, son los carotenoides y las flexirubinas, estas últimas siendo casi exclusivas de estos organismos.



**Figura 2.** Colonias en agar marino de la Flavobacteria *Polaribacter sp.* MED152. Se observa la pigmentación naranja característica. Foto tomada de González et al., 2008.

La mayor parte de las especie de este clado son organismos psicrotolerantes o psicrófilos, y constituyen un componente mayoritario en la biomasa marina de la zona pelágica de los océanos (Kirchman, 2002; Amaral Zettler et al., 2010). Quizás, la característica más distintiva de estos organismos, es su marcada preferencia metabólica por compuestos de alto peso molecular, como proteínas y polisacáridos, rasgo común a todo el filo Bacteroidetes (Cottrell y Kirchman, 2000). Análisis genómicos de diversos organismos del filo han demostrado que estos organismos contienen una gran cantidad de peptidasas; hidrolasas y liasas de polisacáricos; así como también una gran variedad de transportadores de compuestos de alto peso molecular (McBride et al., 2009).

Debido a su rol degradador, estas bacterias se encuentran principalmente unidas a partículas, fitoplancton o macroalgas (DeLong et al., 1993), observándose aumentos drásticos en su población durante y luego de los eventos de floración de las algas (Pinhassi et al., 2004). En ausencia de superficies de unión como estas, son capaces de adoptar un estilo de vida “libre”. Para ello, cuentan con un gran número de proteínas de adhesión y proteínas para el deslizamiento sobre superficies, en un proceso sin el uso de flagelos denominado “gliding motility”. Este tipo de movimiento requiere un gasto energético importante y se detiene cuando el metabolismo energético se paraliza (Shrivastava y Berg, 2015; McBride y Zhu, 2013).

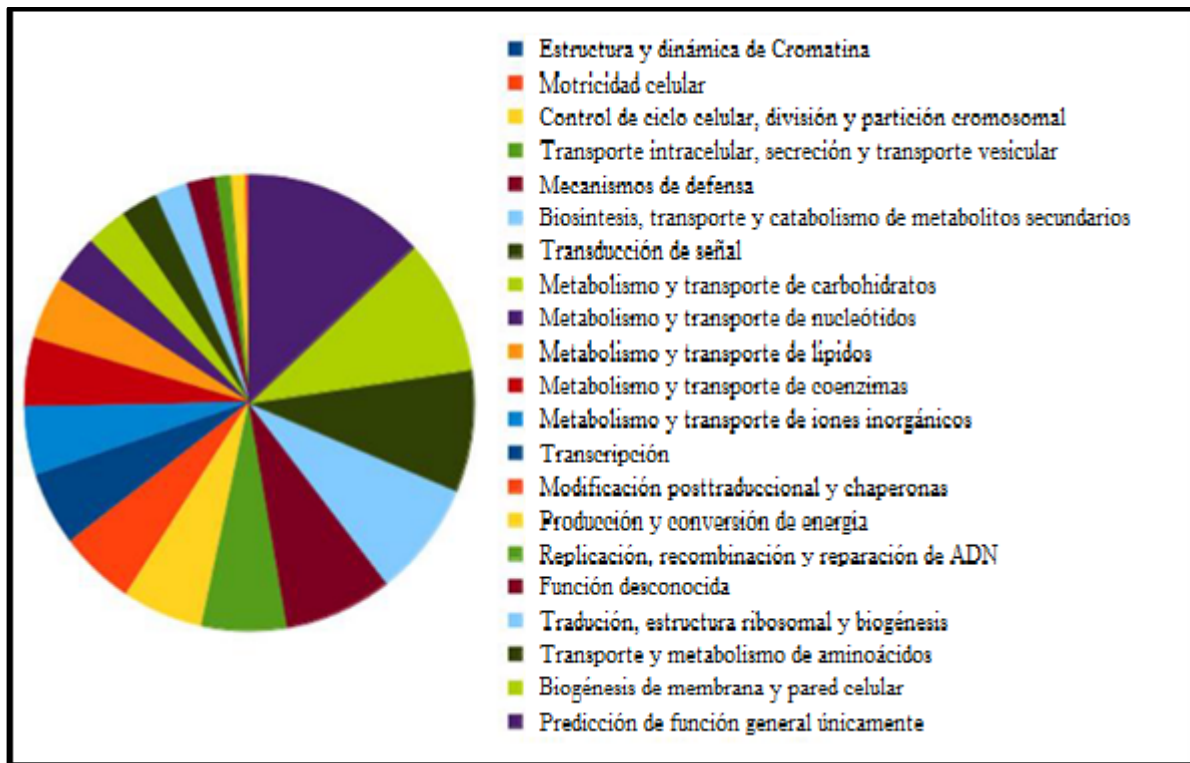
Está ampliamente reconocida la importancia de estos microorganismos en los procesos biogeoquímicos oceánicos, donde son partícipes fundamentales en el ciclo de carbono, degradando material orgánico disuelto y en suspensión, el cual compone una de las mayores reservas de carbono orgánico de la biosfera. (Church, 2008).

### ***Bizionia argentinensis***

La cepa de *Bizionia argentinensis* JUB59<sup>T</sup> fue aislada a partir de muestras de agua superficial en la caleta Potter, cerca de las Estación Científica Jubany en la Antártida Argentina (Bercovich et al., 2008). Hasta este momento, el género *Bizionia* está compuesto por 19 especies aisladas de invertebrados marinos y ambientes marinos fríos, como aguas y costas del Océano Antártico.

Esta especie está compuesta por bacilos Gram-negativos, no móviles, preferentemente aerobios, capaces de crecer sobre agar marino mostrando colonias de un color naranja amarillento de alta pigmentación. No presentan formación de endosporas y pueden crecer entre los 2 y los 28 °C, presentando un crecimiento óptimo entre los 20 y los 25 °C, nunca superior a los 30 °C.

El genoma de esta especie se encuentra parcialmente secuenciado y los genes de la misma agrupados en 107 contigs (Lanzarotti et al., 2011), con una densidad de codificación del 85,09 % y un contenido GC de 33,77 %. Se identificaron allí 3195 marcos de lectura abiertos (ORFs), de los cuales 979 se asignaron a proteínas “hipotéticamente conservadas”.



**Figura 3.** Asignación de genes a clases funcionales según la base de datos COG (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*) (Galperin et al., 2015).

La bacteria contiene todos los genes asociados a la vía de ácidos tricarbóxicos, la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. También contiene todos los genes asociados al proceso de desnitrificación, con la marcada excepción de la nitrato reductasa. En particular, la reducción de NO<sub>2</sub>-a NO parece estar catalizada por una nitrito reductasa dependiente de cobre. Por la vía asimilatoria, el NO<sub>2</sub>-sería reducido por una nitrito reductasa formando amoníaco, siendo éste usado luego como fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos.

El genoma contiene 3 genes codificantes para fotoliasas y sistemas completos de reparación de ADN, lo cual es consistente con los altos niveles de radiación ultravioleta (UV) presentes en las latitudes donde la bacteria fue aislada. Además, presenta genes involucrados en la síntesis de carotenoides y xantofilas, particularmente una copia de una β-caroteno hidroxilasa que cataliza la producción de β-criptoxantina y zeaxantina, pigmentos detectados previamente en otras Flavobacterias de la Antártida pero no en el género Bizionia. Presenta además un gran número de genes codificantes para proteínas que actúan en la biosíntesis de ácidos grasos no saturados, lo cual coincide con las bajas temperaturas de su ambiente.

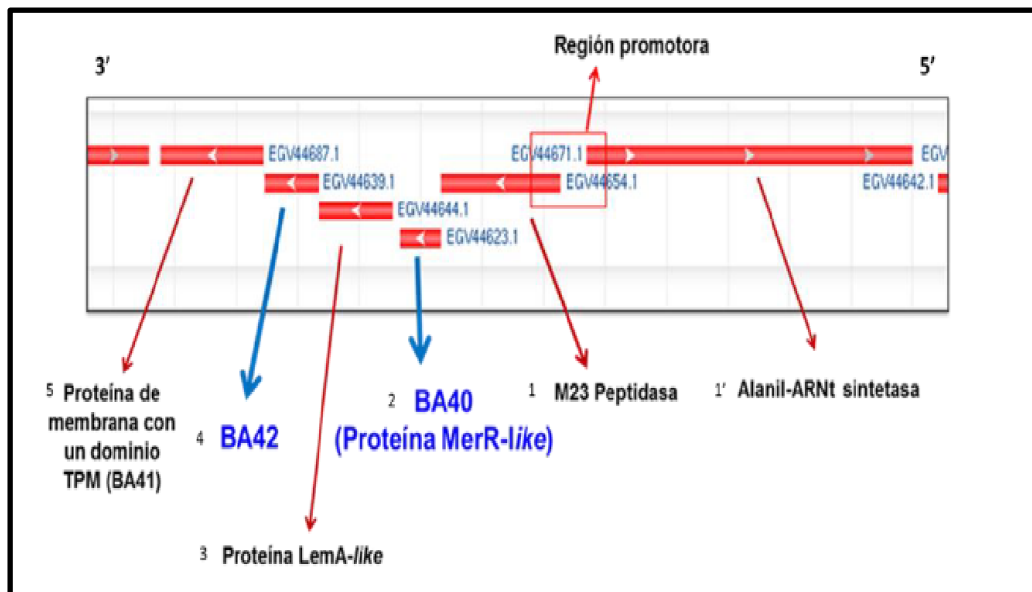
Una característica interesante de *B. argentinensis* es la capacidad que posee de exportar peptidasas al medio para degradar compuestos circundantes. Se encontraron en ella 24 genes pertenecientes a diversas familias de peptidasas, todos ellos conteniendo péptido señales de exportación.

### **Estudio de la estructura y función de proteínas de *Bizionia argentinensis***

La caracterización funcional de las biomoléculas de *B. argentinensis* puede ser de gran impacto y utilidad para la comprensión general de los mecanismos que permiten a los microorganismos extremófilos adaptarse a estas condiciones de vida tan particulares. En tal sentido, el estudio de dichas proteínas por RMN resulta muy conveniente, ya que esta técnica permite la posibilidad de estudiar la estructura y dinámica en solución; condiciones indispensables para comprender los mecanismos subyacentes de adaptación al frío que involucran regiones flexibles del sitio activo y cambios en la estabilidad y la dinámica, general y localizada, cuando estas son comparadas con sus homólogas mesófilas.

En el laboratorio de RMN de la Fundación Instituto Leloir se está llevando a cabo un proyecto de genómica estructural, en el marco del cual se estudian diversas proteínas de la bacteria antes mencionada. La selección de dichas proteínas fue realizada mediante la implementación de un método de alto rendimiento para la selección de proteínas de función desconocida, que resultaban adecuadas para estudios estructurales, con el propósito de descubrir nuevas enzimas. Se seleccionaron entonces proteínas pequeñas, de función desconocida, sin homólogos estructurales pero que su secuencia se encuentre en otros organismos y que tengan una predicción de expresión soluble.

Una de las proteínas candidatas que atravesó todas las etapas del proyecto fue la proteína BA42, caracterizada como fosfatasa metal dependiente, la cual fue catalogada dentro de la familia de dominios TPM en la base de datos PFAM (Pelliza et al., 2016). Como parte del estudio de su función dentro la bacteria, se observó su localización dentro del genoma. De esta manera, se encontró que BA42 parece estar conformando un operón de función desconocida (figura 4).



**Figura 4.** Esquema de predicción bioinformática de operón de función desconocida. En la figura se señalan, en su orden de transcripción 5'-3', los 5 genes que integrarían el operón: 1. Peptidasa perteneciente a la familia M23; 2. BA40, probable factor de transcripción perteneciente a la familia MerR; 3. Proteína perteneciente a la familia Pfam LemA; 4. Fosfatasa BA42; 5. Proteína de membrana que contiene un dominio TPM (BA41). En el sentido de transcripción 3'-5': gen de la proteína alanil ARNt sintetasa.

Las proteínas que conforman este supuesto operón fueron estudiadas por su homología en secuencias para clasificarlas según su función y familia de pertenencia. Se observó que existía otra proteína con un dominio TPM, denominada BA41, una proteína que era clasificada según su homología de secuencia como un factor de transcripción de la familia MerR, la cual fue denominada BA40. Además, se observó que el operón estaba al lado del gen que codifica para Alanil-ARNt sintetasa. Esta última proteína posee un dominio denominado C-Ala que tiene una homología estructural con la proteína BA42 pero que no posee las características necesarias como para clasificar como un dominio TPM. Por otro lado, su función es discutida en la actualidad. A partir de esto, se sumaron a los proyectos de trabajo del laboratorio de RMN del estudio de mecanismos de adaptación al frío, al dominio TPM de la Proteína BA41 (Cerutti et al., 2016), al dominio C-Ala de la Alanil ARNt sintetasa (Smal et al., 2014) y al factor de transcripción MerR de función aún desconocida, BA40 (Pellizza, 2017).

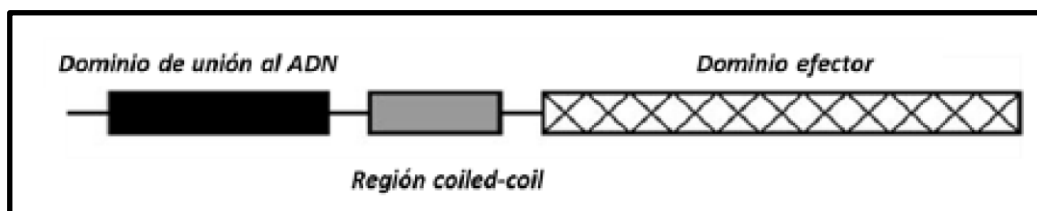
Se logró determinar, hasta el momento, la estructura tridimensional de dos proteínas en el laboratorio de RMN, dentro de los candidatos seleccionados por el método de alto rendimiento empleado, denominadas BA42 y C24. La estructura de la primera fue

determinada mediante procedimientos estándares de RMN y cristalografía de rayos X (Aran et al., 2014), y de la segunda por cristalografía de rayos X en colaboración con la Dra. Jimena Rinaldi y el Dr. Sebastián Klinke de la Plataforma de Biología Estructural y Metabólica (Plabem).

### Superfamilia de factores de transcripción MerR

Unos de los candidatos ideales para el estudio de mecanismos de adaptación al frío son las proteínas de la familia MerR. La familia MerR está formada por reguladores de transcripción, los cuales contienen regiones de unión al ADN con el motivo “hélice-vuelta-hélice” (HTH). Este motivo, en sí mismo un dominio, es extremadamente común en los factores de transcripción, tanto en organismos procariontas como eucariotas (Aravind et al., 2005).

En los factores de transcripción MerR, el dominio HTH se encuentra ubicado en el extremo N-terminal, siendo esta parte fundamental del dominio de unión al ADN. Río-abajo de este dominio se ubica una región “coiled-coil”, cuyo propósito, se cree, es el de llevar a cabo la dimerización de estas proteínas. Estas dos regiones son las que caracterizan a esta familia y suelen estar formadas por alrededor de 100 aminoácidos. En el extremo C-terminal, suelen contener sitios de unión específicos para agentes efectores que modulan la actividad de esta unión al ADN (Figura 5). A diferencia del dominio HTH en el extremo N-terminal, estos dominios efectores no son conservados y son específicos de diferentes moléculas efectoras, como pueden ser iones metálicos, sustratos orgánicos o diferentes proteínas (Brown et al., 2003).

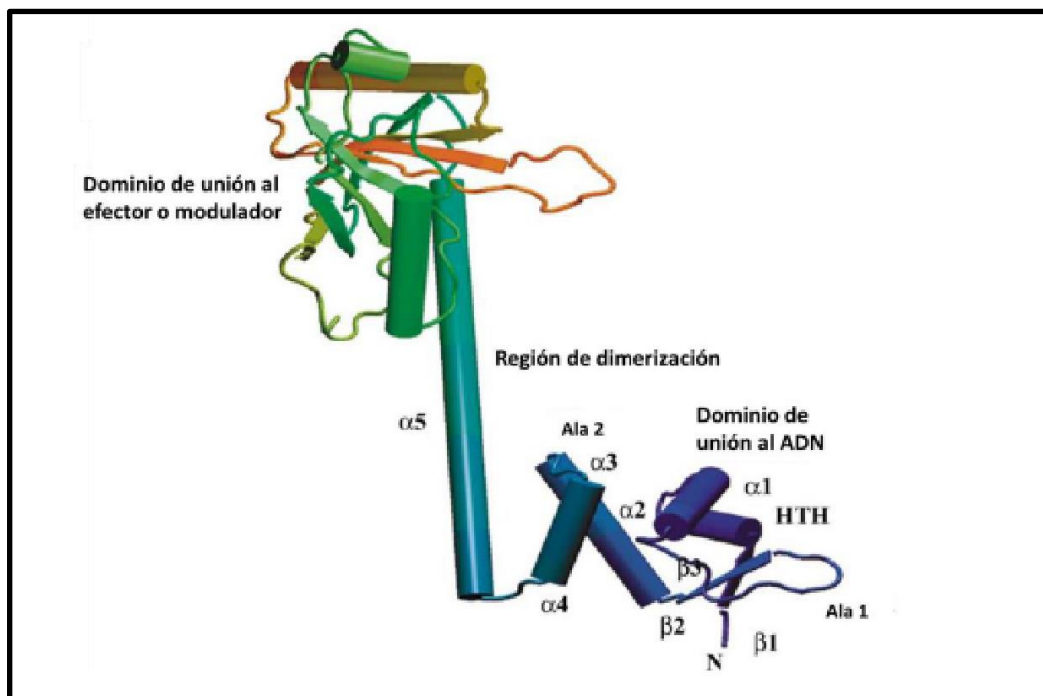


**Figura 5.** Estructura canónica de factores de transcripción de la familia MerR. El tamaño de cada rectángulo es aproximadamente proporcional al tamaño de cada dominio en las proteínas de la familia.

Los factores de transcripción MerR se encuentran presentes en todos los géneros de eubacterias y solo en algunas arqueas. En la última década, esta familia ha recibido mayor atención, gracias a lo cual se ha observado que la mayoría de estos factores de transcripción



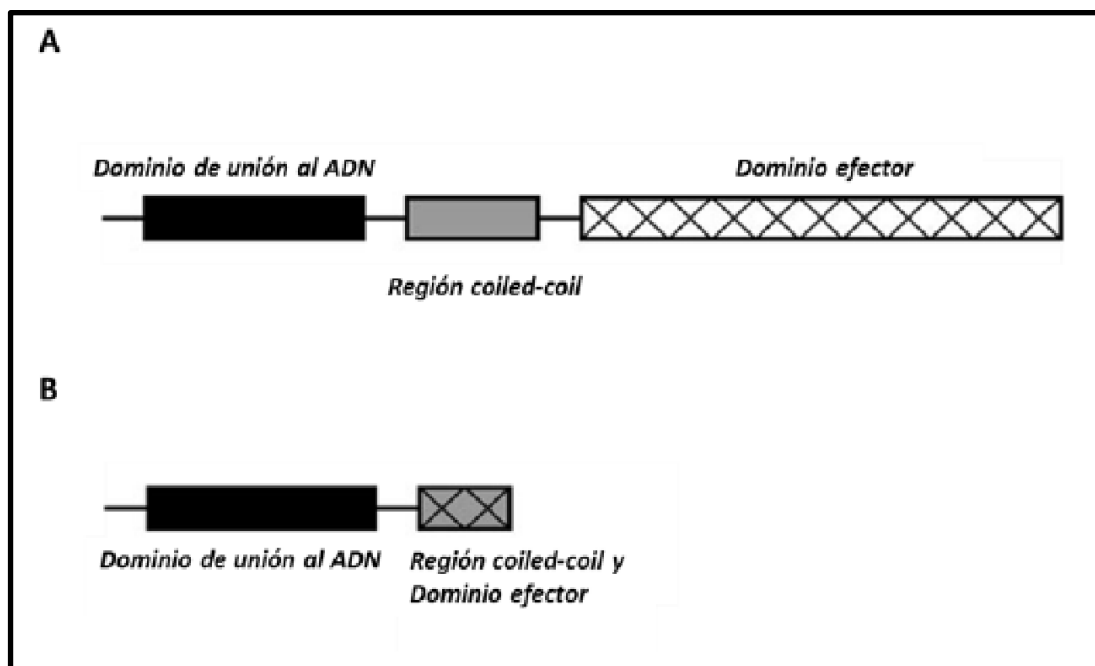
están encargados de mediar respuestas a diversas situaciones de estrés, como la exposición a especies reactivas de oxígeno, diversos estímulos ambientales, metales pesados y antibióticos, entre otras. El mecanismo propuesto de activación o inhibición de la transcripción se produce mediante la distorsión física del ADN, y la mayoría de estos factores suelen actuar en forma dimérica. Se han dilucidado ya varias estructuras de los dominios HTH pertenecientes a proteínas de la familia MerR. Estos presentan un tipo de motivo HTH que es denominado HTH-alado (wHTH), el cual consiste de cuatro  $\alpha$ -hélices (H1-4) y una hoja- $\beta$  anti paralela, conformada en si misma por 3 hebras- $\beta$  (B1-3), resultando así en la topología “B1-H1-H2-B2-B3-H3-H4” (Godsey et al, 2002; Newberry y Brennan, 2004). La unión al ADN se da en el surco mayor. El motivo HTH está comprendido por las hélices 1 y 2 (H1-H2), H2 siendo denominada como la “hélice de reconocimiento”, ya que es a través de esta última que ocurren el mayor número de contactos con la estructura del ADN. Otro elemento que participa en la unión al ADN es el denominado “ala W1” (Wing 1), el cual está formado por la las hebras 2 y 3 (B2- B3) y el “loop” que une a ambas. Un tercer elemento estructural de unión al ADN es el “ala W2”, formado por las hélices 3 y 4 (H3-H4) (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura de la forma monomérica del factor de transcripción BmrR, factor de transcripción miembro de la familia MerR (Heldwein y Brennan, 2001).

Típicamente, estos elementos de unión al ADN interactúan con la región promotora del operón en las regiones -35 y -10, separadas por una región espaciadora de 19 o 20 pb (más extensa en estos promotores que en la mayoría). Esta unión genera una distorsión física en el ADN, permitiendo a la ARN polimerasa iniciar la transcripción o inhibiendo la misma (Brown et al., 2003).

El análisis de secuencia de BA40 destacó que esta proteína posee una arquitectura que difiere de la canónica para la familia MerR. Está conformada por un total de 109 aminoácidos, lo cual la hace más pequeña que la norma para esta familia, las cuales promedian un tamaño de 240 aminoácidos. Por esto, la proteína solo contiene dos de los dominios característicos de MerR; el dominio de unión al ADN (HTH) y la región coiled-coil. Las únicas dos proteínas estudiadas hasta la fecha que presentan una arquitectura similar a la de BA40 en este sentido, aunque con muy baja identidad, son TnrA y GlnR, ambas de *Bacillus subtilis* (con identidades de secuencia de 20,56 % y 23,36 %, respectivamente) (Figura 7). La primera regula la síntesis de proteínas clave en la asimilación de nitrógeno durante el crecimiento en condiciones limitantes del mismo, mientras que la segunda reprime la expresión génica cuando hay un exceso de nitrógeno en el medio (Fisher, 1999; Fisher y Wray, 2008).



**Figura 7.** Arquitecturas de miembros de la familia MerR. La imagen “A” muestra la arquitectura canónica de la familia, derivada a partir de la estructura cristalina de BmrR (Heldwein y Brennan, 2001). Para la imagen “B” se

utilizó como modelo la proteína TnrA. Se observa aquí la falta de un dominio efector independiente y la superposición del mismo con la región de dimerización en la imagen “B” (Wray y Fisher, 2007).

