



Purificación y mutagénesis del factor de transcripción de genes de virulencia bacteriana RfaH

Purification and mutagenesis of the transcription factor of bacterial virulence genes RfaH

Camila Pavesi Contreras¹, alumna de 2° año.
César A. Ramírez-Sarmiento¹, profesor asistente.
José Alejandro Molina Ramírez¹, asistente técnico.

¹Instituto de Ingeniería Biológica y Médica, Escuela de Ingeniería, Escuela de Medicina y Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

*Autor para correspondencia: cesar.ramirez@uc.cl

Camila Pavesi Contreras¹, 2nd year student.
César A. Ramírez-Sarmiento¹, assistant professor.
José Alejandro Molina Ramírez¹, technical assistant.

¹Institute for Biological and Medical Engineering, School of Engineering, School of Medicine and College of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile

*Corresponding author: cesar.ramirez@uc.cl

RESUMEN

RfaH es un factor de transcripción involucrado en la virulencia de *Escherichia coli*. Esta proteína es metamórfica, de donde nace la relevancia de su estudio. El objetivo de este trabajo es purificar el dominio metamórfico, que corresponde a la región carboxilo-terminal o CTD, para estudiarlo de forma aislada. Para ello, se realizó mutagénesis de la secuencia de ADN codificante para RfaH, se transformó el material genético en *Escherichia coli*, se expresó la proteína y finalmente se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel. El producto obtenido puede utilizarse para construir curvas de estabilidad de la proteína y avanzar la comprensión de su transformación estructural.

Palabras clave: RfaH, factores de transcripción, proteína metamórfica, cromatografía de afinidad a iones metálicos.

ABSTRACT

RfaH is a transcription factor involved in *Escherichia coli* virulence. This is a metamorphic protein, thus the relevance of its study. The aim of this research is to purify the metamorphic domain, corresponding to the carboxy-terminal domain (CTD), for isolated study. To perform this, DNA mutagenesis of the coding sequence for RfaH was performed, then the genetic material of *Escherichia coli* was transformed, the protein was expressed and ultimately purified by nickel-affinity chromatography. The purified product can then be used to construct protein stability curves and advance in the comprehension of its structural transformation.

Key words: RfaH, transcription factors, metamorphic protein, metallic ion affinity chromatography.

1. INTRODUCCIÓN

RfaH es un factor de transcripción de *Escherichia coli*, el cual está involucrado en regulación de fenotipos asociados a virulencia bacteriana (Gao et al., 2013). Esta proteína es de tipo metamórfica, es decir, tiene la capacidad de modificar su estructura tridimensional y con ello realizar distintas actividades (Knauer, Rösch, & Artsimovitch, 2013), lo cual junto a su función en la virulencia bacteriana determina la importancia de su estudio. Cuando está inactiva, su región carboxilo-terminal se encuentra en estructura horquilla **HÉLICE ALFA**. Sin embargo se puede producir un cambio conformacional en el cual la región carboxilo-terminal pasa a ser **BARRIL BETA**. Esta transformación le permite actuar efectivamente como factor de transcripción, además de coordinar físicamente la transcripción con la maquinaria celular responsable de la traducción del ARN en proteínas. RfaH tiene una masa molecular de 20.5 kDa, de los cuales su región metamórfica CTD abarca 6.5 kDa. La proteína transcribe genes que provocan que *E. coli* sea virulenta, tales como *rfbB* (expresión del antígeno O que se ubica en la membrana externa bacteriana) y *rfaS* (biosíntesis de lipopolisacáridos centrales) (Artsimovitch & Landick, 2002). El objetivo de esta Investigación en Pregrado fue el aprendizaje de las distintas etapas y técnicas requeridas para la purificación de una proteína recombinante, tomando como modelo de estudio a RfaH. El proceso puede dividirse en dos categorías principales, en primer lugar trabajo y preparación de ADN recombinante y en segundo lugar expresión y purificación de proteína.