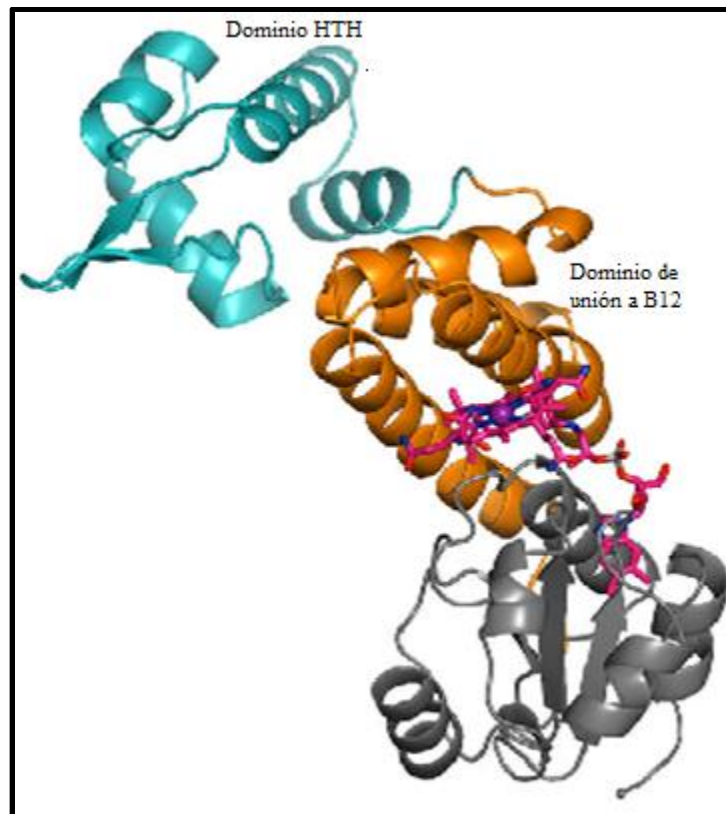
Diversos estudios han propuesto que, en el caso de ambas proteínas, el dominio efector formaría parte de la misma región de dimerización, incluso se ha demostrado que, en ambos factores, la modulación de la actividad de unión al ADN ocurre por interacción del extremo C-terminal de las proteínas con la Glutamina sintetasa (GS) (Hauf et al., 2016).

En el caso de BA40, no se conoce el sitio de unión con la región promotora del operón, ni su función biológica. Por ello se trata de una de las proteínas seleccionadas para el proyecto de genómica estructural de proteínas de función desconocida del laboratorio de RMN.

A partir del estudio de esta proteína en el laboratorio, surgió como pregunta si existía, dentro del genoma de *B. argentinensis*, alguna otra proteína de la misma familia de factores de transcripción. Para contestarla, se analizó el genoma de la bacteria por métodos bioinformáticos, y fue encontrada mediante este análisis una única proteína, a la cual denominaremos MerR-G.

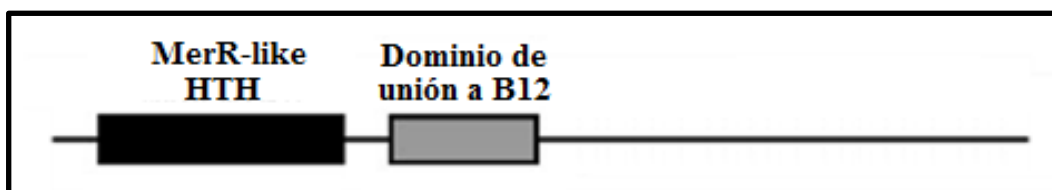
Un análisis de la secuencia de MerR-G, de 298 aminoácidos, encontró en ella la presencia de 2 dominios: el dominio HTH característico de MerR en su extremo N-terminal, seguido por un dominio de unión a cobalamina (B12) río abajo. Esta no es la única proteína de la familia MerR que posee una arquitectura similar, ya que existen los reguladores transcripcionales, de arquitecturas similares, CarA y CarH en *Myxococcus xanthus* (con identidades de secuencia de 19,63 % y 25,26 % respectivamente) (Ortiz-Guerrero et al., 2011; Pérez-Marín et al., 2008). Ambas proteínas poseen un dominio de unión a B12, como el que presenta MerR-G, pero únicamente para CarH está demostrado que la unión de adenosilcobalamina (AdoCbl) a este dominio permite a esta la interacción de la proteína con el ADN, y así, la represión de la transcripción. AdoCbl es un cromóforo que media la formación de un tetrámero de CarH en la oscuridad. La estructura y la base estructural de su interacción con AdoCbl han sido ya dilucidadas (Jost et al., 2015) (Figuras 8 y 9). Una tercer proteína, denominada CarS, interactúa tanto con CarA como con CarH en la oscuridad, favoreciendo la unión de estas al ADN y reprimiendo la transcripción. Es importante destacar que ambas proteínas se unen al ADN en el mismo sitio, y, por lo tanto, conforman dos vías

diferentes para la regulación de la transcripción de los mismos genes (Pérez-Marín et al., 2008).



**Figura 8.** Estructura de CarH en su forma monomérica unida a AdoCbl. Pueden observarse los 2 dominios de la proteína también presentes en MerR-G: Dominio de unión al ADN (cian), Dominio de unión a B12 (naranja) (Jost et al., 2015).

Un factor de transcripción de este tipo ha sido observado en mesófilas como *M. xanthus* y termófilas como *T. thermophilus*, por lo que el estudio de MerR-G, perteneciente a una bacteria psicrotolerante como lo es *B. argentinensis*, resulta de sumo interés para incrementar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares de adaptación al frío.



**Figura 9.** Arquitectura de MerR-G, basada en su homología con CarH.

### **Purificación de proteínas recombinantes**

A la hora de elegir un método de purificación es importante considerar la finalidad que va a tener la proteína, ya que el nivel de pureza requerido no será el mismo dependiendo del uso o aplicación que tendrá la misma. En el caso de la determinación estructural de la proteína en estudio, se requerirá un alto grado de pureza y por lo tanto es necesario pensar en una buena estrategia que permita aislarla de todo el contenido proteico restante del sistema celular en el que será expresada.

El desarrollo de técnicas de ADN recombinante marcó una nueva era para la producción de proteínas, tanto para investigación como para aplicaciones industriales. La expresión de proteínas recombinantes en microorganismos parecía garantizar un suministro ilimitado de raras proteínas de alto valor al que no se podía acceder usando las técnicas de aislamiento de proteínas convencionales (Itakura et al., 1977; Wetzel et al., 1981). Estas técnicas, además, permitieron la formación de proteínas fusión o quiméricas, formadas por edición génica, las cuales son empleadas a menudo, tanto en investigación como en la industria, mediante el agregado de un fragmento pequeño con alguna interacción específica a una proteína de interés, el cual permite la más sencilla purificación de la misma mediante la utilización de columnas de afinidad.

### **Clonado y Expresión**

Para estudiar las propiedades biofísicas y bioquímicas de una proteína es necesario producir suficiente cantidad de ella y aislarla. Para esto las técnicas de biología molecular, como el sistema Gateway® son de gran ayuda.

Números vectores y sistemas que permiten expresar proteínas fusión, para facilitar su identificación y purificación, han sido desarrollados en los últimos 50 años. Algunas de las estrategias de purificación más importantes desarrolladas a partir de estos sistemas son aquellas que permite luego separar a la proteína recombinante del resto mediante una cromatografía de afinidad, siendo una de las más utilizadas el agregado de un “tag” de histidinas o “His6-tag” (Bornhorst y Falke, 2000). Este sistema se basa en introducir 6 residuos de histidina consecutivos en alguno de los extremos de la proteína, N-terminal o C-terminal. De esta manera, los vectores están diseñados para la que la secuencia genética que codifica para el His6-tag quede unida a la secuencia de la proteína de interés en el marco de lectura adecuado. El principio de la utilización de His6-tag en los procesos de purificación se

basa en la interacción de las histidinas del tag con partículas de níquel inmovilizadas en la columna, método conocido como “Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado” (IMAC). Estos métodos suelen emplear una matriz inerte, como sefarosa o agarosa, conteniendo algún grupo químico que permita unir cationes bivalentes, tal como el níquel. El níquel inmovilizado retiene específicamente a las proteínas histidinas, y con mayor fuerza a las que contienen el His6-tag, ya que el grupo imidazol de este aminoácido interactúa con el metal con alta afinidad. Luego de la elución de proteínas inespecíficas, la proteína de interés puede ser eluida de la columna fácilmente con el empleo de un gradiente de imidazol libre que compite con ella por la unión al níquel (Bornhorst y Falke, 2000).

Dependiendo el uso que luego se le dé a la proteína, puede ser necesario eliminar el His6-tag y repurificar. Debido a esto suele añadirse en el vector una secuencia aminoacídica entre el tag y la proteína que sea un sitio de corte específico. Esta eliminación del tag puede ser llevada a cabo por métodos químicos o enzimáticos (Carter, 1990; Hearn y Acosta, 2001).

La utilización de enzimas proteolíticas suele ser el método más utilizado, a pesar de alto costo, ya que presenta una más alta especificidad de corte. Hay un amplio repertorio de enzimas disponible en el mercado, cada una de ellas con diferentes secuencias de corte y estas de longitudes variables. Un ejemplo es la denominada Proteasa TEV (Tobacco Etch Virus), una endoproteasa del virus de grabado de tabaco (Carrington y Dougherty, 1987), capaz de cortar específicamente en la secuencia “ENLYFQ/S” (“/” marcando el sitio donde el corte se realiza) (Carrington y Dougherty, 1988). Se trata de una proteína de aproximadamente 27 kDa cuya actividad proteolítica reside en un dominio en el extremo C-terminal de la misma (Dougherty y Parks, 1991). Su especificidad de corte la convierte en una excelente herramienta para la remoción de tags de afinidad de proteínas recombinantes mediante endoproteólisis (Parks et al., 1994).

Luego de realizarse el clivaje es necesaria una segunda purificación para aislar a la proteína de interés del tag y de la enzima. Para esto ha sido diseñada una variante recombinante de la proteasa TEV que contiene a su vez un His6-tag. De esta forma, en una segunda pasada por la columna IMAC con níquel inmovilizado, se unirán los grupos imidazol del tag libre y el tag unido a la enzima al níquel de la columna, dejando eluir a la proteína purificada.

### **Sistema Gateway<sup>®</sup>**

Como bien conocemos, la información que codifica la futura conformación de una proteína se encuentra en una secuencia genética iniciada por un codón ATG y culminada por uno de los varios posibles codones “stop”. A esto se lo denomina “Open Reading Frame” (ORF). Cuando un equipo de trabajo se propone obtener una gran cantidad de copias de una determinada proteína, resulta muy útil el clonado de este ORF, a fin de expresarlo este producto proteico a voluntad.

Usualmente, esta información genética será introducida en un vector de expresión, generalmente de origen plasmídico, resultando en la creación de las comúnmente denominadas “Construcciones Genéticas” (Cohen et al., 1973). En sus inicios, estas construcciones eran llevadas a cabo mediante la utilización de endonucleasas de restricción y ligasas.

Las endonucleasas de restricción (Wilson y Murray, 1991), en particular las llamadas de “tipo II”, fueron y son hoy en día excepcionales herramientas de biología molecular y construcción de quimeras. Esto se debe a que, además de reconocer una secuencia de ADN específica (frecuentemente palindrómica en el caso de las endonucleasas de tipo II), realizan el corte dentro del sitio de reconocimiento, a diferencia de las endonucleasas de tipo I y III, que realizan el corte en otro sitio. Dependiendo de la enzima de restricción utilizada, los dos fragmentos resultantes pueden contener extremos romos o protruyentes, de una secuencia específica.

La interacción de extremos protruyentes por afinidad de pares de bases produce moléculas de ADN que presentan “gaps”, es decir, interrupciones en la secuencia en una de las hebras. El enlace nucleotídico de estos “gaps” puede ser re-ligado con la utilización de la enzima ADN-ligasa.

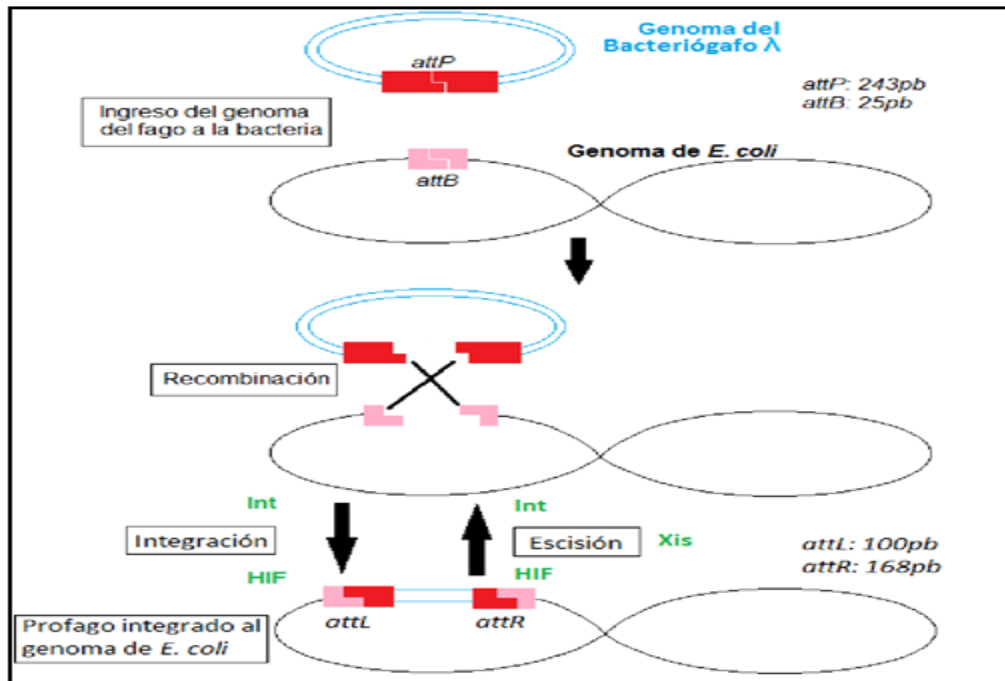
La combinación de estos dos factores permite la formación de numerosas construcciones genéticas mediante la combinación adecuada de enzimas y vectores, y esto abrió el camino al clonado de secuencias heterólogas dentro de un organismo huésped, marcando así el nacimiento de la ingeniería genética moderna.

Hoy en día, sin embargo, se han desarrollado numerosos sistemas de clonado basados en tecnología recombinante, que han logrado aumentar la especificidad y la eficiencia de estos procesos, eliminando la necesidad de utilizar a la enzimas de restricción.

Uno de estos sistemas es la tecnología Gateway® desarrollada por Invitrogen (Hartley et al., 2000). Se trata de un método de clonado basado en las propiedades de recombinación sitio específica del bacteriófago Lambda (Landy, 1989), específicamente en el proceso de integración del ADN del virus en el genoma de *Escherichia coli*, y en las enzimas vitales para el cambio entre los ciclos lítico y lisogénico del mismo (Ptashne, 1992). Estos componentes del proceso de recombinación del fago Lambda fueron modificados, con el propósito de mejorar la especificidad y eficiencia del sistema (Bushman et al., 1985).

La recombinación del fago lambda en el genoma de *E. coli*, e inicio del ciclo lisogénico, ocurre gracias a la catálisis llevada a cabo por dos enzimas: La integrasa (Int) del fago lambda y el “Integration Host Factor” (IHF) del *E. coli*. La recombinación homóloga se da entre secuencias específica de ADN denominadas “sitios att” (attachment sites): attB, de 25 nt, en el genoma de *E. coli* y attP, de 243 nt, en el genoma del fago (Weisberg y Landy, 1983). La recombinación ocurre, puntualmente, entre dos regiones homólogas de 15 pb dentro de las secuencias att, pero las secuencias de alrededor son necesarias porque permiten la unión de las recombinasas al ADN (Landy, 1989). Luego de la recombinación, e integración del genoma del fago al de la bacteria, se generan dos nuevos sitios att: attL, de 100 nt, y attR, de 168 nt; los cuales flanquean el genoma del fago. Este proceso es reversible, dando inicio al ciclo lítico, por la acción de las enzimas Int e IHF en conjunto con la enzima del fago denominada “escisionasa” (Xis). En el evento de escisión, los sitios attL y attR llevan a cabo una recombinación sitio específica, regenerando así los sitios attP, en el genoma del fago ahora libre, y attB, en el genoma de *E. coli* (Figura 10).



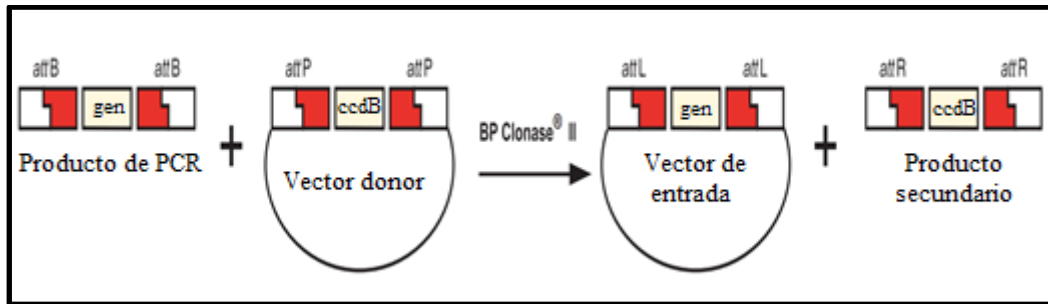


**Figura 10.** Recombinación del fago lambda en el genoma de *E. coli*.

La tecnología Gateway® aprovecha las enzimas y secuencias influyentes en ambos procesos (inserción y escisión) para facilitar el clonado de secuencias heterólogas, flanqueadas por los sitios att correspondientes, en vectores diseñados para el sistema (Hartley et al., 2000). Esta tecnología se basa en dos reacciones de recombinación, llevadas a cabo por dos mezclas de “clonaras”: la reacción BP y la reacción LR (Tabla I). La primera facilita la recombinación de una secuencia de interés flanqueada por sitios attB (usualmente un producto de PCR), con un vector “Donor”. La obtención de la secuencia de interés flanqueada por sitios attB por PCR requiere la fabricación de “primers” específicos, que amplifiquen la secuencia de interés y agreguen los sitios attB en los extremos. Este vector “Donor” contiene las secuencias attP flanqueando un gen que será utilizado para la correcta selección de clones, como puede ser la toxina ccdB (Bernard et al., 1994). Luego de la reacción BP se obtiene un vector recombinante, denominado “vector de entrada”, el cual contiene a la secuencia de interés flanqueada por sitios attL (Figura 11).

<b>Lisogénico</b>	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	BP Clonase <sup>®</sup> II (Int, IHF)
<b>Lítico</b>	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	LR Clonase <sup>®</sup> II (Int, Xis, IHF)

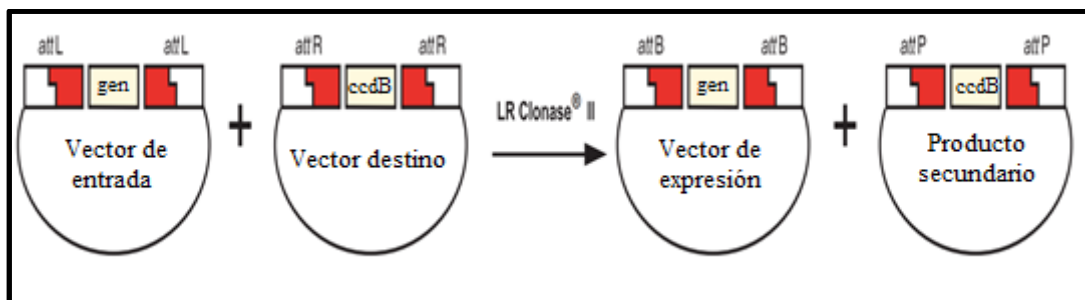
**Tabla I.** Para cada ciclo del fago Lambda se encuentran resumidas las recombinaciones de los sitios att y las enzimas involucradas en ellas. BP y LR Clonase son los nombres comerciales de los mix de enzimas utilizados en ambos pasos de recombinación en el sistema Gateway.



**Figura 11.** Reacción de recombinación BP del sistema Gateway<sup>®</sup>. Imagen extraída del folleto comercial del sistema Gateway<sup>®</sup> Technology with Clonase<sup>®</sup> II

La transformación de cepas bacterianas sensibles a ccdB (como la cepa de *E. coli* BL-21), y el cultivo de estas en un medio con presencia del antibiótico cuya resistencia esté presente en el vector “Donor” específico, permite seleccionar clones que contengan únicamente el “vector de entrada” en ellas. Aquellas que no contengan un vector morirán por la presencia de antibiótico y las que tengan al vector “Donor” sin recombinar morirán por presencia de la toxina codificada en ccdB.

La reacción LR permite la recombinación del “vector de entrada” y un último plásmido, denominado “vector de destino”, que posee los sitios attR flanqueando la secuencia de la toxina ccdB. El mix de enzimas LR cataliza la recombinación de los sitios attL y attR, produciendo un “vector de expresión”, con la secuencia de interés flanqueada por los sitios attB (Figura 12). La selección de este vector es igual a la del paso anterior pero con el antibiótico cuya resistencia esté presente en el “vector de destino”.



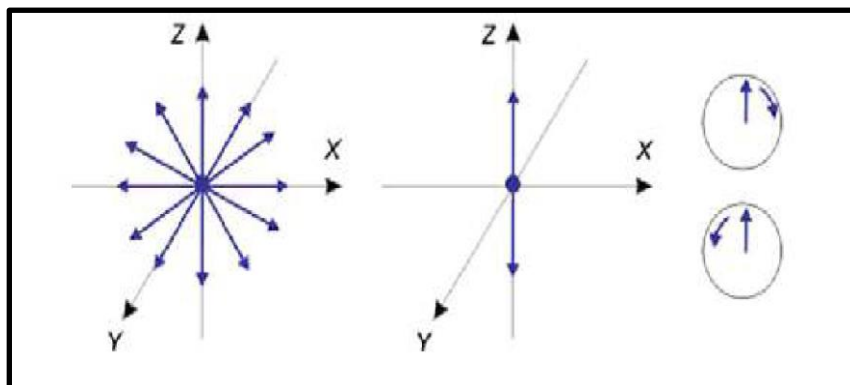
**Figura 12.** Reacción de recombinación LR del sistema Gateway<sup>®</sup>. Imagen extraída del folleto comercial del sistema Gateway<sup>®</sup> Technology with Clonase<sup>®</sup> II

### Dicroísmo Circular

Algunas moléculas poseen asimetría molecular, es decir, que sus imágenes especulares no son idénticas. Estas llevan el nombre de moléculas quirales (Hammes G., 2005). Un ejemplo claro es el de un átomo de carbono enlazado a cuatro átomos, o grupos de átomos, diferentes. De esta manera, a los estereoisómeros que son además imágenes especulares, se los denomina enantiómeros.

La quiralidad es una característica fundamental para la biología molecular, y la estereoselectividad, es decir la formación preferente de un estereoisómero por sobre todos los posibles, tiene un rol fundamental en procesos biomoleculares de suma importancia, como las interacciones ligando-receptor o la catálisis enzimática (Ranjbar B. y Gill P., 2009).

La interacción de una molécula quiral con la luz polarizada (Figura 13) es específica para el enantiómero del que se trate y ha demostrado ser un método vital para la caracterización estructural, tanto de moléculas pequeñas como de macromoléculas (Fasman G., 1996).



**Figura 13.** Esquema de los componentes del campo eléctrico no polarizado (a), luz polarizada linealmente o plana (b), la luz se mueve a lo largo del eje Y. Para la luz no polarizada, se mueve en todas direcciones, mientras que para la luz polarizada linealmente o plana sólo se encuentra en la dirección Z. Para la luz polarizada circularmente (c), la dirección de rotación puede dirigirse en sentido de las agujas del reloj o en dirección contraria.

Uno de los métodos más utilizados para determinar el efecto de la luz polarizada sobre proteínas es el de Dicroísmo circular (DC) (Hammes G., 2005), que puede definirse como la propiedad que poseen algunos materiales de absorber la luz a diferentes grados dependiendo de la forma de la polarización del haz de luz incidente. Se dice, de esta manera, que un material presenta dicroísmo circular cuando la absorción de la luz circularmente polarizada en una dirección es diferente de la absorción de la luz circularmente polarizada en la dirección opuesta (Hammes G., 2005; Berova et al., 2000).

Cuando la luz se polariza circularmente aparece un componente secundario de la absorbancia, el cual se mide como el cambio entre la luz polarizada circularmente (RCP) a la derecha e izquierda, y la diferencia resultante se expresa como absorbancia (Berova et al., 2000).

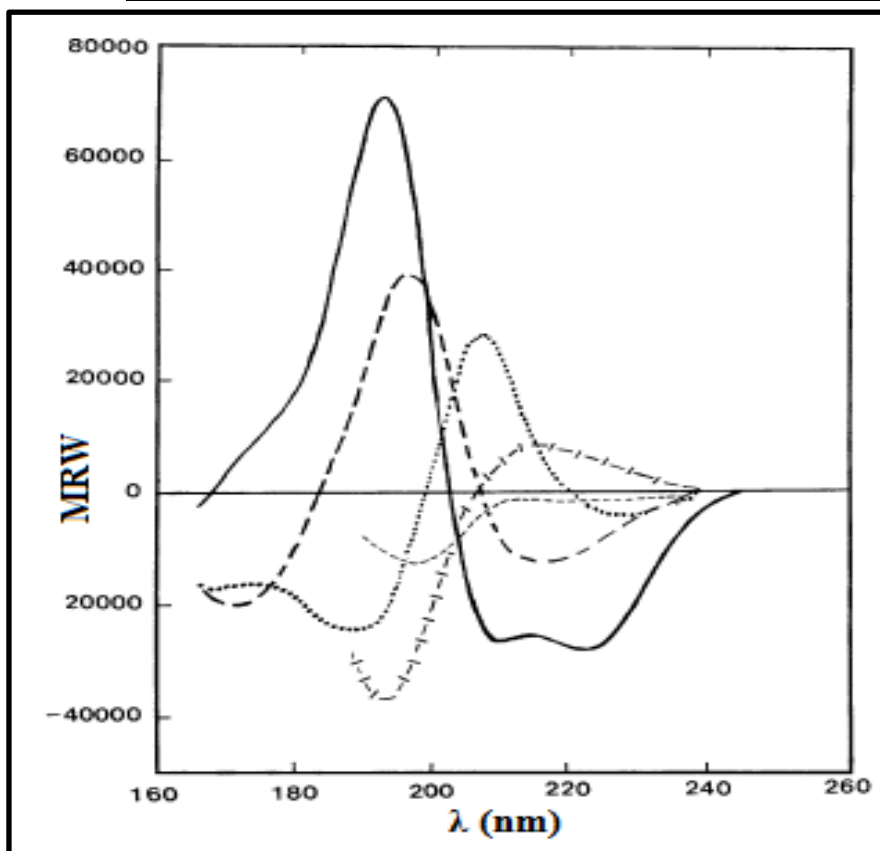
La luz polarizada circularmente es, en efecto, quiral, es decir que puede encontrarse en dos formas no superponibles que son imágenes especulares la una de la otra. Para discriminar entre ellas, una molécula debe ser quiral, lo cual incluya a la extensa mayoría de las biomoléculas.

Los efectos producidos por la incidencia de la luz polarizada sobre moléculas quirales son relativamente pequeños, pero pueden ser medidos fácilmente con instrumentos modernos, y estas medidas de dicroísmo circular nos proporcionan información detallada, estructural y enantiomérica, de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.

En el caso particular de las proteínas, el DC es una técnica de gran valor, ya que nos permite llevar a cabo estudios estructurales en las condiciones donde las biomoléculas normalmente funcionan: en solución.

Las diferentes estructuras secundarias de las proteínas generan espectros de DC de forma característica. Estos permiten identificar, mediante comparación con los picos estándares característicos para cada tipo de estructura secundaria (Figura 14) o mediante el uso de programas como DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>), el perfil de estructura secundaria aproximado de proteínas pequeñas. Fundamentalmente, en el contexto de este trabajo, es importante destacar los mínimos característicos de las hojas- $\beta$  y las  $\alpha$ -hélices, teniendo las primeras un mínimo alrededor de los 215 nm, y estas últimas dos mínimos, uno a 208 nm y otro a 222 nm. Estos números son estimativos basados en estándares y no deben ser tomados como patrones exactos (Kelly et al., 2005).

Los experimentos de DC son de baja resolución, por lo tanto, para relacionar los fenómenos espectrales con alteraciones en la estructura de la proteína, se aplican métodos computacionales. La implementación combinada de experimentos de DC y la teoría conocida es, muy a menudo, la única posibilidad para determinar la configuración absoluta de moléculas pequeñas (Berova et al., 2007 y Woody R., 1996).



**Figura 14.** Espectros de Dicroísmo Circular en el UV lejano asociado a varios tipos de estructuras secundarias.

Línea sólida,  $\alpha$ -hélice; línea intermitente larga, hojas- $\beta$  antiparalelas; línea punteada, vuelta- $\beta$  tipo 1; línea intermitente cruzada, hélice- $3_1$  extendida o hélice-poly (Pro) II; línea intermitente corta, estructura desordenada.

Imagen extraída de Kelly et al., 2005.

### Anisotropía de fluorescencia

Los fluoróforos son compuestos químicos capaces de re-emitir luz al ser excitados por radiación electromagnética de otra longitud de onda. Cuando una de estas moléculas absorbe un fotón de longitud de onda adecuada esta pasará a un estado de mayor energía. Luego de un lapso de tiempo, siendo su promedio representado por el “tiempo de vida fluorescente”  $\tau$ , la molécula liberará parte de esta energía en forma de calor y la restante con la emisión de otro fotón.

Este tipo de compuestos tienen una gran variedad de aplicaciones en las biociencias, como acoplamiento a proteínas y otras biomoléculas, ser utilizados como agentes de contraste en microscopía confocal, entre otras. Una de estas aplicaciones de gran interés es la de medir la unión de una proteína a un oligonucleótido marcado con fluoresceína (un fluoróforo orgánico) mediante el análisis de la anisotropía de fluorescencia (Owen et al., 2009).

La anisotropía de fluorescencia es un fenómeno físico en el cual la luz emitida por un fluoróforo tiene intensidades diferentes en distintos ejes de polarización. Esto se debe a que la radiación emitida tendrá una orientación particular en un eje respecto a la molécula. Considerando que las moléculas en una solución no se encuentran todas con idéntica orientación ni de forma estática, sino que experimentan un “movimiento aleatorio” debido al fenómeno de movimiento Browniano, resulta natural entonces que la radiación emitida tenga diferentes intensidades en distintos ejes de polarización, correspondiendo cada uno de estos a una sumatoria de las moléculas en la solución que tengan determinada orientación. Matemáticamente la anisotropía ( $r$ ) está definida como la relación entre el componente polarizado de la luz con la intensidad total ( $I_T$ ) (Lakowicz, 2006) (1).

$$r = \frac{I_z - I_y}{I_x + I_y + I_z} \quad (1)$$

Cuando una molécula interactúa con otra su movimiento en el espacio se ve alterado, esto puede explicarse con su “tiempo de correlación rotacional”  $\phi_r$  (definido como el tiempo que demora una molécula en rotar 1 radian), el cual depende de la viscosidad del medio, temperatura, constante de Boltzmann ( $k_B$ , una constante física que relaciona temperatura absoluta y energía) y volumen de la molécula (2) (Birch et al, 2013).

$$\phi_r = \frac{\eta V}{k_B T} \quad (2)$$

El grado de decorrelación en la polarización de las radiaciones incidentes y emitidas dependen de cuán rápido la orientación del fluoróforo varíe ( $\phi_r$ ) con respecto al tiempo de vida fluorescencia ( $\tau$ ). La relación entre estos factores y la anisotropía ( $r$ ), puede ser definida por la ecuación de Perrin (3) (Valeur et al, 2001).

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\phi_r}} \quad (3)$$

Aquí  $r_0$  es la anisotropía intrínseca, la cual expresa la relación entre las orientaciones de la luz incidente y la emitida, pudiendo adoptar valores entre 0.4, cuando los dipolos de las radiaciones son paralelos entre sí, y -0.2, cuando son perpendiculares.

De esta forma, cuando una molécula marcada con un fluoróforo interactúa con otra se forma un complejo de mayor volumen y, por lo tanto, de mayor anisotropía, permitiendo armarse así una curva de titulación con el agregado de esta segunda molécula y medición de la anisotropía, a fin de medir la fuerza de interacción entre dos moléculas. Es conveniente para ello marcar con el fluoróforo a la molécula más pequeña, ya que esto generará una mayor diferencia de volumen molecular entre la molécula libre en solución y la molécula interactuando, generando una curva más pronunciada (Lakowicz, 2006).

## Hipótesis

Se propone realizar tres construcciones de MerR-G de acuerdo a los dominios que esta presenta: MerRG-HTH, MerRG-B12 y MerRG-Full. Para esto es necesario el diseño de cuatro primers: MerR-Fw, HTH-Rev, B12-Rev y Full-Rev; así como también la utilización de primers genéricos diseñados para el sistema Gateway®.

Las transformaciones de *E. coli* de la cepa BL21-DE3, con las construcciones generadas, permiten la expresión del producto tras inducción. Es necesario llevar a cabo una puesta a punto de las condiciones ideales de la expresión de la proteína de interés en este sistema. La subsecuente correcta expresión de la proteína permitirá purificarla mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna IMAC.

La caracterización biofísica y bioquímica de MerR-G y BA40, y la comparación de los valores obtenidos en ambos casos, pueden permitir sacar valiosas conclusiones respecto a las proteínas de la familia MerR adaptadas para organismos psicrotolerantes.

## Metodología

### Materiales y métodos

#### 1) Cepas bacterianas y cultivo

La cepa de *E. coli* empleada en las etapas de clonado fue DH5 $\alpha$ , mientras que la cepa utilizada para la expresión fue BL21-DE3. Los eventos de transformación se realizaron mediante el método de “shock-térmico”. Los cultivos bacterianos se realizaron en medio

Luria-Bertani (LB) (NaCl 10 g/l, Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y, en caso de tratarse de cultivo sólido, agar-agar 1,5 % p/v), con 100 µg/ml de ampicilina o kanamicina, según correspondiera.

Las incubaciones de los cultivos líquidos se llevaron a cabo a 20, 28 y 37 °C overnight (O.N.), dependiendo de la temperatura óptima para la producción de la proteína en cuestión, con agitación a 220 rpm. Los crecimientos en placa fueron realizados en estufa a 37 °C O.N.

Las cepas competentes para las transformaciones fueron realizadas en el laboratorio. Para ello se llevó un cultivo de cada una de las cepas (DH5α y BL21-DE3) en LB a aproximadamente 0,4 de densidad óptica (OD), manteniendo condiciones de esterilidad, cada cultivo se enfrió en hielo por 20 minutos y centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se resuspendió el pellet en la mitad del volumen original de CaCl<sub>2</sub> 50 mM en agua. Luego se centrifugó y resuspendió en CaCl<sub>2</sub> 50 mM una segunda vez, para finalmente centrifugar una vez más y resuspender el pellet en un décimo del volumen inicial de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M y glicerol 20 %. Cada suspensión final se dividió en alícuotas de 200 µl, estas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y fueron preservadas a -80 °C para su posterior uso.

El protocolo de transformación por shock-térmico utilizado consistió en tomar una alícuota de células competentes y descongelarlo en hielo durante 5 minutos. Una vez descongelado se agregó el plásmido correspondiente y se dejó el tubo unos 10 minutos adicionales en hielo, para luego calentar el tubo a 42 °C por 50 segundos y nuevamente llevarlo a hielo por 2 minutos adicionales. Se sembró el tubo con 800 µl de LB estéril y se incubó a 37 °C durante 40 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó el tubo a 4000 rpm durante 5 minutos, se descartaron 900 µl y se resuspendió el pellet en los 100 µl restantes. Se plaqueó la suspensión en agar-LB con el antibiótico correspondiente para cada caso e incubó la placa a 37 °C O.N.

## 2) Bioinformática

La secuencia del nuevo ORF seleccionado fue sometida a análisis bioinformático utilizando el programa Pfam de EBI (European Bioinformatics Institute) , el cual encontró dos coincidencias significativas. En primer lugar una dominio “Helix-turn-Helix” (HTH) homólogo a la familia MerR de proteínas regulatorias, entre el aminoácido 8 y el 76, y en segundo lugar un dominio de unión a B12 (cobalamina), entre el aminoácido 95 y el 166.



(**Tabla II**). Por esta razón, denominaremos a esta proteína de ahora en más como MerR-G, para simplificar.

**Secuencia nucleotídica de MerR-G:**

ATGAACAATATTAAGAGTAATTTTAGCATTAAAGATCTTGAAAATCTATCTGGTG  
 TAAAAGCACATAACCATTAGAATTTGGGAAAAGCGTTACAATCTTTTAAAACCTAA  
 CCGTACTGATACAAATATTAGATATTACAGTTTGGAAAGTCTGCAGAAGCTTCTC  
 AATATCACCTTCTTTATAATAATGGATTTAAAATATCTAAAATTGCAAAAATAA  
 ACGATTTGGATATTGCGGATACCGTTCGTGATTTATCATCTAAAGCCTATGCCGAC  
 GATCATGCCATAAACATGTTAAAGTTGGCTATGCTAAATTTTGATAAGGAGCTGT  
 TTCTAAATACGTATGATAACTTATTACAGCATAAGGATTTTTCTGAAATTTTCATG  
 GAAGTTTTTATACCACTTATGAGTGAAATAGGTTTTTTATGGCAAACAAATACGA  
 TTACACCCGCGCAAGAACATTTTATTTCTGAATTAATTAAGCAAAAAGTTATTGGTT  
 AATATTGAAAATTGCACATTAAGCAATAAAAAACAAGGATAAAAACTTTGTA  
 CTCTTTCTTCCAAATAACGAAATTCATGATTTAGGACTGCATTTTTTAAATTATAA  
 GCTCACCAAAGCAAATCATCATAACGCTATATTTGGGTCCAAGTGTTCCTATTGTA  
 AGCCTAAAAGATGTTTTAAAGCACCATAAAAACATTATCTTTATTTCTATTTCAC  
 GGTA AAAACCCGAAACAGAAAATATTGAAA ACTACTTAAAGGAATTTTCATGATGA  
 GCTCCTCAATAACGGTAATGAATTATGGATATTTGGCCGTATGGCAAATAATATA  
 GACA ACTCCA AATTGCCTAAA ACCATTAAAGCTTTTCATTCCGTAAACGATTTAG  
 ATAAATATATCTAA

**Secuencia aminoacídica de MerR-G:**

[MNNIKSNFSIKDLENLSGVKAHTIRIWEKRYNLLKPNRTDTNIRYYSLESLQKLLNITF  
LYNNGFKISKIAKI]NDLDIADTVRDLSSKAYADDHA[INMLKLAMLNFDKELFLNTY  
DNLLQHKDFSEIFMEVFIPLMSEIGFLWQTNITPAQEHFISELIKQKL]LVNIENCTLKA  
 IKNKDKNFVLFPLNNEIHDLGLHFLNYKLTKANHHTLYLGPSPVIVSLKDVLLKHHKNI  
 IFISYFTVKPETENIENYLKEFHDELLNNGNELWIFGRMANNIDNSKLPKTIKAFHSVN  
 DLDKYI

**Tabla II.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de MerR-G. En la secuencia aminoacídica se encuentran, entre corchetes y subrayados, los dominios HTH y de unión a B12.

**3) Clonado:**

- PCR

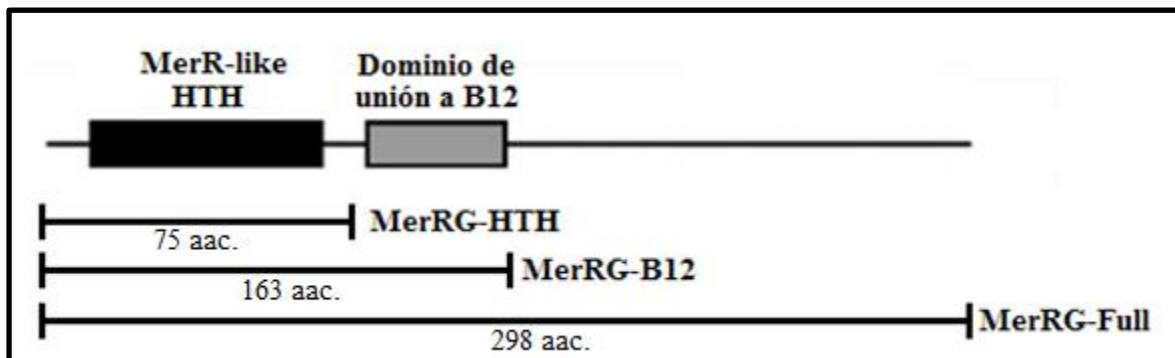
La “Polymerase Chain Reaction” (PCR) es una técnica que permite la obtención de grandes cantidades de copias de una secuencia de ADN (amplificación) a partir de un ADN molde, aprovechando las propiedades de ADN polimerasas termoestables (en este caso Pfu, extraída de *Pyrococcus furiosus*) y ciclando entre temperaturas de desnaturalización (separación de la doble hebra), annealing (unión de primers a cada hebra) y elongación (síntesis de cada doble hebra). Los primers son fragmentos de ADN de secuencia específica,

que se unen a los extremos de la secuencia a amplificar, funcionando como iniciadores de la reacción en cadena y permitiendo la amplificación de la porción deseada únicamente. En este caso, además, los primers funcionan para el agregado de fragmentos adicionales al ADN amplificado que permitan su posterior recombinación. Las reacciones de PCR se realizaron en 50 µl de volumen final y el perfil de ciclado se mantuvo a lo largo de todos los experimentos (Tabla III).

1 ciclo de desnaturalización: 5 minutos a 94 °C.
30 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> <li>-Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C.</li> <li>-Annealing: 30 segundos a temperatura variable, dependiendo del par de primers.</li> <li>-Extensión: 68 °C a tiempo variable, dependiendo del constructo.</li> </ul>
1 ciclo de elongación final: 10 minutos a 68 °C.

**Tabla III.** Perfil de ciclado utilizado en la termocicladora para todas las PCRs realizadas en la tesis.

Al encontrar dominios tan definidos en la proteína MerR-G se decidió diseñar pares de primers para cada uno de estos dominios, dejando así tres construcciones: MerRG-HTH, MerRG-B12 y MerRG-Full. La primera de estas integrada por el dominio HTH de MerR-G, la segunda por los dominios HTH y de unión a B12, y la tercera por la proteína completa (Figura 15). Si bien todos los primers fueron diseñados, se continuaron las distintas secciones de esta tesis únicamente con el constructo MerRG-HTH, a fin de estudiar únicamente este dominio y dejar el resto de los constructos preparados para futuros trabajos en el laboratorio de RMN de FIL.



**Figura 15.** Arquitectura de MerR-G y extensión de los constructos MerRG-HTH, MerRG-B12 y MerRG-Full.

Los fragmentos de ADN a insertar en los plásmidos de Gateway fueron obtenidos por dos reacciones de PCR con primers específicos a la secuencia deseada y “genéricos” para el sistema Gateway® (Tabla IV).

<p><b>MerR-G Fw</b>  TGCGAGAACCTGTACTTTCAGGGT<u>ATGAACAATATTAAGAGTAA</u>  <u>TTTTAGCATT</u></p> <p><b>Rev MerRG-HTH</b>  GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTA<u>AATCGTTTATTTTTG</u>  <u>CAATTTTAGATA</u></p> <p><b>Rev MerRG-B12</b>  GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATA<u>ACTTTTGCTTA</u>  <u>ATTAATTCAGAAAT</u></p> <p><b>Rev MerRG-Full</b>  GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTA<u>ATTAGATATATTTA</u>  <u>TCTAAATCGTTTACGG</u></p> <p><b>Gen Fw</b>  GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGGAGAACCTGTACT  TTCAG</p> <p><b>Gen Rev</b>  GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTA</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Tabla IV.** El primer MerR-G Fw es un primer común a los 3 constructos, difiriendo en ellos el primer Rev, uno para cada constructo (MerRG-HTH, MerRG-B12 y MerRG-Full). Todos estos primers solapan al ADN genómico de *Bizionia argentinensis* por las secuencias subrayadas y agregan fragmentos a los productos que permiten realizar la segunda PCR, llevada a cabo con los primers Gen Fw y Gen Rev, primers genéricos para el sistema Gateway® que permiten la recombinación.

Los primers diseñados se unen a hebras de ADN por homología de secuencia en las secciones subrayadas y permiten la extensión de la secuencia, además del agregado de las secciones no subrayadas a los fragmentos. Estas últimas secciones contienen los sitios “att” necesarios para la recombinación mediante el sistema Gateway<sup>®</sup>.

- **Sistema Gateway<sup>®</sup>**

El clonado molecular se llevó a cabo mediante el sistema Gateway<sup>®</sup> Technology with Clonase II (Invitrogen). Para esto se utilizaron los productos generados por PCR, los mix de enzimas correspondientes para cada reacción y como plásmidos se utilizaron pDONR 201 como vector donador y pDEST 527 como vector destino (Anexos A y B).

Las reacciones de recombinación se realizaron siguiendo las guías del fabricante:

- Reacción BP

Reacción BP
Vector pDONR 201 (150 ng/μl): 1 μl
BP Clonase <sup>®</sup> II (20X): 0,5 μl
Inserto de ADN: 15-150 ng totales
Buffer TE pH8: completar 10 μl de volumen

La reacción fue incubada a 25 °C O.N., seguido por el agregado de 1 μl de proteinasa K e incubación a 37 °C durante 10 minutos para detener la reacción. Se tomaron 2,5 μl de la reacción para continuar con la correspondiente transformación y el volumen restante fue conservado a -20 °C.

Para la transformación con “pDONR 201 + inserto”, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5α, siguiendo el protocolo de transformación por shock-térmico antes mencionado y las bacterias transformadas fueron plaqueadas en agar-LB con Kanamicina e incubadas a 37 °C O.N. Se realizaron cultivos de 10 ml a partir de las colonias formadas, para realizar minipreps por lisis alcalina. La correcta recombinación fue verificada mediante la siembra de minipreps en gel de agarosa y por secuenciación de Sanger, utilizando un primer complementario al promotor T7, presente tanto en pDONR 201 como en pDEST 527.

El ADN plasmídico obtenido de clones con la secuencia correcta fue utilizado para el siguiente paso de recombinación.

- Reacción LR

Reacción LR
Vector pDEST 527 (150 ng/μl): 1 μl
LR Clonase <sup>®</sup> II (20X): 0,5 μl
pDONR + Inserto: 15-150 ng
Buffer TE pH8: completar 10 μl de volumen

La reacción fue incubada a 25 °C O.N., seguido por el agregado de 1 μl de proteinasa K e incubación a 37 °C durante 10 minutos para detener la reacción. Se tomaron 2,5 μl de la reacción para continuar con la correspondiente transformación y el volumen restante fue conservado a -20 °C.

Para la transformación con “pDEST 527 + inserto”, se utilizó la cepa de *E. coli* BL21-DE3, siguiendo el protocolo de transformación por shock-térmico antes mencionado y las bacterias transformadas fueron plaqueadas en agar-LB con Ampicilina e incubadas a 37 °C O.N. Se realizaron cultivos de 10 ml a partir de las colonias formadas, para realizar minipreps por lisis alcalina. La correcta recombinación fue nuevamente verificada por secuenciación de Sanger, utilizando un primer complementario al promotor T7.

Luego, se preparó un cultivo de las células finales, que contenían el vector final con la secuencia correcta (cepa bautizada BL21-HTH), en LB líquido y se dividió la suspensión en tubos eppendorf con 400ul del cultivo y 600ul de glicerol 50%, los cuales fueron preservados a -80°C.

**4) Análisis de ADN y Proteínas**

Todas las purificaciones de ADN plasmídico se realizaron mediante la técnica de Miniprep por lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). La calidad de los productos de ADN obtenidos, sean productos de PCR o ADN plasmídico, fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa (~ 1 %), con buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA en agua) con bromuro de etidio como intercalante. Los marcadores utilizados fueron M-19 y M-1Kb, manufacturados en el Instituto Leloir.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo). Cuando fuera necesario, los productos de ADN obtenidos fueron concentrados mediante precipitación con LiCl/etanol. Para esto, se agregaron 2 volúmenes de Etanol Absoluto frío y 1/20 volúmenes de LiCl 4 M al ADN

purificado. La solución se dejó reposar durante 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Luego, se centrifugó durante 15 minutos a 16000 xg. Se descartó el sobrenadante con micropipeta. Se lavó el pellet con Etanol 70% dos veces. Se descartó el sobrenadante, se evaporó el etanol y se resuspendió el pellet en H<sub>2</sub>O miliQ.

La verificación de presencia o pureza de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 17 % (acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8%) y las bandas proteicas visualizadas por tinción con azul de Coomassie.

Las imágenes de cada electroforesis fueron capturadas en un foto-documentador (Biorad) y digitalizadas con el software del mismo equipo.