1. INTRODUCTION

RfaH is an *Escherichia coli* transcription factor that is involved in the regulation of bacterial phenotypes associated to virulence (Gao et al., 2013). This is a metamorphic protein, which means that it has the capacity of modifying its tridimensional structure and, thus, to perform different activities (Knauer, Rösch, & Artsimovitch, 2013). This, along with its role in bacterial virulence, highlights the relevance of understanding its function. When inactive, the CTD region is folded in an **ALPHA HELIX** structure. However, a conformational change can be induced which transforms the CTD to a **BETA BARREL** fold. This transformation allows its activity as a transcription factor and also as a physical coordinator of the DNA transcription with the cellular machinery responsible of ARN translation into proteins. RfaH has a molecular weight of 20.5 kDa, of which the CTD encompasses 6.5 kDa. This protein transcribes genes responsible for *E. coli* virulence, such as *rfbB* (O-antigen export system ATP-binding protein RfbB, located in the external bacterial membrane) and *rfaS* (Lipopolysaccharide core biosynthesis protein RfaS) (Artsimovitch & Landick, 2002). The aim of this study was to learn about the different technical steps required for the purification of a recombinant protein, using the RfaH factor as study model. The process can be divided in two categories: first, the manipulation and preparation of the recombinant DNA; and, second, protein expression and purification.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Trabajo y preparación de ADN

Mutagénesis del carboxilo terminal de RfaH. Según el dogma de la biología molecular, a partir del ADN se transcribe a ARN, el cual se traduce a proteínas. Por tanto, se hace necesario extraer el material genético codificante para una proteína, para expresarla y estudiarla en condiciones aisladas y controladas. El primer paso a seguir para ello es la adquisición de la secuencia del gen codificante para RfaH en un vector para la portabilidad y expresión controlada del material genético, correspondiente a un plasmidio. En nuestro caso se trabajó exclusivamente con la región carboxilo-terminal del factor de transcripción RfaH, o RfaH-CTD, el cual se encuentra en un vector plasmidial pET28a-His-GB1.

Para explorar el rol de distintos residuos de una proteína en su función biológica, o para poder utilizar ciertos aminoácidos como puntos de referencias para estudiar una propiedad de una proteína, se hace necesaria la introducción de mutaciones en la secuencia del gen de RfaH a través de PCR. En este caso, se reemplazaron una serie de aminoácidos por residuos de triptófano (W) a fin de usarlo como una sonda fluorescente capaz de monitorear el desplegamiento de la proteína. En el caso del CTD, se utilizó el sistema de **MUTAGÉNESIS** sitio dirigida GeneTailor™ (Invitrogen) para diseñar partidores (**PRIMERS**) de ADN. Se realizaron las mutaciones F123W, F126W, F130W, F156W y F159W y sus T_m fueron 59.9°C, 61.7°C, 66.9°C, 53.0°C y 58.1°C respectivamente. Para realizar las mutaciones se utilizaron las condiciones de reacción de acuerdo a las instrucciones de Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase, resultando en la modificación de un solo aminoácido en la proteína final. De esta manera no solo se amplificó la cantidad de ADN disponible para trabajar, sino que a la vez fue posible elaborar varias muestras donde cada una de ellas poseía una mutación distinta. Posteriormente se corrieron las muestras en un gel de Agarosa al 1% en buffer TAE con el fin de verificar la amplificación del material genético.

Transformación de bacterias. El segundo paso a seguir consistió en **TRANSFORMAR** células de *Escherichia coli* DH5α con las muestras que se generaron. En busca de ello fue fundamental preparar bacterias quimio-competentes, las cuales se caracterizan por facilitar la permeabilidad del material genético plasmidial a través de la membrana celular al ser suspendidas en cloruro de calcio, y seguidamente insertar el ADN a través de un shock térmico (35 segundos a 42°C) (Asif, Mohsin, Tanvir, & Rehman, 2017). La bacteria recircularizó el ADN lineal del PCR y se obtuvo un plasmidio que presentó un gen de resistencia a Kanamicina, antibiótico que permite su selección por sobre otras bacterias que no hayan conseguido incorporar el material genético exógeno. Por ello, después de que las células pasaron por un tiempo de recuperación en medio