En todos los casos en que fue necesario llevar a cabo una secuenciación, esta fue realizada con un secuenciador automático 3130 de Applied Biosystems mediante el método Sanger. Para cada reacción se utilizó una muestra de 5  $\mu\text{l}$  de solución plasmídica de concentración mayor a 200 ng/ $\mu\text{l}$ . Previo a esto, todas las muestras de ADN plasmídico a ser secuenciadas fueron sometidas a una precipitación con PEG-800. Sobre la muestra de ADN se agregó 1 volumen de solución PEG (PEG-8000 13 % p/v y NaCl 1,6 M) y se incubó 1 hora en hielo. Luego de la incubación se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de etanol 70 %. Se centrifugó nuevamente la muestra durante 3 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 20  $\mu\text{l}$  de agua MQ.

## 5) Expresión y purificación

- Expresión:

A partir de los “gliceroles” de células productoras se llevaron a cabo pre-cultivos en LB-ampi a  $37^{\circ}\text{C}$  O.N. Luego, cada uno de estos pre-cultivos, se usó para iniciar un cultivo de mayor volumen, el cual se mantuvo en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  y 220 rpm, hasta obtener una OD<sub>590nm</sub> (Optical Density at 590nm wavelength) entre 0,4 y 0,6 respecto a un blanco de agua-MQ. Una vez alcanzada la O.D. se llevó a cabo una inducción con IPTG 0,5mM a 20, 28 y  $37^{\circ}\text{C}$  O.N., dependiendo del caso particular.

El cultivo final fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en **Buffer A** (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, pH 8) y se le agregó PMSF 1mM para evitar la degradación por proteasas. Las células se lisaron con ultrasonido y la fracción soluble fue separada por ultra-centrifugación a 40000 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

- Purificación por cromatografía de afinidad:

La fracción soluble del lisado bacteriano fue sometida a una cromatografía líquida de afinidad, aprovechando así la unión del “tag de histidinas” de la proteína con el níquel de una columna IMAC. La purificación se llevó a cabo en una columna ensamblada sobre mesada y utilizando un sistema FPLC.

La columna fue equilibrada con Buffer A previo a la carga de la proteína. La muestra fue cargada en la columna junto con 3 volúmenes de buffer A. El producto de unión inespecífica fue removido de la columna utilizando una solución de 5% de Buffer B (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, pH 8 e Imidazol). Las proteínas con un tag de histidinas se eluyeron a una concentración de 60 % de **Buffer B**. Luego la columna se limpió de proteínas restantes con Buffer B 100%, se lavó con agua y mantuvo con Etanol 20%.

La elución con HTH fue sometida a un cambio de buffer por centrifugaciones sucesivas a 3500 rpm con un centricon de poro 3,5kDa a un medio con Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM y pH 7 (**Buffer Tris**), y la solución de proteína resultante fue preservada a -20°C.

- Purificación por cromatografía de intercambio iónico:

La purificación por cromatografía de intercambio iónico fue realizada sometiendo el producto extraído a 60 % de Buffer B de la columna IMAC a un cambio de buffer mediante el uso de centricon de 3500 kDa. Se realizó el cambio a **Buffer C** (buffer fosfato 25 mM, NaCl 0,1 M y pH 7). La solución proteica fue inyectada en una columna de tipo Mono S<sup>®</sup> (GE Healthcare), una columna de intercambio catiónico con grupos metil sulfonato inmovilizados, equilibrada con Buffer C y acoplada a un sistema FPLC.

La cromatografía fue realizada mediante un gradiente de **Buffer D** (buffer fosfato 25 mM, NaCl 1,5 M y pH 7) a lo largo de 60 minutos y todos los picos obtenidos fueron recolectados. La columna fue luego lavada con una inyección de NaCl 2 M, seguida por agua y se mantuvo en Etanol 20%.

## 6) Western Blot

Los western blot fueron realizados mediante la transferencia de las proteínas, corridas en un gel de poliacrilamida al 17,5 %, a una membrana de nitrocelulosa por medio de transferencia “húmeda” a 300 mA durante 1 hora, con un buffer de transferencia compuesto por 20 % Etanol, Tris 20 mM y glicina 150 mM. Se verificó la transferencia de proteínas a la membrana incubando la misma con Rojo Ponceau 0,2 % y ácido acético.

Luego de desteñir la membrana, esta fue incubada por 1 hora a temperatura ambiente en buffer PBS con 2 % de glicina y 3 % de leche, a fin de saturar los sitios de unión de la membrana. Luego se la incubó O.N. a 4 °C con buffer PBS con 3 % de leche, 2 % de glicina y el anticuerpo primario anti-His6-Tag (Qiagen).

Se realizaron 3 lavados con buffer PBS y 2 % de glicina, durante 10 minutos cada uno, para luego incubar la membrana con buffer PBS, glicina 2 % y leche 3 % con el anticuerpo secundario anti-mouse unido a HRP (HorseRadish Peroxidase) (GE) y nuevamente lavado 3 veces con buffer PBS y 2 % de glicina.

El revelado se realizó utilizando el sistema Amersham ECL® Western Blotting Analysis System (GE) en un equipo LAS4000 Luminescent Image Analyser (GE), y la imagen de la misma tomada con el sistema del equipo.

## 7) Determinación de estructura secundaria

- Dicroísmo circular:

Se evaluó el patrón de estructura secundaria de MerR-G y ambas formas de BA40 por la técnica de dicroísmo circular (**DC**), midiendo con ella sus espectros característicos en el UV lejano (190-280nm) en un espectro polarímetro J-815 (Jasco, Easton, MD) equipado con un controlador de temperatura termoeléctrico (Peltier), utilizando una cubeta de cuarzo con 0,2cm de paso óptico. Los ensayos de DC de HTH se realizaron en buffer Tris-HCl/ NaCl (pH6 y pH8) y buffer Fosfato, con y sin agregado de EDTA, a fin de comparar resultados entre ellos y descartar los efectos de los componentes del buffer en la medición. Los valores de **elipticidad** ( $\theta$ ) en grados fueron convertidos a valores de **elipticidad media** ( $\theta_{mr}$ ) mediante una ecuación que relaciona la elipticidad obtenida con valores de la proteína, como el número de residuos aminoácidos ( $n_r$ ) y la masa molar ( $M_w$ ) de la proteína, y las condiciones de medición, la concentración ( $C$ ) y el paso óptico de la cubeta utilizada ( $l$ ). (4)

$$\theta_{mr} = \theta \cdot \frac{M_w}{10 \cdot C \cdot n_r \cdot l} \quad (4)$$

Adicionalmente, se realizó una predicción de la estructura secundaria mediante el servidor online Jpred (Drozdetskiy et al., 2015).



- Termodesnaturalización:

Utilizando el mismo equipo que para DC (Jasco J-815 con Peltier) y con los mismos buffers, se realizaron curvas de termodesnaturalización, a fin de analizar la variación de la estructura secundaria de MerR-G y ambas formas de BA40 al ser sometida a un cambio de temperatura. Para ello se llevó a cabo una curva de desnaturalización entre 20°C y 80°C, realizando además un espectro de DC a 80°C y uno a 20°C posterior a la termodesnaturalización.

## 8) Interacción al ADN

- Espectrometría de fluorescencia.

Al tratarse de un factor de transcripción resultó clave realizar ensayos de unión al ADN. Estos fueron realizados analizando cambios en la anisotropía de fluorescencia con un espectrofluorímetro Jasco FP-6500 (Jasco, Easton, MD). Para esto se armó una curva de titulación a partir de 250 µl de ADN de 18 pb de secuencia aleatoria unido covalentemente a fluoresceína a una concentración de 200 nM, con el agregado sucesivo de MerRG-HTH, BA40 y BA40-ΔH5 (buffer **Tris**) a 20°C, excitando a 495 nm (el máximo de absorbancia de la fluoresceína) y realizando mediciones de anisotropía a 518 nm (el máximo de emisión de la fluoresceína).

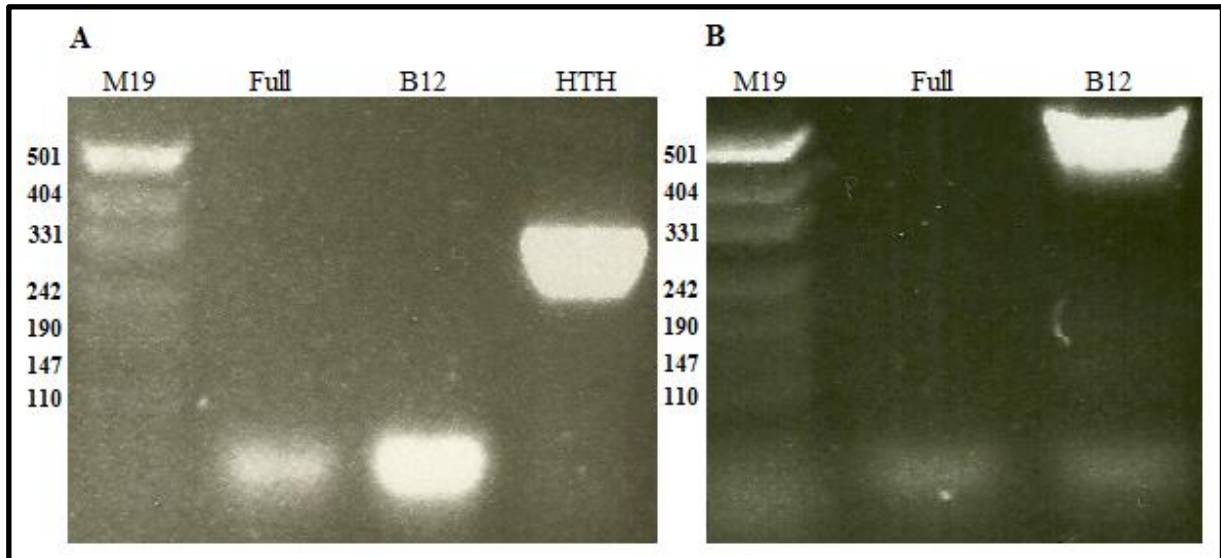
## Resultados

### 1) Clonado

Se realizaron dos PCRs sucesivas para cada constructo diseñado a partir de la secuencia de MerR-G, utilizando los adecuados pares de primers en ellas y una extracción de ADN genómico de la *B. argentinensis* como punto de partida. Debido a las diferencias en secuencia y longitud de los primers, debieron utilizarse distintas temperaturas de annealing ( $T_a$ ) y tiempos de extensión ( $t_{ext}$ ) para las diferentes reacciones.

En primer lugar se utilizó una  $T_a$  de 52 °C y un  $t_{ext}$  de 2 minutos, la cual arrojó un resultado positivo para MerRG-HTH pero negativo para MerRG-B12 (Figura 16.A) y MerRG-Full. Luego se utilizó una  $T_a$  de 54 °C y un  $t_{ext}$  de 3 minutos, la cual dio resultado para MerRG-B12 pero no para MerRG-Full (Figura 16.B).

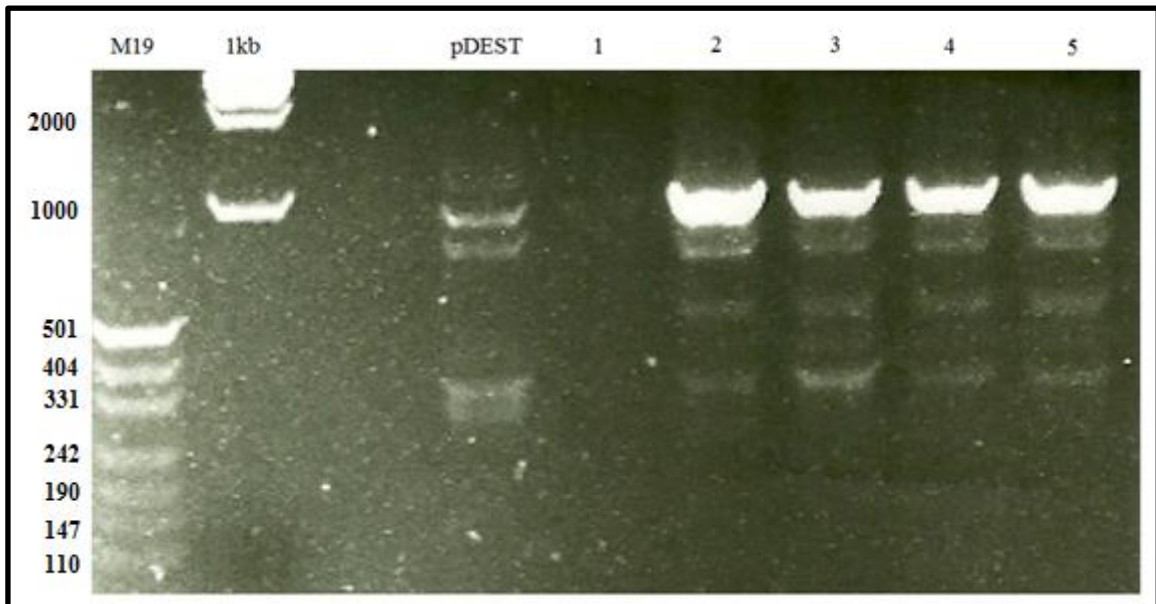
Se probaron diversas condiciones para intentar amplificar la construcción MerRG-Full, variando la  $T_a$  entre 50 y 54 °C y extendiendo el tiempo de extensión hasta 4 minutos, pero no pudo amplificarse el producto en ninguna de las condiciones realizadas.



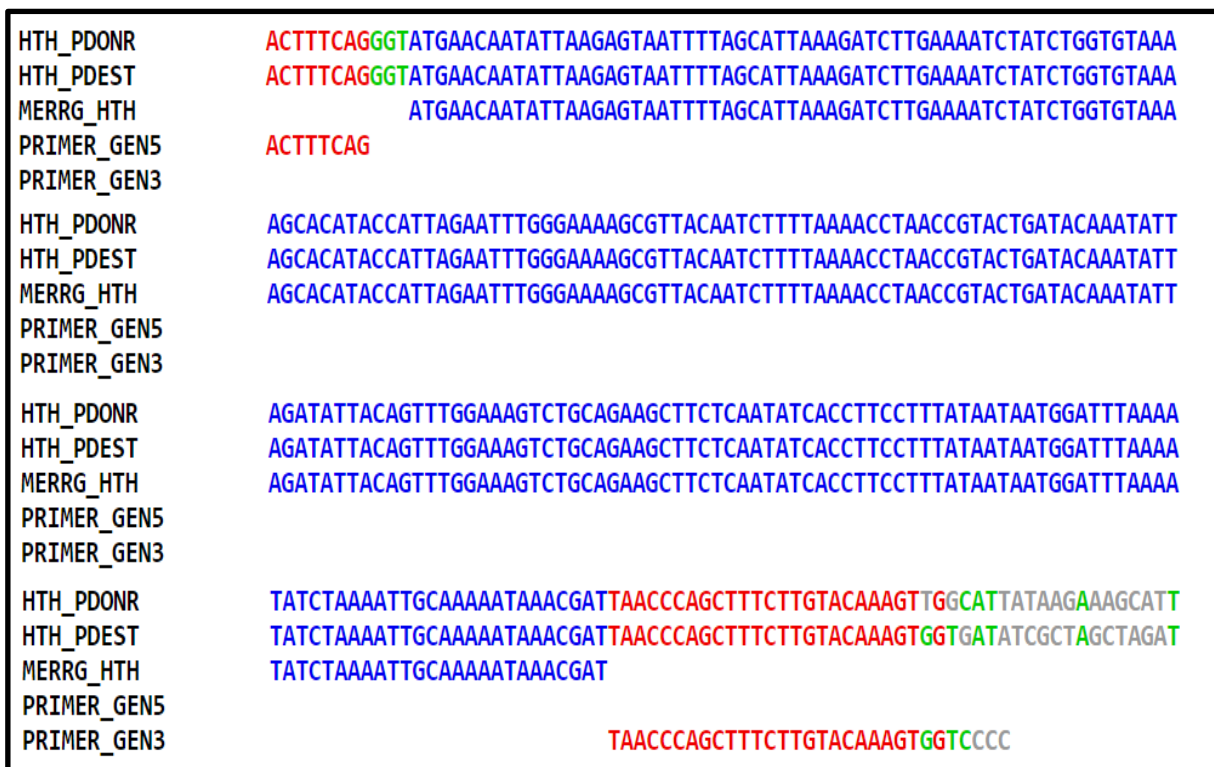
**Figura 16.** PCR de constructos diseñados a partir de MerR-G. **A:**  $T_a = 52\text{ °C}$ ;  $t_{ext} = 2\text{ '}$ . **B:**  $T_a = 54\text{ °C}$ ;  $t_{ext} = 3\text{ '}$ .

Siguiendo el protocolo del sistema Gateway<sup>®</sup>, el producto de PCR MerRG-HTH fue clonado inicialmente en el “entry vector” pDONR-201, utilizando la Clonasa BP. Se transformaron *E. coli* de cepa DH5- $\alpha$  con el plásmido resultante y se seleccionaron mutantes resistentes a kanamicina en placa. El plásmido fue obtenido por miniprep de múltiples colonias resistentes y la correcta recombinación del fragmento en el vector fue verificada por secuenciación (Figura 18).

Luego, el plásmido fue recombinado junto con el “destination vector” pDEST-527, utilizando la clonasa LR, generando así un vector de expresión. Se transformaron *E. coli* de cepa BL21 (DE3), ideales para expresión, y se seleccionaron mutantes resistentes a ampicilina en placa. Se llevaron a cabo minipreps del plásmido a partir de múltiples colonias resistentes (Figura 17) y se verificó la correcta recombinación mediante secuenciación (Figura 18).



**Figura 17.** Minipreps de BL21 (DE3) transformadas con pDEST-527 luego del subclonado de la secuencia de MerRG-HTH en el mismo. M19 y 1kb son marcadores de peso molecular. Pueden verse las minipreps de 5 colonias resistentes a ampicilina (1-5), con cuatro resultados positivos (2-5) y uno negativo (1). Como referencia, hay una calle con pDEST sin recombinar.



**Figura 18.** Alineamiento múltiple de secuencias utilizando el software MultAlin (Corpet, 1988). HTH\_pDONR siendo el resultado de secuenciación por método Sanger de la miniprep de una colonia resistente a kanamicina luego de la primer transformación de protocolo Gateway<sup>®</sup>, y HTH\_pDEST siendo el resultado de secuenciación de una miniprep de una colonia resistente a Ampicilina luego de la segunda transformación del protocolo Gateway<sup>®</sup>. Están presentes en el alineamiento también las secuencias de los primers genéricos del sistema Gateway<sup>®</sup> y la secuencia planeada del constructo MerRG-HTH.

Las secuenciaciones fueron realizadas con el método Sanger utilizando un primer complementario al promotor T7 (utilizado en ambos plásmidos del sistema Gateway<sup>®</sup>), a fin de observar la secuencia completa de la construcción.

La cepa de expresión **BL21-HTH** fue utilizada para generar “gliceroles”, que puedan ser preservados a -80°C sin dañar las células, agregando 600ul de cultivo a 400ul de glicerol 50% y prontamente congelando los tubos en nitrógeno líquido.

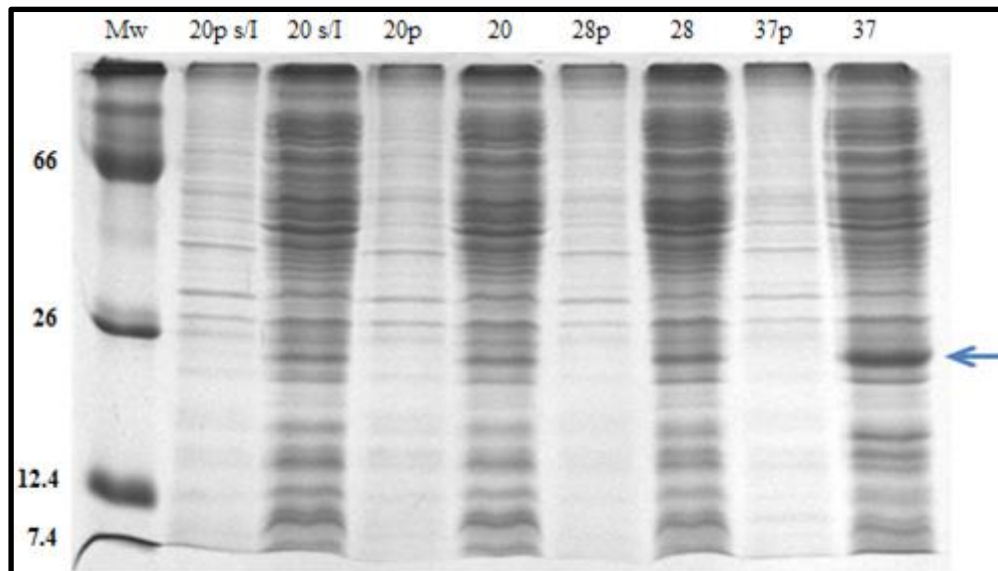
## 2) Expresión y purificación de MerR-G

- Expresión

En una primera etapa se realizaron diversos ensayos a pequeña escala a fin de conocer las condiciones óptimas de expresión y el estado de solubilidad de la proteína recombinante.

A partir del “glicerol” obtenido en el paso anterior, se realizó un pre-cultivo en 10 ml de LB líquido con ampicilina, incubado a 37 °C y 220 rpm O.N. Luego, se inocularon 4 tubos de 10 ml de LB con ampicilina con 200 µl de este pre-cultivo, los cuales fueron incubados a 37 °C y 220 rpm hasta alcanza un valor de OD<sub>590nm</sub> entre 0,4 y 0,6.

A fin de probar la correcta inducción y verificar la expresión de la proteína recombinante, así como la temperatura óptima para la producción de la misma, se incubaron 3 de estos cultivos O.N. a 220 rpm a 20, 28 y 37 °C con el agregado de IPTG a una concentración de 0,5 mM, a fin de darle a estos tiempo suficiente para producir una buena cantidad de la proteína recombinante. El tubo restante se incubó a 20 °C O.N. a 220 rpm, sin el agregado de IPTG, con el objetivo de tenerlo como control negativo (Figura 19).



**Figura 19.** SDS-PAGE de test de expresión a distintas temperaturas. Las temperaturas probadas fueron 20, 28 y 37 °C. Las calles 2 y 3 (s/I) no contienen IPTG. Para cada condición se sembraron la porción soluble y el pellet (subíndice “p”). El marker utilizado fue creado en el laboratorio (ANEXO D).

Se observa en el gel una aparente banda de sobre expresión a 37 °C a ~24 kDa, el doble que los 12 kDa estimados para la proteína recombinante, y así, puede llegarse a la conclusión de que se trata de una forma dimerizada de la proteína. Si bien el gel fue realizado en condiciones desnaturizantes y la proteína no contiene cisteínas, que podrían mantenerla en forma de dímero aún en ciertas condiciones desnaturizantes, la presencia del His6-tag puede apuntar a que la proteína se encuentre en forma dimérica al estar coordinando metales.

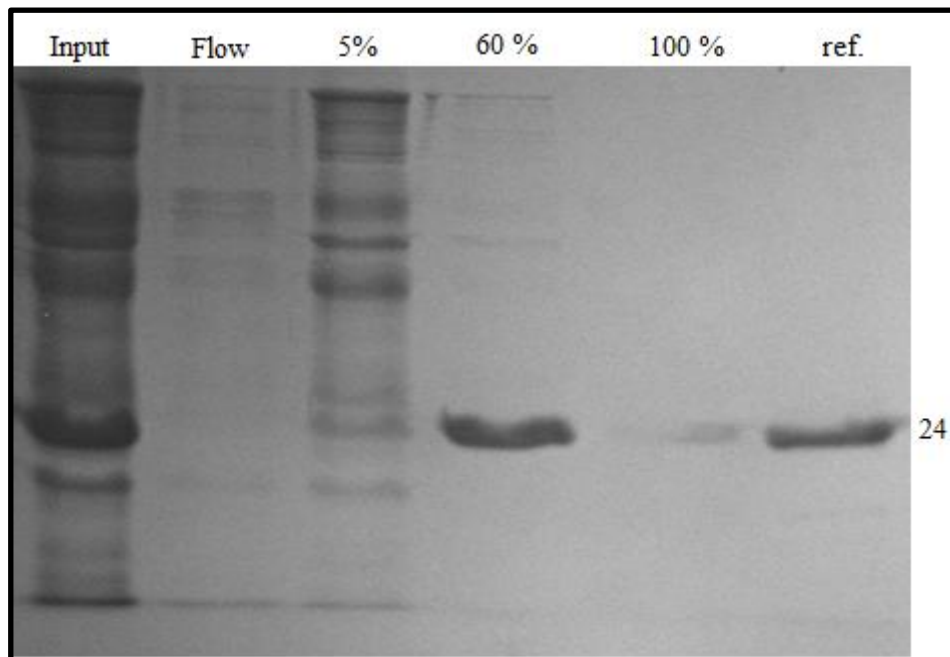
También se notó que esta proteína se encontraba, casi en su totalidad, en la fracción soluble, facilitando el proceso de purificación.

De acuerdo al tamaño de proteína sugerido, se observa una más alta producción en la fracción soluble del cultivo realizado a 37°C, por lo que todos los cultivos subsiguientes se realizaron a esta temperatura.

- Purificación

Debido a que la proteína recombinante contiene un “tag de histidinas”, la purificación de la misma fue llevada a cabo por una cromatografía de afinidad en mesada, por gravedad, en una columna de níquel (IMAC). La cromatografía fue realizada en una columna de 2ml con los buffers A y B (ver Materiales y Métodos). Previo a la corrida la columna fue equilibrarla con 3 volúmenes de Buffer A, luego se cargó la fracción soluble de proteínas en Buffer A (**input**) y se lavó la columna de proteínas sin afinidad con 8 volúmenes de buffer A (**flowthrough**). Se eluyeron las proteínas de unión inespecífica con un lavado de 6 volúmenes de Buffer B 5% (**5%**) y finalmente se removió a la proteína de la columna con 3 volúmenes de buffer B 60% (**60%**), concentración seleccionada por ser a la que BA40 eluye de la columna en el protocolo puesto a punto con anterioridad en el laboratorio. La columna fue sometida a un último lavado con Buffer B 100% (**100%**), luego lavada con agua y con Etanol 20%, siendo refrigerada a 8°C hasta próximo uso.

Se colectaron fracciones del input, flowthrough, 5%, 60% y 100% a fin de analizar la fracción proteica de cada una en un SDS-PAGE (Figura 20).



**Figura 20.** Purificación por IMAC sobre mesada. Input: fracción soluble ingresada en la columna; flow: fracción eluida durante la carga de la columna; 5 %: fracción eluida con el lavado con de 5 % de buffer B (producto inespecífico); 60 %: porción eluida con 60 % de buffer B (correspondería al producto con His6-Tag); y 100 %: fracción eluida con 100% de buffer B. En la última calle puede verse una proteína de referencia de peso similar a la de interés (~24 kDa).

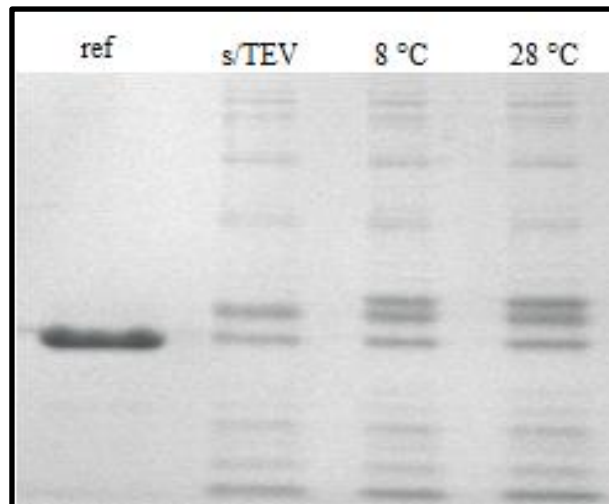
Puede observarse en el SDS-PAGE que se purificó la proteína de 24 kDa en la fracción de 60% de buffer B, concentración de imidazol a la que, de acuerdo al protocolo puesto a punto con anterioridad en el laboratorio, eluía BA40 de la columna. Por ello, puede inferirse que se trata, en efecto, de MerRG-HTH dimerizada.

Se realizaron intercambios de buffer escalonados por filtración, con el objeto de remover el imidazol. Se diluyó, y luego concentró, repetidas veces en un centrífugo con tamaño de poro 3,5kDa a 3500rpm, para obtener la proteína nuevamente en Buffer A. Se continuó la concentración con el centrífugo hasta obtener una concentración final de 50µM de la proteína. Una fracción de esta solución fue refrigerada a -20°C de esta forma (**HTH-Tris**) y a otra se le agregó un 10% de glicerol (**HTH-Tris Glic**).

### 3) Corte con TEV

El sistema de clonado Gateway<sup>®</sup> permite eliminar el His6-Tag, utilizado en la purificación, mediante un sitio de corte para la enzima TEV (Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase), una endopeptidasa secuencia-específica. A fin de verificar que el

corte de la enzima se realizara se utilizó una purificación incompleta obtenida durante la puesta a punto del protocolo de purificación por IMAC. El corte con la enzima se realizó a 25 °C durante 4 horas y 8 °C O.N., a fin de encontrar la temperatura ideal para el mismo, y la verificación fue hecha mediante un SDS-PAGE (Figura 21).



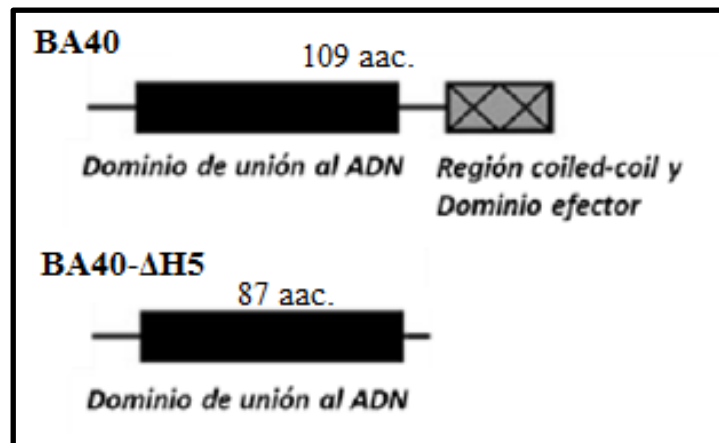
**Figura 21.** SDS-PAGE de test de corte con TEV. s/TEV: control negativo; y ref: una proteína de peso similar a la de interés (~24kDa) para ser utilizada como referencia.

Como puede observarse en el SDS-PAGE, la proteína no pudo ser cortada por TEV en ninguna de las condiciones probadas, por lo que el resto del trabajo de caracterización de la misma se realizará con el Tag y se tendrá este factor en cuenta al momento de analizar los resultados. Esto puede deberse a un impedimento estructural en el acceso de la proteasa a la región de corte, que puede ser ocasionado por la estructura que formen las proteínas al estar dimerizadas.

#### 4) Expresión y purificación de BA40 y BA40-ΔH5

Se había construido, en trabajos previos en el laboratorio, dos cepas de *E. coli* BL21-DE3, transformadas con un vector generado mediante el sistema Gateway<sup>®</sup>. Una de estas cepas productora de BA40 con His6-Tag y la otra, productora de una forma truncada de esta proteína, sin la región coiled-coil del extremo C-terminal, de 87 aminoácidos (en lugar de los 109 de BA40), denominada BA40-ΔH5 (Figura 22), también con His6-Tag. Por ello, la ingeniería genética no fue necesaria para la producción de estas proteínas a los fines de esta tesis.

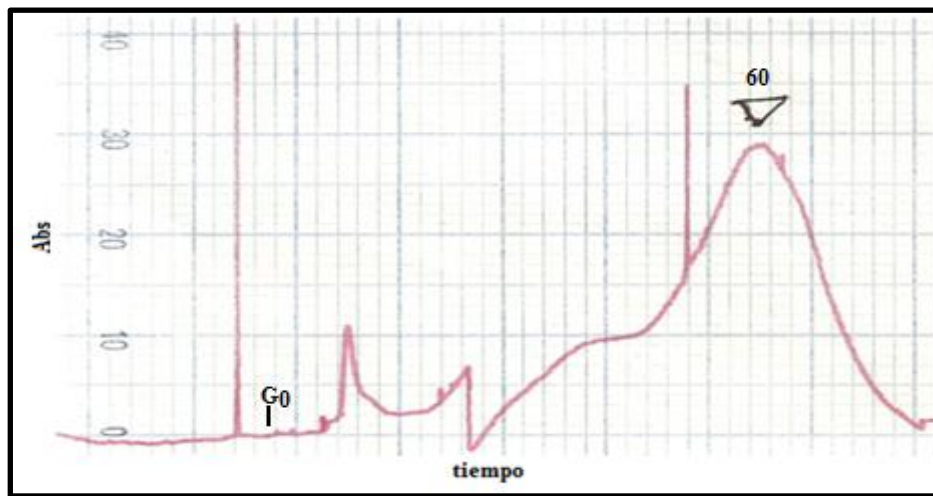




**Figura 22.** Arquitectura de BA40 y BA40-ΔH5, basada en su homología con GlnR.

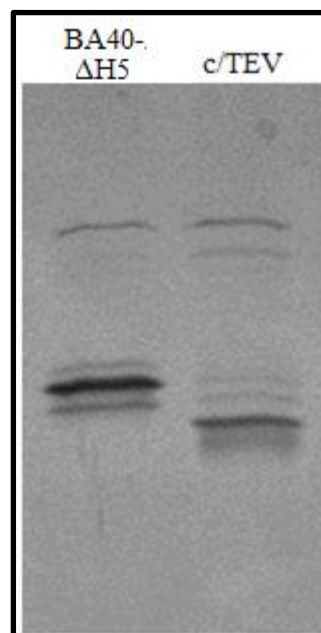
La expresión y purificación fue llevada a cabo siguiendo el protocolo puesto a punto en el laboratorio con anterioridad. Se realizaron cultivos de las cepas a 37 °C hasta obtener una OD de aproximadamente 0,4, luego se indujo la expresión con el agregado de IPTG 0,5 mM y se dejó los cultivos a crecer O.N. a 20 °C, seguido por el pelleteo, sonicado en buffer A y ultra-centrifugación para obtener una solución de las proteínas solubles intracelulares.

La purificación de ambas proteínas se realizó mediante FPLC en gradiente de buffer B con una columna IMAC. Las muestras de proteína fueron recolectadas cuando la lectura del cromatograma indicaba salida de proteína de la columna en la concentración de buffer B adecuada, puesta a punto en el laboratorio con anterioridad como 60 % de Buffer B (Figura 23). Posteriormente a la columna, se realizó un cambio de buffer, por filtración con centrífuga, de las proteínas, a fin de remover el imidazol del medio y dejarla nuevamente en Buffer A.



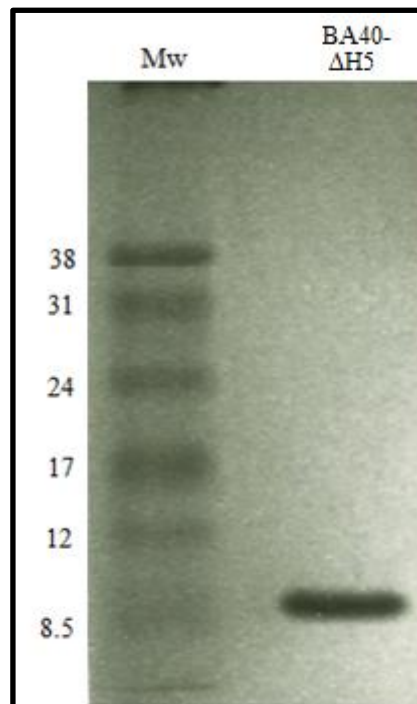
**Figura 23.** Cromatograma de FPLC con IMAC de proteínas solubles de BL21 productora de BA40- $\Delta$ H5. El inicio del gradiente de buffer B está marcado por “G<sub>0</sub>” y el pico correspondiente al híbrido BA40-His6-Tag, indicado por un triángulo, se encuentra a, aproximadamente 60% de buffer B.

El corte con la proteasa TEV, cuyas condiciones habían sido puestas a punto previamente en el laboratorio, fue realizado a temperatura ambiente por 1 hora, con una proporción de 1  $\mu$ g de TEV por cada 30  $\mu$ g de proteína y ditiotretitol (DTT) 2 mM (Figura 24).



**Figura 24.** Corte con TEV de BA40 a 25 °C por 1 hora. Puede observarse en la primera calle (BA40- $\Delta$ H5) la purificación previa al corte y luego del corte con la proteasa TEV (c/TEV).

Luego del corte, la solución fue inyectada nuevamente en una columna IMAC por FPLC, a fin de remover el His6-Tag y la proteasa TEV, también fusionada a His6-Tag. Se recolectó el “flowthrough” de la columna, conteniendo a BA40- $\Delta$ H5, y se lavó la columna con 100 % de Buffer B a fin de remover la proteasa TEV y el His6-Tag, descartando ambas (Figura 25).



**Figura 25.** Flowthrough de columna IMAC sembrada con BA40- $\Delta$ H5 luego del corte con TEV. A su lado, el marcador de peso molecular RNP755E.

La solución fue concentrada mediante el uso de centrífuga, alicuotada y las alícuotas, preservadas a -20 °C para su utilización futura.

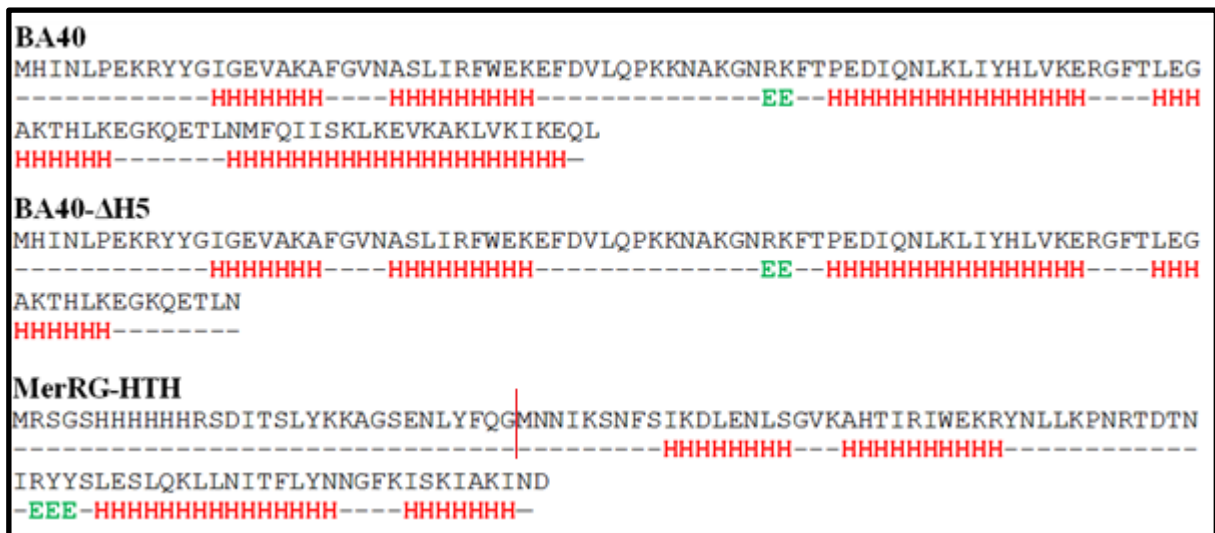
La purificación de BA40 se realizó llevando a cabo los mismos pasos que para BA40- $\Delta$ H5, con la notable excepción que BA40 se queda adherida a la columna IMAC luego del corte con la TEV. Por esta razón, la separación de BA40 de His6-Tag y la proteasa TEV se llevó a cabo exitosamente en una cromatografía en gradiente similar a la primera.

De esta forma, se obtuvieron exitosamente ambas proteínas en forma pura.

### 5) Estructuras secundarias

- Predicción bioinformática

Previo a la utilización de la técnica de Dicroísmo Circular (DC) se realizó una predicción bioinformática de las estructuras tridimensionales de MerRG-HTH y BA40 a partir de sus secuencias primarias, a fin de luego poder utilizar dicha predicción para compararla con los resultados experimentales. Uno de los servidores más utilizados para esto es el sistema Jpred. Esta predicción arrojó valores de 38 % de  $\alpha$ -hélice y 3 % de hoja- $\beta$  para MerRG-HTH; de 57 %  $\alpha$ -hélice y 2 % hoja- $\beta$  para BA40; y de 47 %  $\alpha$ -hélice y 2 % hoja- $\beta$  para BA40- $\Delta$ H5 (Figura 26 y Tabla V).



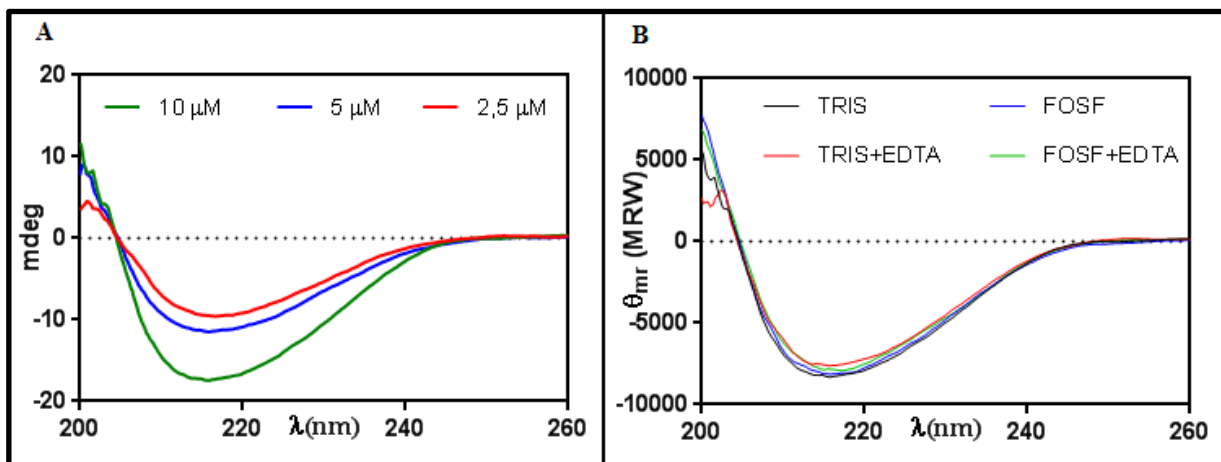
**Figura 26.** Predicción de estructura secundaria de BA40, BA40- $\Delta$ H5 y MerRG-HTH con His6-Tag realizada mediante servidor on-line Jpred. Las letras “H” rojas indican residuos conformando alfa-hélices y las “E” verdes, láminas beta. La línea roja en la secuencia de MerRG-HTH indica la separación entre el tag de histidinas y la MerRG-HTH.

- Dicroísmo circular

Para estudiar las estructuras secundarias de las proteínas, se utilizó la técnica de dicroísmo circular (DC), midiendo el espectro característico en el UV lejano (200-260nm). Teniendo en cuenta que los dominios HTH poseen una estructura predominantemente  $\alpha$ -hélice (ver figura 6), es seguro asumir que estas demuestran un espectro de DC con las características asociadas a las  $\alpha$ -hélice (ver figura 14).

Se hizo un espectro de DC de MerRG-HTH a 20 °C con una concentración de 5  $\mu$ M, observándose en él un único mínimo a 216 nm. Esto es característico de proteínas con una estructura mayoritaria de hoja- $\beta$ , contrario a lo esperado para esta proteína. Luego se

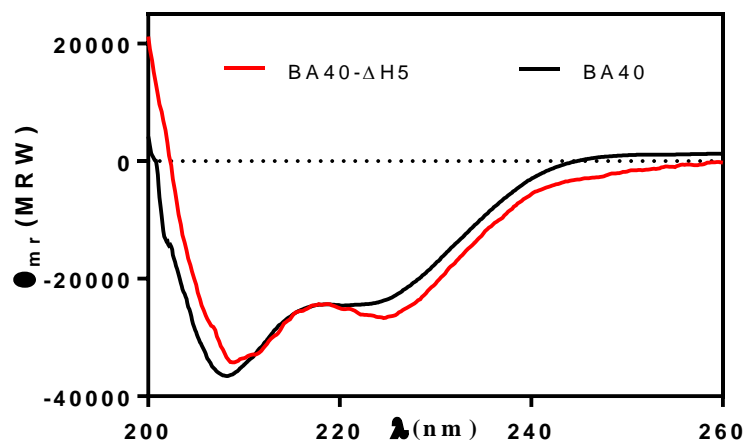
realizaron 2 espectros adicionales a 10 y 2,5  $\mu\text{M}$ , para analizar si existe un desplazamiento del dímero al monómero con el cambio de concentración, lo cual, en algunos casos, puede observarse como un cambio en la forma del espectro obtenido. Además se realizaron espectros a 10  $\mu\text{M}$  y variando el buffer utilizado, buffer Fosfato y Tris con y sin EDTA, para determinar si esto afecta al espectro observado y verificar si la formación del dímero se debe a una coordinación con metales (Figura 27).



**Figura 27. A.** Comparación de espectros de dicroísmo circular de MerRG-HTH a 20 °C a 10, 5 y 2,5  $\mu\text{M}$ . **B.** Comparación de espectros de dicroísmo circular de MerRG-HTH con buffer Tris, Tris con agregado de EDTA, buffer fosfato y fosfato con agregado de EDTA.

En la figura 27, puede observarse que una modificación en la concentración de la proteína no genera cambios en la forma de la proteína, como tampoco así lo hace la utilización de distintos buffers.

Se realizaron espectros de DC a 20 °C de BA40 y BA40- $\Delta\text{H5}$  a fin de determinar su estructura secundaria (Figura 28).



**Figura 28.** Espectro de Dicroísmo circular de BA40 y BA40- $\Delta$ H5 a 20 °C.

De acuerdo a lo observado en la figura 28 (y nuevamente comparando con los estándares), puede concluirse que BA40 y BA40- $\Delta$ H5 adoptan un perfil predominantemente de  $\alpha$ -hélice, con su primer mínimo en 208 nm y su segundo mínimo en 222 nm para BA40 y un primer mínimo en 210 nm y un segundo mínimo en 225 nm para BA40- $\Delta$ H5. Se observa que BA40 tiene un ligero desplazamiento hacia abajo en la cercanía al primer mínimo, respecto a BA40- $\Delta$ H5. Este desplazamiento puede ocurrir debido a la presencia del  $\alpha$ -hélice C-terminal, ausente en BA40- $\Delta$ H5, la cual tiene una estructura predicha más flexible y despegada que el resto de la proteína, aportando al espectro una parte similar al estándar para proteínas de conformación aleatoria, las cuales presentan un marcado decrecimiento en longitudes de onda menores a 210 nm (Kelly et al., 2005).

El análisis de los datos obtenidos mediante el programa online DichroWeb, con la configuración K2d, permitieron asociar un valor numérica a lo ya observado visualmente. Es importante tener en cuenta que dichos datos son estimaciones que sirven, principalmente, para observar cuales son las estructuras predominantes en una proteína, y que el método no brinda información estructural precisa por si solo (Tabla V).

	$\alpha$ -hélice (%)		Hoja- $\beta$ (%)		Desordenado (%)	
	DichroWeb	Jpred	DichroWeb	Jpred	DichroWeb	Jpred
MerRG-HTH	28	38	23	3	49	59
BA40	71	57	3	2	26	41
BA40- $\Delta$ H5	89	47	0	2	11	51

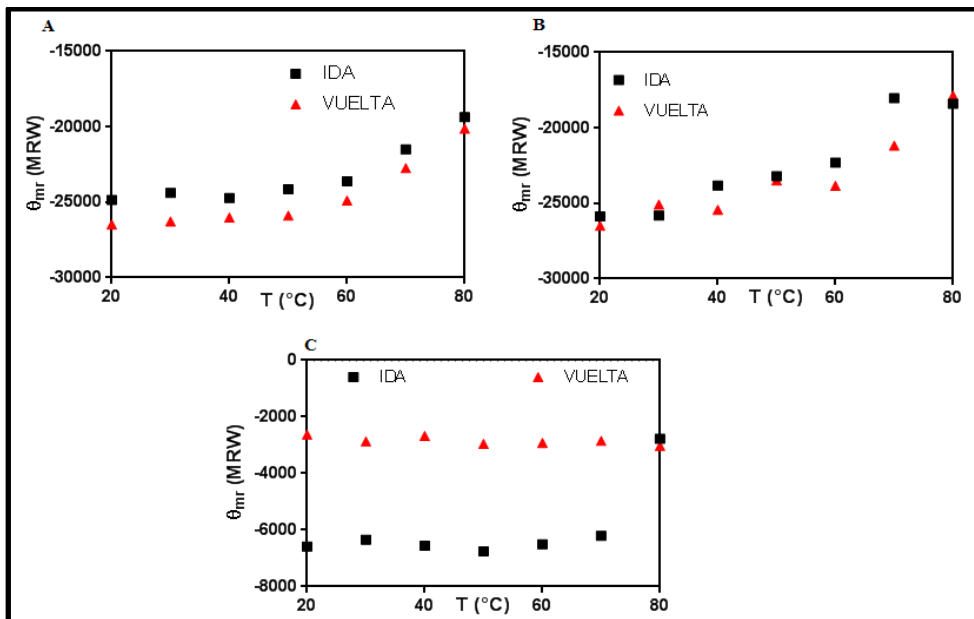
**Tabla V.** Tabla comparativa de valores predichos por Jpred y obtenidos mediante análisis de los espectros de DC por DichroWeb.