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. DNA manipulation and preparation

RfaH CTD mutagenesis. According to the molecular biology dogma, from DNA, RNA is transcribed, leading to protein translation. Thus, in order to express a protein for isolated and controlled study, the extraction of its coding genetic material is needed. The first step to do this is the acquisition of the coding sequence for RfaH into a plasmidial vector for transport and controlled expression of the genetic material. Herein, the CTD domain of RfaH, termed RfaH-CTD, was exclusively used and imported into the plasmidial vector pET28a-His-GB1.

In order to explore the role of different amino acid residues of a protein in its biological function, or to use certain amino acids as references in the structure of a protein, the introduction of mutations in the gene sequence of RfaH, through PCR, becomes necessary. In this case, a series of amino acids were replaced by tryptophan (W) residues, in order to use this as a fluorescent probe to observe protein folding. In the case of the CTD, the GeneTailor™ (Invitrogen) site directed **MUTAGENESIS** system was used to design specific DNA **PRIMERS**. The F123W, F126W, F130W, F156W and F159W mutations were performed and their T_m were 59.9°C, 61.7°C, 66.9°C, 53.0°C y 58.1°C, respectively. To perform the mutations, the reaction conditions were as specified in the instructions of Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase, resulting in a single amino acid modification on the final protein. This way, not only an appropriate amount of DNA was amplified, but also it was possible to create multiple samples where each one of them had a different mutation. Afterwards, samples were separated using a 1% Agarose gel in TAE buffer in order to verify the amplification of the genetic material.

Bacterial transformation. The second step to follow was to **TRANSFORM** cells of *Escherichia coli* DH5α with the generated samples. In order to accomplish, it was fundamental to prepare chemically competent bacteria, which are characterized by facilitating plasmidial genetic material permeability through the cellular membrane when suspended in calcium chloride. DNA was inserted by thermal shock (35 seconds at 42°C) (Asif, Mohsin, Tanvir, & Rehman, 2017). The bacteria recircularized the lineal DNA from PCR, obtaining a plasmid with Kanamycin resistance, an antibiotic that allows selection over the bacteria that did not incorporate the exogenous genetic material. After the cells were allowed to recover in culture media, they were seeded in agar/LB dishes with this antibiotic. Positive results for this experiment were the formation of bacterial colonies, indicating that the transformation was successful.

DNA multiplication and amplification. The third step was to select three colonies transformed with RfaH-CTD F130W and inoculate them into LB media, with the aim

de cultivo, se sembraron en placas de agar/LB con este antibiótico. Los resultados positivos de este experimento fueron la formación de colonias bacterianas en las placas, indicando que la transformación fue realizada con éxito.

Multiplicación y purificación del ADN. El tercer paso fue seleccionar tres colonias transformadas con RfaH-CTD F130W e inocularlas en medio LB con el objetivo de que las bacterias pudieran multiplicarse en dicho medio de cultivo, y con ellas, el plasmidio de interés. Acto seguido se purificó el ADN utilizando el kit de extracción EZNA Plasmid DNA mini kit II, OMEGA Bio-tek (MINIPREPS) y se guardó un stock de lo obtenido, tanto ADN como bacteria, ésta última en Glicerol al 50% para su criopreservación.

Secuenciación del ADN. El cuarto y último paso del trabajo con material genético fue **SECUENCIAR** el ADN recuperado. La empresa MacroGen Corporation USA realizó este procedimiento por pirosecuenciación (Tost & Gut, 2007). La determinación de la secuencia de ADN es vital en todo experimento de biología molecular pues permite tanto corroborar que la mutación deseada se logró como asegurar que no hubo daño al ADN (como una mutación involuntaria o adicional a la de interés).