Una comparación de los porcentajes calculados nos permite observar que para BA40 y BA40- $\Delta$ H5 coincide un perfil en el que predominan las  $\alpha$ -hélice de acuerdo a ambas predicciones, lo cual se condice, además, con la presencia de un dominio de tipo HTH. Por otro lado, en el caso de MerRG-HTH, DichroWeb predice una estructura mayormente desordenada, con un contenido elevado de hojas- $\beta$  y  $\alpha$ -hélice, lo cual no coincide con la predicción de Jpred ni las estructuras ya resueltas de proteínas homólogas de la familia MerR (Jost et al., 2015).

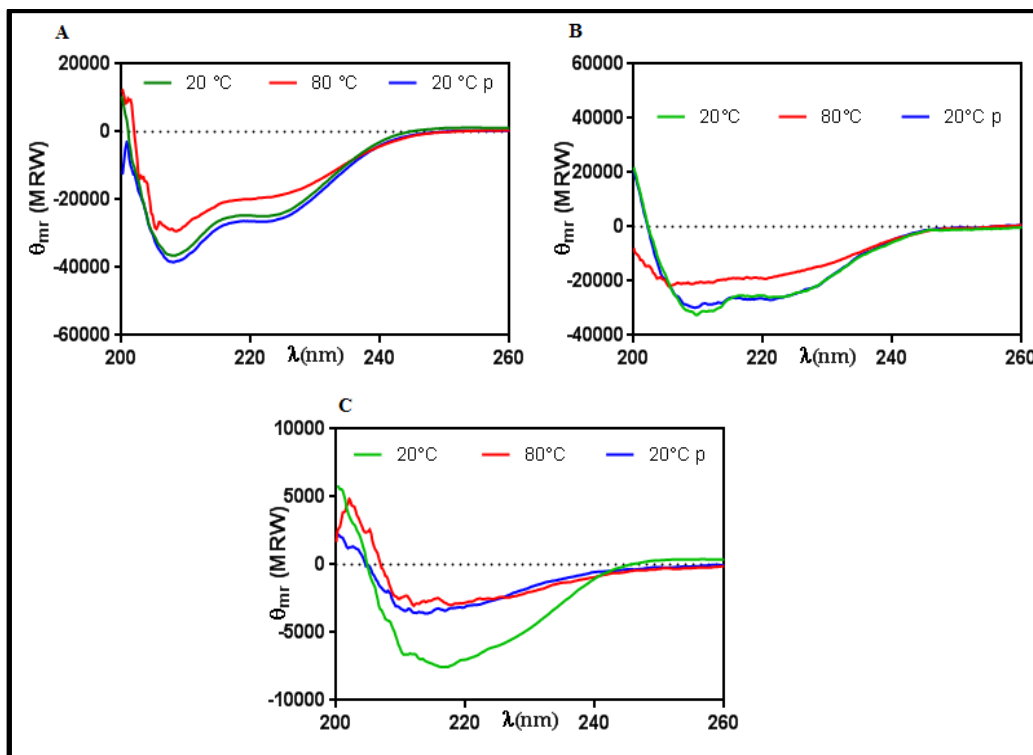
- Termodesnaturalización

El análisis del espectro de dicroísmo circular de una proteína dada durante procesos de desnaturalización térmica, permite observar los cambios en la estructura secundaria de la misma. Gracias a esto, es posible sacar valiosas conclusiones sobre su termo-estabilidad y la reversibilidad de su desnaturalización.

Se analizó la termodesnaturalización de las proteínas, yendo desde 20 °C como temperatura inicial, hasta 80 °C (“ida”), y luego volviendo desde 80 °C a 20°C (“vuelta”), para evaluar la reversibilidad (Figura 29). Estos cambios de temperatura se efectuaron mediante una “rampa” de 2 °C/min, ya que un cambio brusco de temperatura puede favorecer la agregación de proteínas. También se realizaron espectros completos al inicio de estas desnaturalizaciones, cuando se alcanzaron los 80 °C y luego de vuelta en 20°C, a fin de observar el cambio en los espectros, y por lo tanto en las estructuras secundarias (Figura 30).



**Figura 29.** A. Espectro de termodesnaturalización de BA40, medido a 222 nm. B. Espectro de termodesnaturalización de BA40- $\Delta$ H5, medido a 222 nm. C. Espectro de termodesnaturalización de MerRG-HTH, medido a 222 nm.



**Figura 30.** A. Espectros de DC de BA40 antes de la termodesnaturalización, a 80 °C y de vuelta en 20 °C (20°C p). B. Espectros de DC de BA40- $\Delta$ H5, mismas condiciones que en "A". C. Espectros de DC de MerRG-HTH, mismas condiciones que en "A" y "B".

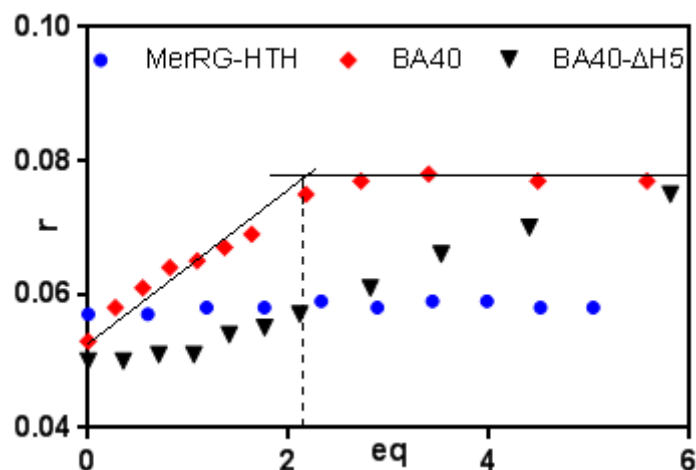


Puede observarse en las figuras 29 y 30 que BA40, tanto en su forma completa como en su forma truncada, es una proteína termoresistente de desnaturalización reversible, ya que no presenta mayores cambios en el espectro antes y después del tratamiento térmico. Puede observarse en todos los casos un desplazamiento de la curva 20 °C luego de la termodesnaturalización respecto al espectro de 20 °C inicial. Esto se debe a una pérdida de concentración por agregación de las proteínas. Es importante destacar que la mayoría de las proteínas de *B. argentinensis* estudiadas hasta la fecha en el laboratorio de RMN de FIL son también termoresistentes y de desnaturalización reversible.

Por otro lado, la termodesnaturalización de MerRG-HTH parece ser irreversible, alterando completamente el espectro de DC luego de la desnaturalización.

### 6) Anisotropía de Fluorescencia

La interacción con ADN fue analizada mediante la medición de anisotropía de fluorescencia de moléculas de ADN, marcadas con fluoresceína, con el agregado sucesivo de las proteínas. En todos los casos se utilizó una solución de 250 µl con 200 nM de ADN marcado, a la cual fueron agregadas las soluciones proteicas correspondientes. La cantidad de proteína fue convertida en equivalentes para la adecuada comparación de valores entre ellos (Figura 31).



**Figura 31.** Curvas de anisotropía de fluorescencia de BA40, BA40-ΔH5 y MerRG-HTH.

Puede observarse en la figura cómo el agregado de BA40 y de BA40-ΔH5 incrementan la anisotropía, por lo cual, según la ecuación de Perrin (3), puede deducirse la interacción de la misma con el ADN fluorescente. Por otro lado, el agregado de MerRG-HTH

no genera un incremento en la anisotropía del ADN, por lo cual, si bien se trata de una medición indirecta de interacción, no hay evidencia de que MerRG-HTH interactúe con el ADN.

La interacción de BA40 con el ADN se corresponde a una reacción de estequiometría 2 (indicado por la curva de saturación generada en el gráfico). Es posible que el dímero se forme al reconocer el ADN. Esta hipótesis será un futuro objeto de estudio en el laboratorio.

En el caso de BA40- $\Delta$ H5, puede observarse un incremento en la anisotropía, pero con una afinidad menor a BA40 completa, lo cual permite concluir que el extremo C-terminal faltante en la proteína resulta de gran importancia en la interacción con el ADN de BA40.

## 7) Espectrometría de masa

Si bien la falta de interacción del constructo con el ADN no es necesariamente indicador de que no se trate en efecto de MerRG-HTH, ya que la interacción de la misma con el ADN puede ser dependiente de la presencia de otro dominio o de la interacción con un cofactor (Pérez-Marín et al., 2008 y Brown et al., 2003), las inconsistencias entre las predicciones y los datos indicados por los análisis de diroísmo circular y el hecho de que corra como dímero, llevaron a dudar la identidad de la proteína en sí misma, por lo que se procedió a realizar una espectrometría de masa a fin de conocer la verdadera identidad de la proteína hasta este momento analizada. Para ello fue enviada una muestra de la proteína al Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de Masa de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires. Allí se generaron espectros de MALDI-TOF en modo lineal positivo, utilizando un equipo Ultraflex II (Bruker Daltonics).

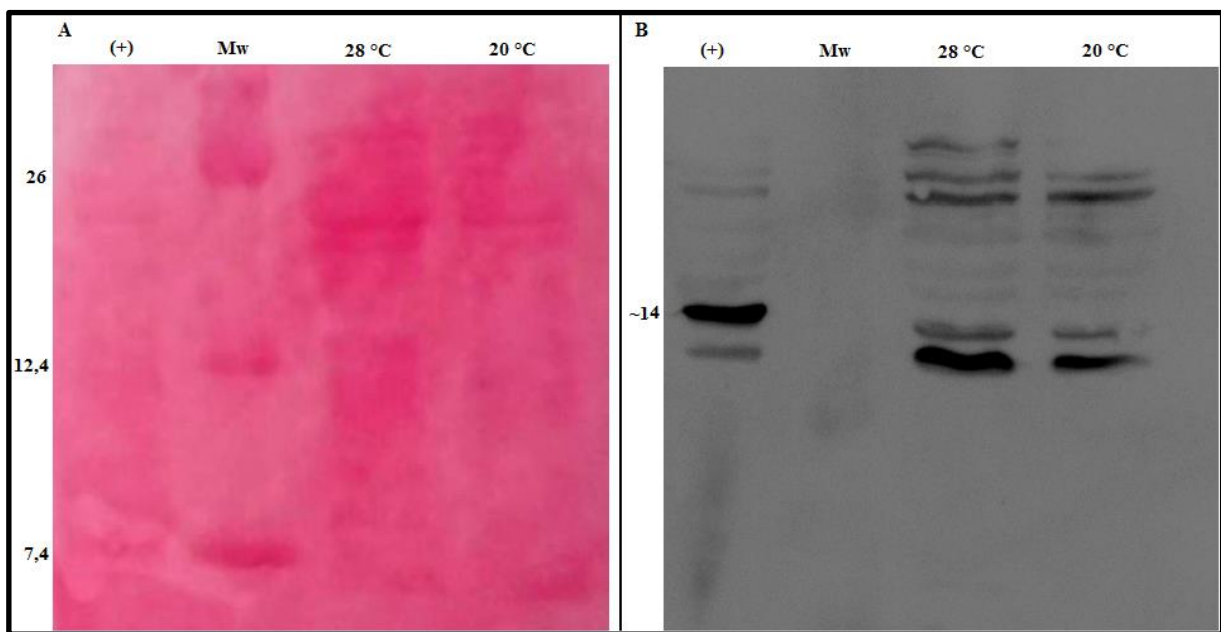
La muestra fue reducida con DTT, alquilada con iodo-acetamida y digerida con tripsina por un lado, y GluC por otro. Los fragmentos generados fueron separados por nanoHPLC e identificados por un espectrómetro de tipo Orbitrap. La ionización fue realizada por electrospray y los datos obtenidos, analizados con el programa *Proteome Discoverer*.

El análisis demostró la aparición de un pico a un m/z de alrededor de 13 kDa, de peso similar al esperado, pero con una alta identidad para proteínas nativas de *E. coli*, lo cual llevó a la conclusión que la proteína, con que se venía trabajando hasta el momento, se trataba de una proteína de *E. coli* y no de MerRG-HTH dimerizada, como se pensaba. Por esta razón fue necesario reexaminar algunas de las condiciones experimentales a fin de llegar a la raíz del problema.

### 8) Verificación de expresión de MerRG-HTH

Dado que el experimento de espectrometría de masa reveló que la proteína analizada hasta el momento no se trataba de MerRG-HTH decidió realizarse un nuevo test de expresión de la proteína. Para esto volvió a realizarse una transformación de BL21-DE3 competentes, mediante shock-térmico, con el plásmido secuenciado generado por el sistema Gateway® y se realizaron cultivos a 20 y 28 °C tras la inoculación con IPTG. Al no observarse una banda de sobre expresión a 12,4 kDa, se llevó a cabo un Western Blot para verificar que MerRG-HTH estuviera siendo expresada.

El Western Blot fue hecho a partir de un gel sembrado con el producto soluble de los cultivos incubados a 20 °C y 28 °C tras ser inoculados con IPTG, utilizando un anticuerpo anti-His6-Tag y un control positivo de, aproximadamente, 14 kDa. (Figura 32).



**Figura 32. A:** Membrana de nitrocelulosa de western blot, teñida con rojo ponceau. (+): Control positivo realizado con una proteína de peso conocido (~14 kDa) que contiene His6-Tag; Mw: marcador de peso molecular fabricado en el laboratorio (ANEXO D); 28°C: fracción soluble de lisado de un cultivo de BL21-HTH realizado a 28 °C; 20°C: fracción soluble de lisado de un cultivo de BL21-HTH realizado a 20 °C. **B:** placa revelada con utilización de anticuerpo anti His6-Tag.

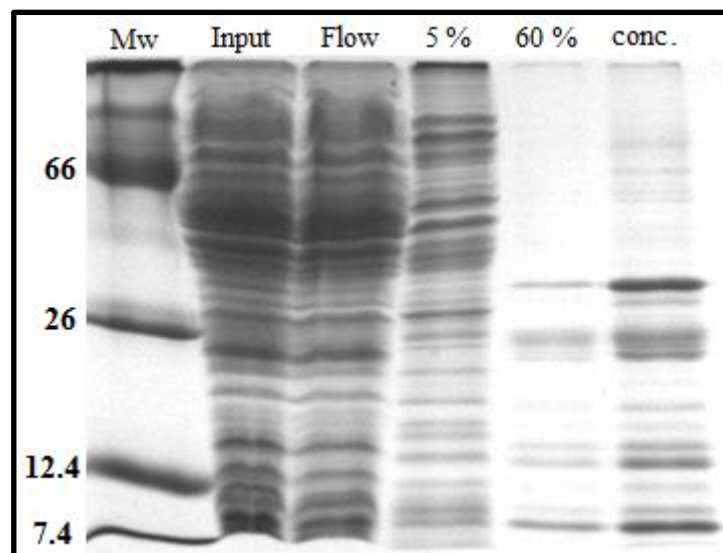
Puede observarse en el western blot, una banda indicando una clara expresión en el de una proteína con His6-Tag tanto a 20 como a 28°C, con mayor expresión en esta última. Esto demuestra que, si bien no puede observarse en la figura 19 evidencia de una clara sobreexpresión de la proteína, esta se encuentra siendo expresada por la cepa recombinante.

Resulta importante destacar que, en el caso de BA40, se observó la misma baja expresión de la proteína en las cepas productoras de *E. coli* generadas en el laboratorio cuando el protocolo de purificación fue puesto a punto (Pellizza, 2017).

Por estas razones, se decidió cambiar las condiciones del protocolo de purificación para MerRG-HTH.

### 9) Segundo protocolo de purificación de MerRG-HTH

Se realizó una nueva tanda de expresión y purificación de MerRG-HTH, esta vez realizando el cultivo a 28 °C luego de la inducción con IPTG, y con una cromatografía por gradiente utilizando un equipo de FPLC con IMAC. Se recolectaron fracciones del FPLC y sembraron en un SDS-PAGE para verificar la identidad de las mismas (Figura 33).

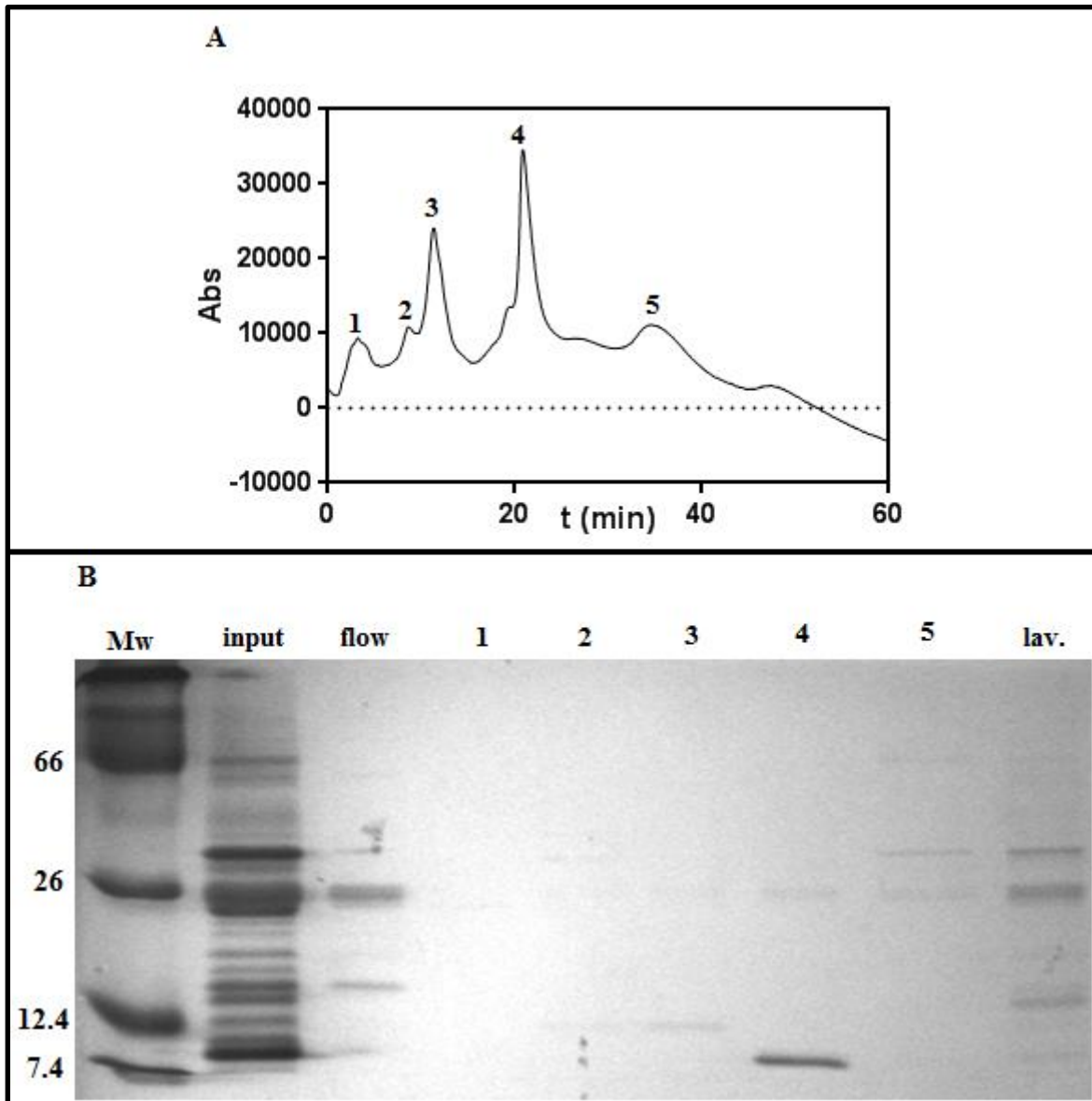


**Figura 33.** Gel de purificación de MerRG-HTH a partir de cultivo realizado a 20 °C. El marcador molecular utilizado fue armado en el laboratorio. Input: solución inyectada en la columna; Flow: solución que eluye únicamente con buffer A; 5 %: solución eluida a aproximadamente 5 % de buffer B; 60 %: pico observado a aproximadamente 60 % de concentración de buffer B; conc.: concentrado del pico obtenido a 60 % de B.

Como puede observarse en la figura 33, la proteína no es extraída de forma pura durante el FPLC con IMAC, por lo que la purificación se continúa a partir del producto eluido a 60% de buffer B.

Ya que la proteína tiene un pI básico de 9,9, característica que se mantiene en los factores de transcripción debido a su interacción con el ADN, se seleccionó, para continuar la purificación, una columna de intercambio iónico de tipo MonoS, realizando un

gradiente de una hora desde Buffer C (buffer fosfato 25 mM, NaCl 0,1 M a pH 7) hasta 100 % de un Buffer D (buffer fosfato 25 mM, NaCl 1,5 M a pH 7) (Figura 34).

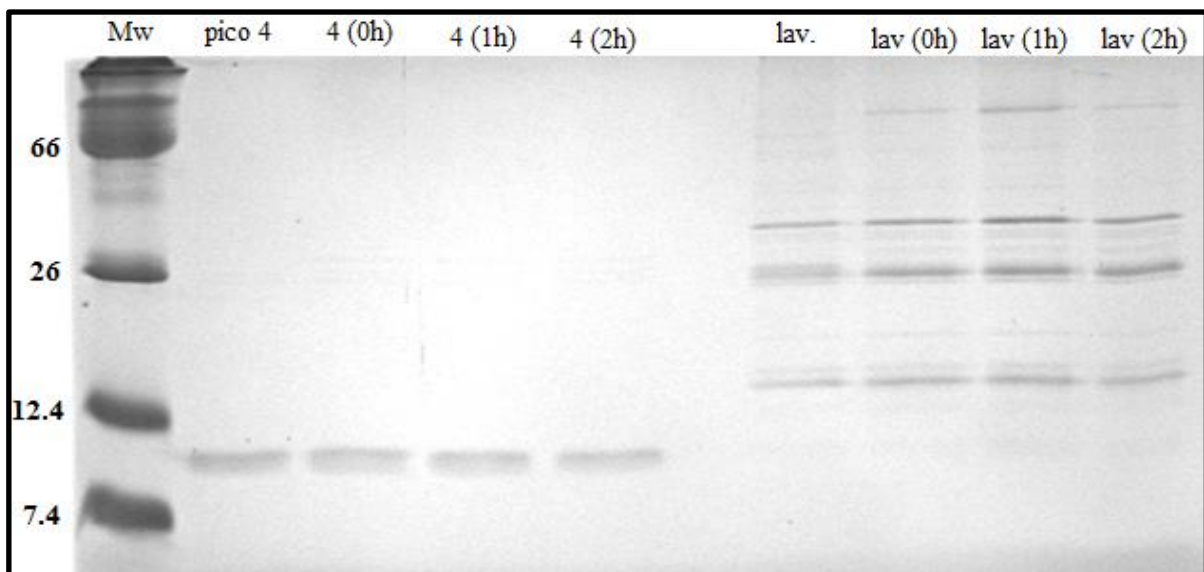


**Figura 34. A.** Corrida de columna MonoS en FPLC, el tiempo está representado en minutos y están marcados en el gráfico los picos de absorbancia que corresponderían a proteínas. **B.** Gel SDS-PAGE los picos obtenidos en el FPLC con columna MonoS. Se sembraron en él un marcador de peso molecular fabricado en el laboratorio (Mw), el producto proteico sembrado en la columna (input), el “flowthrough” (flow), cada uno de los picos obtenidos (1-5) y el eluido de un lavado realizado a 2 M (lav.).

Dos de los picos obtenidos eran candidatos para contener a MerRG-HTH en ellos: el pico 3, de ~12,4 kDa, y el pico 4, de ~9 kDa, el tamaño de MerRG-HTH sin el His6-Tag. Es posible que MerRG-HTH haya perdido el His6-Tag, y quizás parte de la proteína, durante la

purificación, ya que posee una larga región desestructurada en su extremo N-terminal (Figura 26), la cual es un blanco para proteasas. Otra posibilidad es que la proteína se encuentre en el lavado de la columna, por haber quedado retenida en ella. Se llevó a cabo entonces, una prueba de corte con la proteasa TEV de los picos 3 y 4, y del lavado con 2 M de NaCl, luego de concentrar al pico 3 y al lavado con centrífuga. La concentración del pico 3 demostró que la concentración de la proteína era demasiado baja, que se producía un agregado en la solución y que la proteína no se encontraba en estado puro, sino que contaba con contaminaciones de más alto peso molecular.

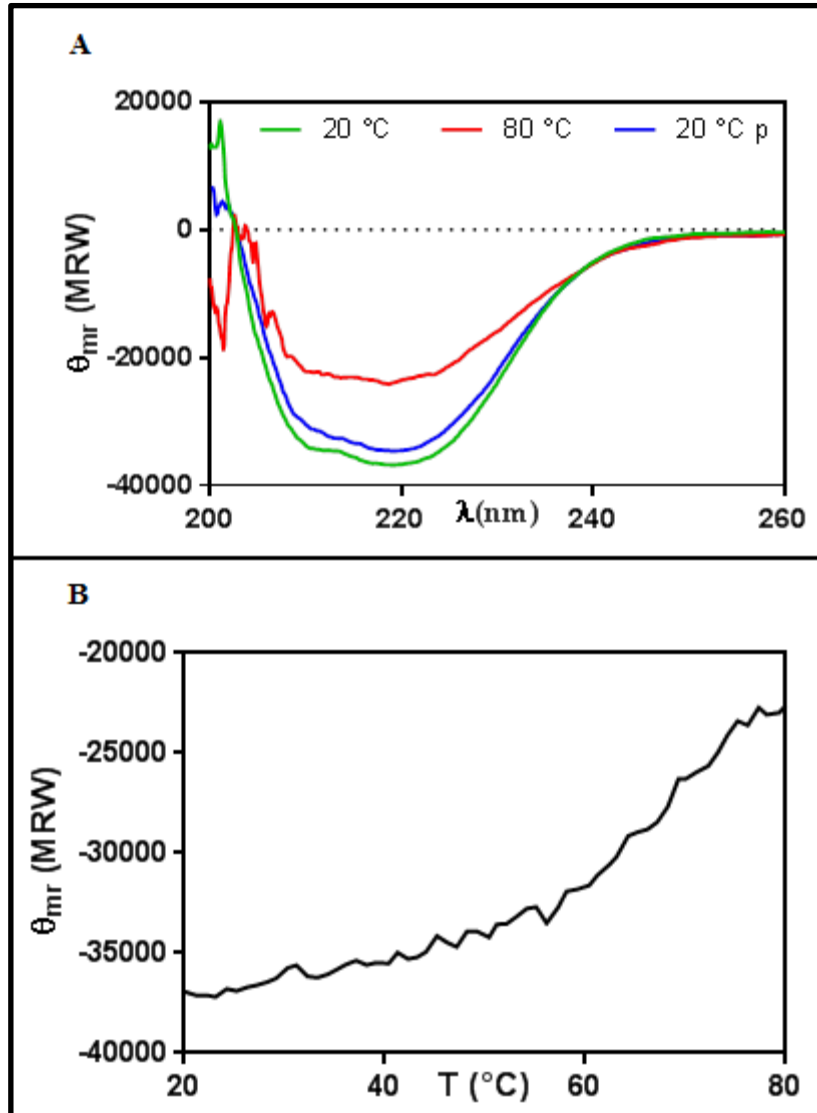
Se realizaron soluciones de 100 µl de cada pico, con una relación 1 µg de TEV por cada 30 µg de proteína (medido en nanodrop) y 2 mM de DTT, según el protocolo puesto a punto con anterioridad en el laboratorio para BA40. Se tomaron y congelaron 30 µl de estas soluciones a las 0, 1 y 2 horas de iniciado el corte. Las muestras obtenidas fueron sembradas en un SDS-PAGE 17% (Figura 35).



**Figura 35.** SDS-PAGE de ensayo de corte con TEV de picos 4 y lavado a partir de columna MonoS. “Pico 4” y “lav.” son las soluciones proteicas como fueron obtenidas de la columna, sin el agregado de TEV. Entre paréntesis está indicado el tiempo que TEV estuvo cortando antes de detenerse la reacción congelando la muestra.

La proteasa TEV no cortó a ninguna proteína presente en el lavado, ni en los picos 3 ni 4. Sin embargo, esto no descartaba la hipótesis que el pico 4 sea la MerRG-HTH sin el His6-Tag, por lo que se decidió realizar un espectro de DC y una termodesnaturalización de la

proteína, a fin de obtener más información acerca de su estructura y termoestabilidad (Figura 36).



**Figura 36.** A. Espectros de DC del pico 4 obtenido de la columna MonoS. 20 °C: antes de la desnaturalización; 80°C: a 80 °C; 20 °C p: luego de la desnaturalización. B. Curva de desnaturalización del pico 4 obtenido de la columna MonoS.

Puede observarse en el espectro a 20 °C, comparando con la figura 14, la presencia de los dos mínimos característicos a una estructura mayoritariamente de tipo  $\alpha$ -hélice. Puede observarse, además, un comportamiento similar al de ambas formas de BA40 cuando la proteína es desnaturalizada, es decir, que es termoresistente y de termodesnaturalización reversible. Nuevamente se observa un desplazamiento de la curva a 20 °C luego de la termodesnaturalización debido a la agregación de proteínas.

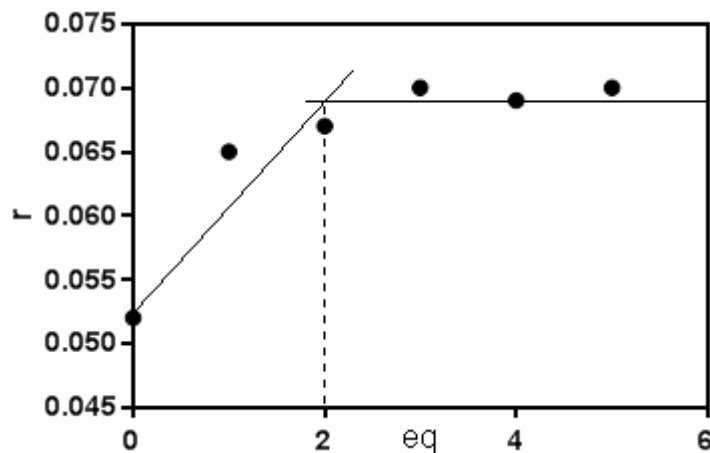
Al analizar el espectro obtenido a 20 °C por DichroWeb, se obtuvo una predicción de predominancia de  $\alpha$ -hélice en la proteína, un poco más consistente con las predicciones de estructura de MerRG-HTH (Tabla VI).

	$\alpha$ -hélice (%)		Hoja- $\beta$ (%)		Desordenado (%)	
	DichroWeb	Jpred	DichroWeb	Jpred	DichroWeb	Jpred
MerRG-HTH	100	53	0	4	0	43
		38 (tag)		3 (tag)		59 (tag)

**Tabla VI.** Comparación de valores obtenidos por Jpred para MerRG-HTH, con y sin tag, y DichroWeb para el pico 4.

Estos resultados nos llevaron a pensar que la proteína purificada en el pico 4 se trataba, efectivamente, de MerRG-HTH, la cual, por su tamaño en el gel y la falta de corte con TEV, parecería haber perdido el His6-Tag por degradación.

Con el fin de seguir analizando a la proteína, se realizó una curva exploratoria de anisotropía de fluorescencia, agregando la proteína de a un equivalente en una solución con 200 nM de ADN de secuencia aleatoria marcado con fluoresceína, para verificar si esta interactúa con el ADN (Figura 37).



**Figura 37.** Curva de anisotropía de fluorescencia de MerRG-HTH, obtenida en el pico 4 de columna MonoS.

Puede observarse interacción con el ADN por el incremento de la anisotropía de fluorescencia, así como una tendencia a formar una curva característica a una reacción de estequiometría 2, lo cual podría implicar la formación de un dímero en la interacción con el ADN, tal como se observaba en BA40.



## Conclusiones

A través del protocolo, puesto a punto en el laboratorio con anterioridad, se pudo obtener en forma soluble y con un alto grado de pureza a BA40 y BA40- $\Delta$ H5. Un análisis preliminar de la estructura secundaria de estas proteínas, mediante la técnica de Dicroísmo Circular, permitió observar en ellas, una estructura mayoritariamente de tipo  $\alpha$ -hélice, acorde a las predicciones obtenidas. Se vió, además, que estas proteínas interactuaban con el ADN de secuencia aleatoria utilizado, y, en el caso de BA40, que esta interacción parece darse en forma dimérica. El rol del  $\alpha$ -hélice del extremo C-terminal de BA40 en la dimerización, así como la región diana de este factor, son motivo de estudio en el laboratorio en la actualidad.

Se realizaron exitosamente las construcciones MerRG-HTH, utilizada en este trabajo, y MerRG-B12, la cual será estudiada a futuro en el laboratorio. Se logró conseguir la expresión de MerRG-HTH y se puso a punto un protocolo de purificación inicial. La identidad de la proteína será verificada con una espectrometría de masa.

En las condiciones analizadas, la proteína no presenta un nivel de expresión elevado respecto a proteínas nativas de *E. coli*. Queda aún realizar ensayos en distintos medios ricos para intentar encontrar el ideal para la sobre-expresión de MerRG-HTH.

Durante la puesta a punto del protocolo de purificación de MerRG-HTH, se observó una posible degradación del His6-Tag, y quizás parte de la proteína. Esta degradación será confirmada mediante el método de espectrometría de masa a través de un análisis de huella peptídica. Esto podría ocurrir debido a que el extremo N-terminal del constructo es altamente desestructurado, y, por lo tanto, resulta vulnerable a la degradación por proteasas. Algo similar a esto fue observado en el laboratorio durante la puesta a punto del protocolo de purificación de BA40 y BA40- $\Delta$ H5, en la cual se observaba una región flexible y lábil a degradación en su extremo C-terminal. Por esto, deberán realizarse los nuevos ensayos con diversos cocteles de inhibidores de proteasas, para intentar evitar la degradación del His6-Tag de MerRG-HTH.

Un análisis preliminar de la estructura secundaria de MerRG-HTH, por medio de Dicroísmo circular, permitió reconocer una estructura predominantemente de tipo  $\alpha$ -hélice, acorde a las predicciones para dicha proteína. Además, un estudio exploratorio de interacción con el ADN mediante la técnica de anisotropía de fluorescencia, utilizando ADN de secuencia

aleatoria unido a fluoresceína, demostró que esta interactúa con el ADN en las condiciones estudiadas.

Los estudios de termodesnaturalización realizados en este trabajo, arrojaron resultados indicando la termoestabilidad y reversibilidad de todas las proteínas abordadas. Dichas características ya habían sido registradas en la mayoría de las proteínas de *B. argentinensis* trabajadas en el laboratorio. Este tipo de características, posiblemente, estén asociadas de alguna forma a los mecanismos estructurales de adaptación al frío. Este fenómeno es un tema de estudio en el laboratorio en la actualidad, y la evidencia obtenida en este trabajo puede aportar información relevante para ello.

La proteína MerR-G posee una alta homología, tanto en secuencia como en arquitectura de dominios, con CarH y CarA. Estas proteínas son factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de  $\beta$ -carotenos en un proceso regulado por la luz y dependiente del cofactor B12 en el caso de CarH (Jost et al., 2015; Pérez-Marín et al., 2008). Debido a la intensa pigmentación de *B. argentinensis*, es seguro asumir que el operón responsable de esta biosíntesis es uno con gran actividad en la célula. Se desconoce la forma en que MerR-G participa en la síntesis de carotenoides en *B. argentinensis*, lo que la convierte en una proteína de gran interés para continuar siendo estudiada en el laboratorio.

## Perspectivas futuras

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se continuará estudiando la familia de proteínas MerR de *B. argentinensis*. Se planea realizar ensayos de interacción de MerR-G con el ADN diana, como así también estudios de función y dinámica estructural mediante experimentos de RMN. En el laboratorio se están realizando en la actualidad protocolos de trabajo in vivo con *B. argentinensis*, para poder caracterizar de esta forma las vías de regulación en que participan los factores de transcripción estudiados en este trabajo.

La información obtenida en el presente trabajo sobre la interacción de la BA40 con el ADN, así como el aparente rol del  $\alpha$ -hélice ausente en BA40- $\Delta$ H5 en esta unión, serán motivo de estudio en el laboratorio en el futuro, junto con la aún desconocida región diana de este factor.

Se realizarán a futuro nuevos ensayos de expresión de MerRG-HTH, utilizando diferentes medios ricos y cocteles de inhibidores de proteasas, a fin de intentar lograr una

correcta sobreexpresión de la construcción y de evitar la degradación del His6-Tag durante la purificación.

Los resultados obtenidos respecto a la termoestabilidad y reversibilidad de la desnaturalización de ambos factores de transcripción estudiados brindarán información de gran relevancia para los estudios, que actualmente se realizan en el laboratorio, sobre la predominancia de estas características en las proteínas de *B. argentinensis* estudiadas hasta la fecha.

## Bibliografía

AMARAL-ZETTLER, Linda, ARTIGAS, Luis Felipe, BAROSS, John, P.A, Loka Bharathi, BOETIUS, Antje, CHANDRAMOHAN, Dorairajasingam, HERNDL, Gerhard, KOGURE, Kazuhiro, NEAL, Phillip, PEDRÓS-ALIÓ, Carlos, RAMETTE, Alban, SCHOUTEN, Stefan, STAL, Lucas, THESSSEN, Anne, LEEUW, Jan de and SOGIN, Mitchell. A Global Census of Marine Microbes. In : *Life in the World's Oceans* [online]. Wiley-Blackwell, 2010. p. 221–245. [Accessed 30 April 2018]. ISBN 978-1-4443-2550-8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781444325508.ch12>

ARAN, Martín, SMAL, Clara, PELLIZZA, Leonardo, GALLO, Mariana, OTERO, Lisandro H., KLINKE, Sebastián, GOLDBAUM, Fernando A., ITHURRALDE, Esteban R., BERCOVICH, Andrés, MAC CORMACK, Walter P., TURJANSKI, Adrián G. and CICERO, Daniel O. Solution and crystal structure of BA42, a protein from the Antarctic bacterium *Bizionia argentinensis* comprised of a stand-alone TPM domain. *Proteins*. November 2014. Vol. 82, no. 11, p. 3062–3078. DOI 10.1002/prot.24667.

ARAVIND, L., ANANTHARAMAN, Vivek, BALAJI, Santhanam, BABU, M. Mohan and IYER, Lakshminarayan M. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS microbiology reviews*. April 2005. Vol. 29, no. 2, p. 231–262. DOI 10.1016/j.femsre.2004.12.008.

BAKERMANS, Corien. Limits for Microbial Life at Subzero Temperatures. In : *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* [online]. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 17–28. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-3-540-74334-7. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74335-4\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74335-4_2)

BERCOVICH, Andrés, VAZQUEZ, Susana C., YANKILEVICH, Patricio, CORIA, Silvia H., FOTI, Marcelo, HERNÁNDEZ, Edgardo, VIDAL, Alejandro, RUBERTO, Lucas, MELO, Carlos, MARENSSI, Sergio, CRISCUOLO, Marcelo, MEMOLI, Mariano, ARGUELLES, Marcelo and MAC CORMACK, Walter P. *Bizionia argentinensis* sp. nov., isolated from surface marine water in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. October 2008. Vol. 58, no. Pt 10, p. 2363–2367. DOI 10.1099/ijs.0.65599-0.

BERNARD, P., GABANT, P., BAHASSI, E. M. and COUTURIER, M. Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene*. 11 October 1994. Vol. 148, no. 1, p. 71–74.

BEROVA, Nina, DI BARI, Lorenzo and PESCIPELLI, Gennaro. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chemical Society Reviews*. June 2007. Vol. 36, no. 6, p. 914–931. DOI 10.1039/b515476f.

BIRCH, David J. S. and YIP, Philip. Nanometrology. In : *Fluorescence Spectroscopy and Microscopy* [online]. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 279–302. Methods in Molecular Biology. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-1-62703-648-1. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-649-8\\_11](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-649-8_11)

BORNHORST, J. A. and FALKE, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity

tags. *Methods in Enzymology*. 2000. Vol. 326, p. 245–254.

BOWMAN, John P. The Marine Clade of the Family Flavobacteriaceae: The Genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*. In : *The Prokaryotes* [online]. Springer, New York, NY, 2006. p. 677–694. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-0-387-25497-5. Available from: [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30747-8\\_26](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30747-8_26)

BOYER RODNEY. Spectroscopy for the biological sciences: Hammes, G. G. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 3 November 2006. Vol. 34, no. 2, p. 161b – 162. DOI 10.1002/bmb.2006.49403402161.

BROWN, Nigel L., STOYANOV, Jivko V., KIDD, Stephen P. and HOBMAN, Jon L. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS microbiology reviews*. June 2003. Vol. 27, no. 2–3, p. 145–163.

BURGESS, Elizabeth A., WAGNER, Isaac D. and WIEGEL, Juergen. Thermal Environments and Biodiversity. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. 1 January 2007. P. 13–29. DOI 10.1128/9781555815813.ch2.

BUSHMAN, Wade, THOMPSON, John F, VARGAS, Lina and LANDY, Arthur. Control of Directionality in Lambda Site Specific Recombination. *Science (New York, N.Y.)*. 22 November 1985. Vol. 230, no. 4728, p. 906–911.

CARRINGTON, J. C. and DOUGHERTY, W. G. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology*. August 1987. Vol. 61, no. 8, p. 2540–2548.

CARRINGTON, J. C. and DOUGHERTY, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. May 1988. Vol. 85, no. 10, p. 3391–3395.

CARTER, Paul. Site-Specific Proteolysis of Fusion Proteins. In : *Protein Purification* [online]. American Chemical Society, 1990. p. 181–193. ACS Symposium Series, 427. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-0-8412-1790-4. Available from: <https://doi.org/10.1021/bk-1990-0427.ch013>

CERUTTI, M. L., OTERO, L. H., SMAL, C., PELLIZZA, L., GOLDBAUM, F. A., KLINKE, S. and ARAN, M. Structural and functional characterization of a cold adapted TPM-domain with ATPase/ADPase activity. *J. Struct. Biol.* 2017. Vol. 197, p. 201–209. DOI 10.2210/pdb5anp/pdb.

CHURCH, Matthew J. Resource Control of Bacterial Dynamics in the Sea. In : *Microbial Ecology of the Oceans* [online]. Wiley-Blackwell, 2008. p. 335–382. [Accessed 27 April 2018]. ISBN 978-0-470-28184-0. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470281840.ch10>

COHEN, S. N., CHANG, A. C., BOYER, H. W. and HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. November 1973. Vol. 70, no. 11, p. 3240–3244.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 25 November 1988. Vol. 16, no. 22, p. 10881–10890.

COTTRELL, M. T. and KIRCHMAN, D. L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*. April 2000. Vol. 66, no. 4, p. 1692–1697.

DELONG EDWARD F., FRANKS DIANA G. and ALLDREDGE ALICE L. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography*. 22 December 2003. Vol. 38, no. 5, p. 924–934.  
DOI 10.4319/lo.1993.38.5.0924.

DOUGHERTY, W. G. and PARKS, T. D. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*. August 1991. Vol. 183, no. 2, p. 449–456.

DROZDETSKIY, Alexey, COLE, Christian, PROCTER, James and BARTON, Geoffrey J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*. 1 July 2015. Vol. 43, no. W1, p. W389–W394. DOI 10.1093/nar/gkv332.

FASMAN, Gerald D. Differentiation between Transmembrane Helices and Peripheral Helices by the Deconvolution of Circular Dichroism Spectra of Membrane Proteins. In : *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* [online]. Springer, Boston, MA, 1996. p. 381–412. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-1-4419-3249-5. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2508-7\\_10](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2508-7_10)

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, Beatriz, RICHTER, Michael, SCHÜLER, Margarete, PINHASSI, Jarone, ACINAS, Silvia G., GONZÁLEZ, José M. and PEDRÓS-ALIÓ, Carlos. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *The ISME Journal*. May 2013. Vol. 7, no. 5, p. 1026–1037. DOI 10.1038/ismej.2012.169.

FISHER, S. H. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Molecular Microbiology*. April 1999. Vol. 32, no. 2, p. 223–232.

FISHER, Susan H. and WRAY, Lewis V. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase regulates its own synthesis by acting as a chaperone to stabilize GlnR–DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 22 January 2008. Vol. 105, no. 3, p. 1014–1019. DOI 10.1073/pnas.0709949105.

GALPERIN, Michael Y., MAKAROVA, Kira S., WOLF, Yuri I. and KOONIN, Eugene V. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG

database. *Nucleic Acids Research*. January 2015. Vol. 43, no. Database issue, p. D261-269. DOI 10.1093/nar/gku1223.

GERDAY, C., AITTALEB, M., BENTAHIR, M., CHESSA, J. P., CLAVERIE, P., COLLINS, T., D'AMICO, S., DUMONT, J., GARSOUX, G., GEORLETTE, D., HOYOUX, A., LONHIENNE, T., MEUWIS, M. A. and FELLER, G. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*. March 2000. Vol. 18, no. 3, p. 103–107.

GODSEY, Michael H., HELDWEIN, Ekaterina E. Zheleznova and BRENNAN, Richard G. Structural Biology of Bacterial Multidrug Resistance Gene Regulators. *Journal of Biological Chemistry*. 25 October 2002. Vol. 277, no. 43, p. 40169–40172. DOI 10.1074/jbc.R200018200.

GONZÁLEZ, José M., FERNÁNDEZ-GÓMEZ, Beatriz, FERNÁNDEZ-GUERRA, Antoni, GÓMEZ-CONSARNAU, Laura, SÁNCHEZ, Olga, COLL-LLADÓ, Montserrat, DEL CAMPO, Javier, ESCUDERO, Lorena, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Raquel, ALONSO-SÁEZ, Laura, LATASA, Mikel, PAULSEN, Ian, NEDASHKOVSKAYA, Olga, LEKUNBERRI, Itziar, PINHASSI, Jarone and PEDRÓS-ALIÓ, Carlos. Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 24 June 2008. Vol. 105, no. 25, p. 8724–8729. DOI 10.1073/pnas.0712027105.

HAMMES G. Fundamentals of Spectroscopy. In : *Spectroscopy for the Biological Sciences* [online]. 2005. p. 1–15. Wiley Online Books. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-0-471-73355-3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471733555.ch1>

HARTLEY, J. L., TEMPLE, G. F. and BRASCH, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*. November 2000. Vol. 10, no. 11, p. 1788–1795.

HAUF, Ksenia, KAYUMOV, Airat, GLOGE, Felix and FORCHHAMMER, Karl. The Molecular Basis of TnrA Control by Glutamine Synthetase in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 12 February 2016. Vol. 291, no. 7, p. 3483–3495. DOI 10.1074/jbc.M115.680991.

HEARN, M. T. and ACOSTA, D. Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. *Journal of molecular recognition: JMR*. December 2001. Vol. 14, no. 6, p. 323–369. DOI 10.1002/jmr.555.

HELDWEIN, E. E. and BRENNAN, R. G. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature*. 18 January 2001. Vol. 409, no. 6818, p. 378–382. DOI 10.1038/35053138.

HERBERT, Rod A. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends in Biotechnology*. 1 January 1992. Vol. 10, p. 395–402. DOI 10.1016/0167-7799(92)90282-Z.

ISLAS, Sara, VELASCO, Ana Marfa, BECERRA, Arturo, DELAYE, Luis and LAZCANO, Antonio. Extremophiles and the Origin of Life. *Physiology and Biochemistry of*

*Extremophiles*. 1 January 2007. P. 3–10. DOI 10.1128/9781555815813.ch1.

ITAKURA, K., HIROSE, T., CREA, R., RIGGS, A. D., HEYNEKER, H. L., BOLIVAR, F. and BOYER, H. W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science (New York, N.Y.)*. 9 December 1977. Vol. 198, no. 4321, p. 1056–1063.

JOHNSON, D. Barrie. Physiology and Ecology of Acidophilic Microorganisms. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. 1 January 2007. P. 257–270. DOI 10.1128/9781555815813.ch20.