2.2. Expresión y purificación de RfaH-CTD.

Transformación de bacterias y expresión de CTD. La segunda categoría de este proceso trata sobre los experimentos con la proteína en sí. Se transformaron las muestras de ADN (solo RfaH-CTD F130W), esta vez a una cepa de *E. coli* apropiada para la sobre-expresión de proteínas, como lo es BL21. El protocolo se llevó a cabo como fue descrito en la sección 2.1. A continuación se sembró en una placa de agar/LB con Kanamicina para comprobar la transformación. Al crecimiento de colonias, se seleccionó una para elaborar un pre-inóculo. Este consistió en 200ml de medio LB cultivado con agitación a 37°C toda la noche. Se obtuvo un cultivo saturado, desde el que se extrajo una alícuota y se preparó un inóculo al 5% de 1 litro de medio LB con Kanamicina. Este fue cultivado hasta que las bacterias se encontraron en el estado de transición entre fase exponencial y fase estacionaria de crecimiento, es decir, en el caso de *E. coli* a OD600 = 0,8. Finalmente, se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG a 0.3mM y dejando el cultivo a 25°C toda la noche.

Purificación de CTD. La construcción genética realizada resulta en una proteína recombinante RfaH-CTD en la cual el extremo N-terminal se encuentra fusionado a un "Tag" de 6 residuos de histidina, junto con una proteína de incremento de solubilidad denominada GB1. La proteína de fusión con la cual se trabajó se muestra en la **Figura 1**. Para continuar, se realizó la purificación de RfaH-CTD mediante cromatografía de afinidad a metales.

Se centrifugó el cultivo con la proteína expresada a 4.000 x g por 10 minutos para obtener un sedimento bacteriano (PELLET) y se descartó el **SOBRENADANTE**.

of allowing the bacteria to multiply in said culture media, and with them the plasmid of interest. Subsequently, DNA was purified using the EZNA Plasmid DNA mini kit II, OMEGA Bio-tek (MINIPREPS). A stock of the resulting material was preserved, both from bacteria and DNA, the latter cryopreserved in 50% glycerol.

DNA sequencing. The fourth and last step with the genetic material was to **SEQUENCE** the collected DNA. The company MacroGen Corporation USA realized this procedure by pyrosequencing method (Tost & Gut, 2007). Determination of the DNA sequence is vital to any molecular biology experiment because it validates the obtention of the desired mutation, and also allows checking for DNA damage (such as involuntary or additional mutations).

2.2. Expression and purification of RfaH-CTD.

Bacterial transformation and CTD expression. The second part of this research is related to the experiments on the protein itself. For that, the DNA samples (only RfaH-CTD F130W) were used to transform strains of *E. coli* suitable for protein over expression, such as BL21. The protocol was performed as described in section 2.1. Next, cells were seeded on agar/LB dishes with Kanamycin to check for transformation. After colony establishment, one was selected to establish a pre inoculum. This consisted of 200 ml of LB media and was kept at 37 °C overnight with shaking. A saturated culture was obtained, from which an aliquot was extracted in order to prepare 1 L of inoculum at 5% in LB media with Kanamycin. The latter was grown until the bacteria were in transition from the exponential to stationary growing phase, namely, OD600 = 0,8 for *E. coli*. Finally, the expression of the protein was induced by incorporating 0.3 mM of IPTG at 25 °C overnight.

CTD purification. The genetic construct performed results in a recombinant RfaH-CTD protein in which the N-terminal is fused to a histidine tag of 6 residues, together with a solubility-increasing protein termed GB1. The fusion protein is shown in **Figure 1**. In order to continue, purification of the RfaH-CTD was performed by metal affinity chromatography. The culture with the over expressed protein was centrifuged at 4.000 × g for 10 minutes to obtain a bacterial sediment (PELLET) and the **SUPERNATANT** was discarded. Bacteria were resuspended in a buffer with 25 mM Tris, 500 mM NaCl, 40 mM Imidazole, 8% glycerol and pH 8.0 (solution A). This