JOST, Marco, FERNÁNDEZ-ZAPATA, Jesús, POLANCO, María Carmen, ORTIZ-GUERRERO, Juan Manuel, CHEN, Percival Yang-Ting, KANG, Gyunghoon, PADMANABHAN, S., ELÍAS-ARNANZ, Montserrat and DRENNAN, Catherine L. Structural basis for gene regulation by a B12-dependent photoreceptor. *Nature*. 22 October 2015. Vol. 526, no. 7574, p. 536–541. DOI 10.1038/nature14950.

KELLY, Sharon M., JESS, Thomas J. and PRICE, Nicholas C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 10 August 2005. Vol. 1751, no. 2, p. 119–139. DOI 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.

KIRCHMAN, David L. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS microbiology ecology*. 1 February 2002. Vol. 39, no. 2, p. 91–100. DOI 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x.

LAKOWICZ J.R. Fluorescence Anisotropy. In : *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Springer, Boston, MA, 2006. p. 353–382. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-0-387-31278-1. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-46312-4\\_10](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-46312-4_10)

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*. 1989. Vol. 58, p. 913–949. DOI 10.1146/annurev.bi.58.070189.004405.

LANZAROTTI, Esteban, PELLIZZA, Leonardo, BERCOVICH, Andres, FOTI, Marcelo, CORIA, Silvia H., VAZQUEZ, Susana C., RUBERTO, Lucas, HERNÁNDEZ, Edgardo A., DIAS, Romina L., MAC CORMACK, Walter P., CICERO, Daniel O., SMAL, Clara, NICOLAS, Marisa Fabiana, VASCONCELOS, Ana Tereza Ribeiro, MARTI, Marcelo A. and TURJANSKI, Adrian G. Draft genome sequence of *Bizionia argentinensis*, isolated from Antarctic surface water. *Journal of Bacteriology*. December 2011. Vol. 193, no. 23, p. 6797–6798. DOI 10.1128/JB.06245-11.

MCBRIDE, Mark J., XIE, Gary, MARTENS, Eric C., LAPIDUS, Alla, HENRISSAT, Bernard, RHODES, Ryan G., GOLTSMAN, Eugene, WANG, Wei, XU, Jian, HUNNICUTT, David W., STAROSCIK, Andrew M., HOOVER, Timothy R., CHENG, Yi-Qiang and STEIN, Jennifer L. Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as revealed by genome sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. November 2009. Vol. 75, no. 21, p. 6864–6875.



DOI 10.1128/AEM.01495-09.

MCBRIDE, Mark J. and ZHU, Yongtao. Gliding motility and Por secretion system genes are widespread among members of the phylum bacteroidetes. *Journal of Bacteriology*. January 2013. Vol. 195, no. 2, p. 270–278. DOI 10.1128/JB.01962-12.

NEWBERRY, Kate J. and BRENNAN, Richard G. The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. *The Journal of Biological Chemistry*. 7 May 2004. Vol. 279, no. 19, p. 20356–20362. DOI 10.1074/jbc.M400960200.

OREN, Aharon. Biodiversity in Highly Saline Environments. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. 1 January 2007. P. 223–231. DOI 10.1128/9781555815813.ch17.

ORTIZ-GUERRERO, Juan Manuel, POLANCO, María Carmen, MURILLO, Francisco J., PADMANABHAN, S. and ELÍAS-ARNANZ, Montserrat. Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 3 May 2011. Vol. 108, no. 18, p. 7565–7570. DOI 10.1073/pnas.1018972108.

OWEN, Barbara A. L., H LANG, Walter and MCMURRAY, Cynthia T. The nucleotide binding dynamics of human MSH2-MSH3 are lesion dependent. *Nature Structural & Molecular Biology*. May 2009. Vol. 16, no. 5, p. 550–557. DOI 10.1038/nsmb.1596.

PARK, K., PERCZEL, A. and FASMAN, G. D. Differentiation between transmembrane helices and peripheral helices by the deconvolution of circular dichroism spectra of membrane proteins. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. August 1992. Vol. 1, no. 8, p. 1032–1049. DOI 10.1002/pro.5560010809.

PARKS, T. D., LEUTHER, K. K., HOWARD, E. D., JOHNSTON, S. A. and DOUGHERTY, W. G. Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Analytical Biochemistry*. 1 February 1994. Vol. 216, no. 2, p. 413–417. DOI 10.1006/abio.1994.1060.

PELLIZZA, Leonardo A., SMAL, Clara, ITHURALDE, Raúl E., TURJANSKI, Adrián G., CICERO, Daniel O. and ARÁN, Martín. Structural and functional characterization of a cold-adapted stand-alone TPM domain reveals a relationship between dynamics and phosphatase activity. *The FEBS journal*. 2016. Vol. 283, no. 23, p. 4370–4385. DOI 10.1111/febs.13929.

PELLIZZA, Leonardo A. *Genómica estructural de Bizionia argentinensis: búsqueda y caracterización de proteínas activas a bajas temperaturas*. Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2017.

PÉREZ-MARÍN, Mari Cruz, PADMANABHAN, S., POLANCO, María Carmen, MURILLO, Francisco José and ELÍAS-ARNANZ, Montserrat. Vitamin B12 partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*.

*Molecular Microbiology*. February 2008. Vol. 67, no. 4, p. 804–819. DOI 10.1111/j.1365-2958.2007.06086.x.

PINHASSI, Jarone, SALA, Maria Montserrat, HAVSKUM, Harry, PETERS, Francesc, GUADAYOL, Òscar, MALITS, Andrea and MARRASÉ, Cèlia. Changes in Bacterioplankton Composition under Different Phytoplankton Regimens. *Applied and Environmental Microbiology*. November 2004. Vol. 70, no. 11, p. 6753–6766. DOI 10.1128/AEM.70.11.6753-6766.2004.

PTACHNE. *Genetic Switch. Phage Lambda and Higher Organisms (second ed.)*. Blackwell Science, 1992.

RANJBAR, Bijan and GILL, Pooria. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chemical Biology & Drug Design*. August 2009. Vol. 74, no. 2, p. 101–120. DOI 10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2, and 3. Current protocols in molecular biology. Volumes 1 and 2: By J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989). 1626 pp. \$115.00. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. New York: Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. (1989). 1120 pp. \$255.00. *Cell*. 6 April 1990. Vol. 61, no. 1, p. 17–18. DOI 10.1016/0092-8674(90)90210-6.

SCHIRALDI, Chiara and DE ROSA, Mario. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology*. December 2002. Vol. 20, no. 12, p. 515–521.

SHRIVASTAVA, Abhishek and BERG, Howard C. Towards a model for Flavobacterium gliding. *Current Opinion in Microbiology*. December 2015. Vol. 28, p. 93–97. DOI 10.1016/j.mib.2015.07.018.

SMAL, Clara, ZANZONI, Serena, D'ONOFRIO, Mariapina, MOLINARI, Henriette, CICERO, Daniel O. and ASSFALG, Michael. <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N, and <sup>13</sup>C chemical shift assignments of the C-Ala domain of the alanyl-tRNA synthetase of the psychrophilic bacterium *Bizionia argentinensis* sp. nov. *Biomolecular NMR assignments*. October 2014. Vol. 8, no. 2, p. 415–418. DOI 10.1007/s12104-013-9529-8.

VALEUR, Bernard and BERBERAN-SANTOS, Mário Nuno. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* [online]. Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-3-527-65000-2. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527650002>

VALEUR ET AL. Fluorescence Polarization. Emission Anisotropy. In : *Molecular Fluorescence* [online]. 2001. p. 125–154. Wiley Online Books. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-3-527-60024-3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600248.ch5>

WEBB, R. Lee. Circular Dichroism. Principles and Applications, Second Edition Edited by

Nina Berova, Koji Nakanishi, and Robert W. Woody. Wiley-VCH Publishers, New York. 2000. xix + 877 pp. 18.5 × 26 cm. ISBN 0 47133003 5. \$195.00. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1 March 2001. Vol. 44, no. 7, p. 1122–1122. DOI 10.1021/jm010040t.

WEISBERG, Robert A. and LANDY, Arthur. Site-specific Recombination in Phage Lambda. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*. 1 January 1983. Vol. 13, no. 0, p. 211–250. DOI 10.1101/087969150.13.211.

WETZEL, R., KLEID, D. G., CREA, R., HEYNEKER, H. L., YANSURA, D. G., HIROSE, T., KRASZEWSKI, A., RIGGS, A. D., ITAKURA, K. and GOEDDEL, D. V. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for a “mini-C” analog of human proinsulin. *Gene*. December 1981. Vol. 16, no. 1–3, p. 63–71.

WILSON, G. G. and MURRAY, N. E. Restriction and modification systems. *Annual Review of Genetics*. 1991. Vol. 25, p. 585–627. DOI 10.1146/annurev.ge.25.120191.003101.

WOODY, Robert W. Theory of Circular Dichroism of Proteins. In : *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* [online]. Springer, Boston, MA, 1996. p. 25–67. [Accessed 11 April 2018]. ISBN 978-1-4419-3249-5. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2508-7\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2508-7_2)

WRAY, Lewis V. and FISHER, Susan H. Functional Analysis of the Carboxy-Terminal Region of *Bacillus subtilis* TnrA, a MerR Family Protein. *Journal of Bacteriology*. 1 January 2007. Vol. 189, no. 1, p. 20–27. DOI 10.1128/JB.01238-06.

YARZA, Pablo, RICHTER, Michael, PEPLIES, Jörg, EUZEBY, Jean, AMANN, Rudolf, SCHLEIFER, Karl-Heinz, LUDWIG, Wolfgang, GLÖCKNER, Frank Oliver and ROSSELLÓ-MÓRA, Ramon. The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology*. September 2008. Vol. 31, no. 4, p. 241–250. DOI 10.1016/j.syapm.2008.07.001.

YUMOTO, Isao. Environmental and Taxonomic Biodiversities of Gram-Positive Alkaliphiles. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. 1 January 2007. P. 295–310. DOI 10.1128/9781555815813.ch23.

ZIERENBERG, R. A., ADAMS, M. W. and ARP, A. J. Life in extreme environments: hydrothermal vents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21 November 2000. Vol. 97, no. 24, p. 12961–12962. DOI 10.1073/pnas.210395997.

DichroWeb - Online Circular Dichroism Analysis. [online]. [Accessed 30 April 2018]. Available from: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

ExpASy - ProtParam tool. [online]. [Accessed 30 April 2018]. Available from: <https://web.expasy.org/protparam/>

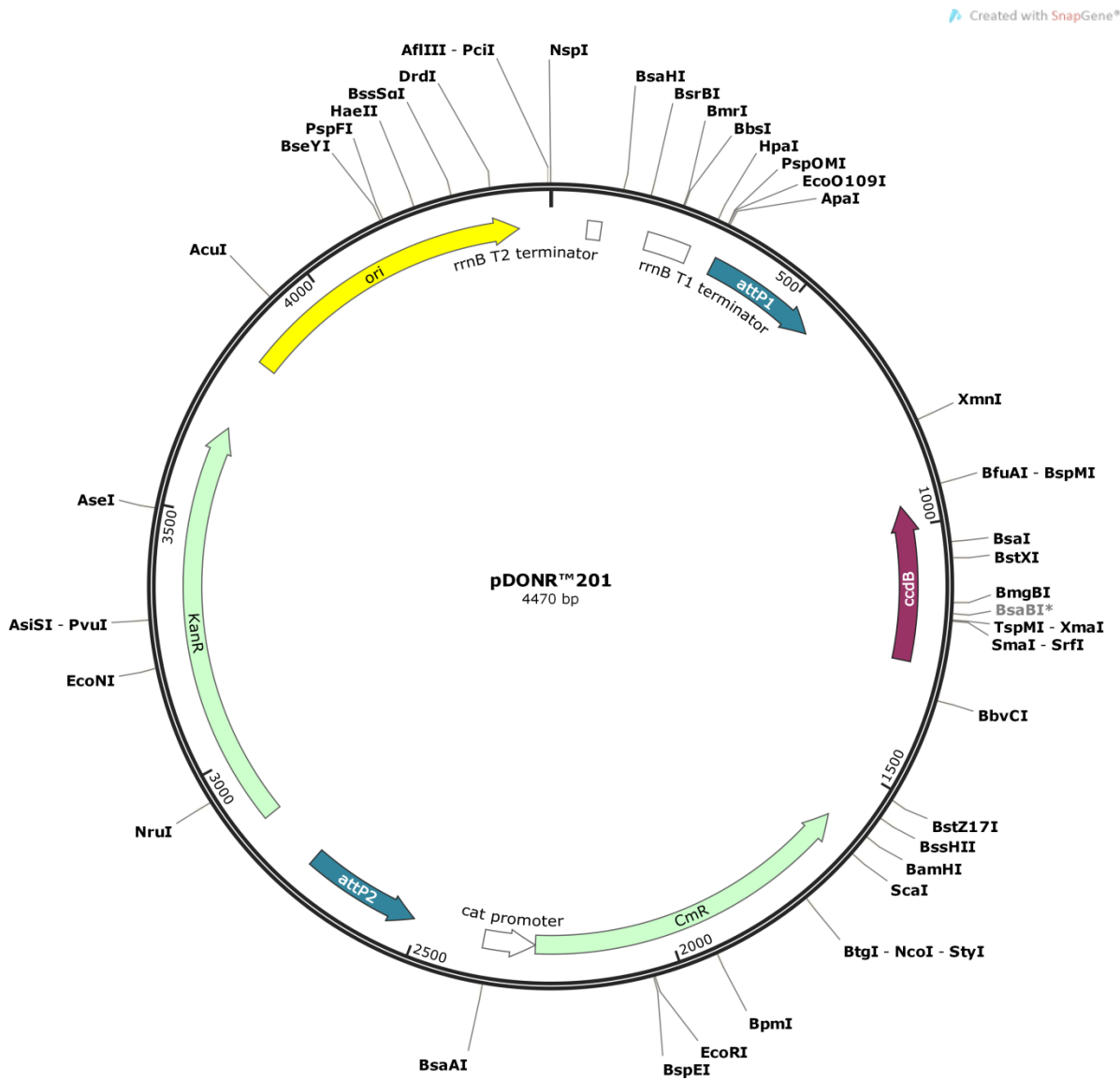
Genomics tools at LBMGE: Multalin. [online]. [Accessed 30 April 2018]. Available from: <http://www-archbac.u-psud.fr/genomics/multalin.html>

JPred: A Protein Secondary Structure Prediction Server. [online]. [Accessed 30 April 2018]. Available from: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>

Pfam: Home page. [online]. [Accessed 30 April 2018]. Available from: <http://pfam.xfam.org/>

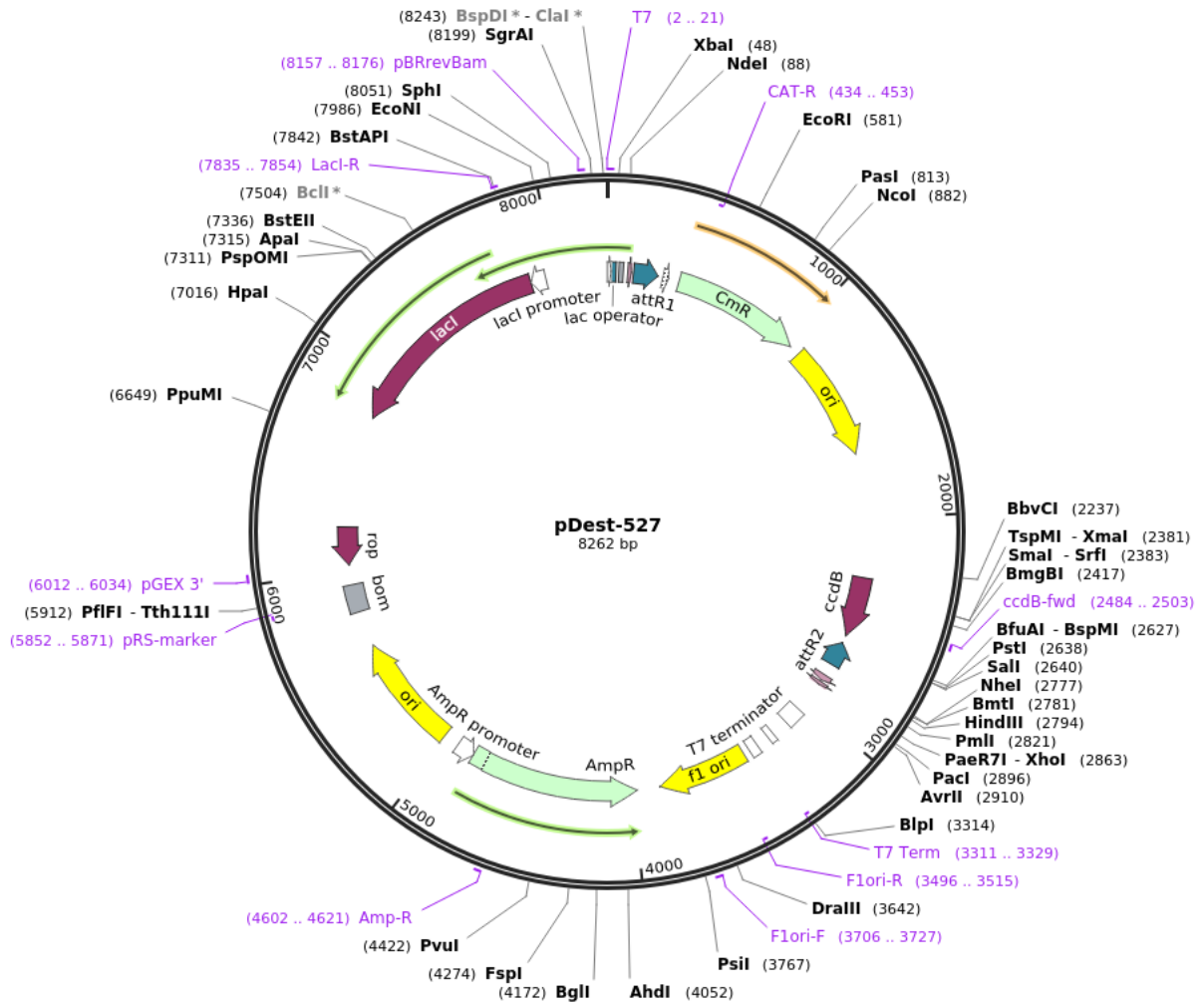
Anexos

ANEXO A

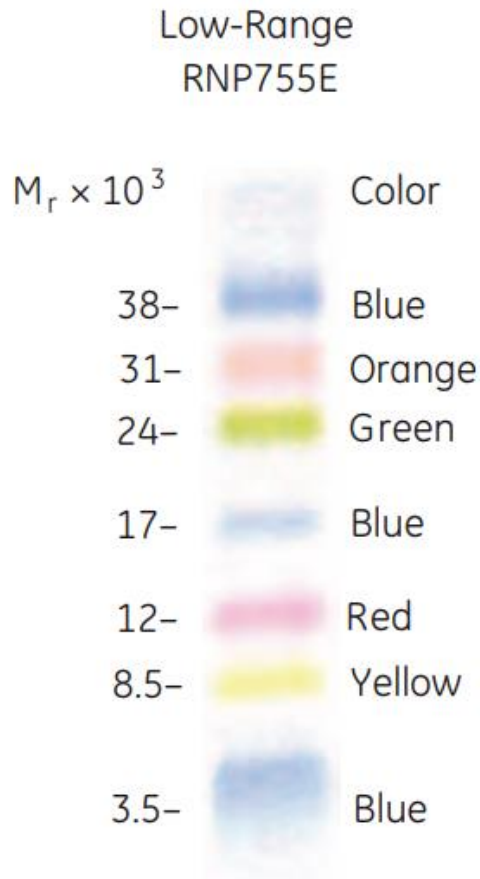


ANEXO B

Created with SnapGene®



**ANEXO C**



**ANEXO D**

<b>66 kDa</b>	<b>BSA</b>
<b>26 kDa</b>	<b>GST</b>
<b>12.4 kDa</b>	<b>Cytochrome C</b>
<b>7.4 kDa</b>	<b>Chymotripsin inhibitor 2</b>

## ANEXO DE SECUENCIAS

### ORF de MerR-G

[ATGAACAATATTAAGAGTAATTTTAGCATTAAAGATCTTGAAAATCTATCTGGTG  
TAAAAGCACATACCATTAGAATTTGGGAAAAGCGTTACAATCTTTTAAAACCTAA  
CCGTACTGATACAAATATTAGATATTACAGTTTGGAAAGTCTGCAGAAGCTTCTC  
AATATCACCTTCCTTTATAATAATGGATTTAAAATATCTAAAATTGCAAAAATAA  
ACGATTTGGATATTGCGGATACCGTTCGTGATTTATCATCTAAAGCCTATGCCGAC  
GATCATGCCATAAACATGTTAAAGTTGGCTATGCTAAATTTTGATAAGGAGCTGT  
TTCTAAATACGTATGATAACTTATTACAGCATAAGGATTTTTTCTGAAATTTTCATG  
GAAGTTTTTATACCACTTATGAGTGAAATAGGTTTTTTATGGCAAACAAATACGA  
TTACACCCGCGCAAGAACATTTTATTTCTGAATTAATTAAGCAAAAAGJTTATTGGT  
TAATATTGAAAATTGCACATTTAAAAGCAATAAAAAACAAGGATAAAAACCTTTGT  
ACTCTTTCTTCAAATAACGAAATTCATGATTTAGGACTGCATTTTTTTAAATTATA  
AGCTCACCAAAGCAAATCATCATACGCTATATTTGGGTCCAAGTGTTCCCTATTGT  
AAGCCTAAAAGATGTTTTAAAGCACCATAAAAACATTATCTTTATTTCCCTATTTCA  
CGGTAAAACCCGAAACAGAAAATATTGAAAACTACTTAAAGGAATTTTCATGATG  
AGCTCCTCAATAACGGTAATGAATTATGGATATTTGGCCGTATGGCAAATAATAT  
AGACAACCTCAAATTGCCTAAAACCATTAAAGCTTTTCATTCCGTAAACGATTTA  
GATAAATATATCTAA

ORF de MerR-G: subrayada se encuentra la secuencia nucleotídica de MerRG-HTH; entre corchetes, la secuencia nucleotídica de MerRG-B12; y MerRG-Full integra la secuencia completa.

### MerRG-HTH

MNNIKSNFSIKDLENLSGVKAHTIRIWEKRYNLLKPNRTDTNIRYYLESLSLQKLLNITF  
LYNNGFKISKIAKIND

### MerRG-B12

MNNIKSNFSIKDLENLSGVKAHTIRIWEKRYNLLKPNRTDTNIRYYLESLSLQKLLNITF  
LYNNGFKISKIAKINDLDIADTVRDLSSKAYADDHAINMLKLAMLNFDKELFLNTYD  
NLLQHKDFSEIFMEVFIPLMSEIGFLWQTNITPAQEHFISELIKQK



### **MerRG-Full**

MNNIKSNFSIKDLENLSGVKAHTIRIWEKRYNLLKPNRTDTNIRYYLESLOKLLNITF  
LYNNGFKISKIAKINDLDIADTVRDLSSKAYADDHAINMLKLAMLNFDKELFLNTYD  
NLLQHKDFSEIFMEVFIPLMSEIGFLWQTNITPAQEHFISELIKQKLLVNIENCTLKAIK  
NKDKNFVLFPLNNEIHDGLHFLNYKLTKANHHTLYLGPSVPIVSLKDVLKHHKNIIFI  
SYFTVKPETENIENYLKEFHDELLNNGNELWIFGRMANNIDNSKLPKTIKAFHSVNDL  
DKYI

### **BA40**

MHINLPEKRYYGIGEVAKAFGVNASLIRFWEKEFDVLQPKKNAKGNRKFTPEDIQNL  
KLIYHLVKERGFTLEGAKTHLKEGKQETLNMFQIISKLKEVKAKLVKIKEQL

### **BA40-ΔH5**

MHINLPEKRYYGIGEVAKAFGVNASLIRFWEKEFDVLQPKKNAKGNRKFTPEDIQNL  
KLIYHLVKERGFTLEGAKTHLKEGKQETLN

### **Primers**

#### **MerR-G Fw**

TGCGAGAACCTGTACTTTCAGGGTATGAACAATATTAAGAGTAATTTTAGCATT

#### **Rev MerRG-HTH**

GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATCGTTTATTTTGCAATTTAGAT  
A

#### **Rev MerRG-B12**

GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATAACTTTTGCTTAATTAATTCAGA  
AAT

#### **Rev MerRG-Full**

---

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATTAGATATATTTATCTAAATCGTT  
TACGG

**Gen Fw**

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGGAGAACCTGTACTTTCAG

**Gen Rev**

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTA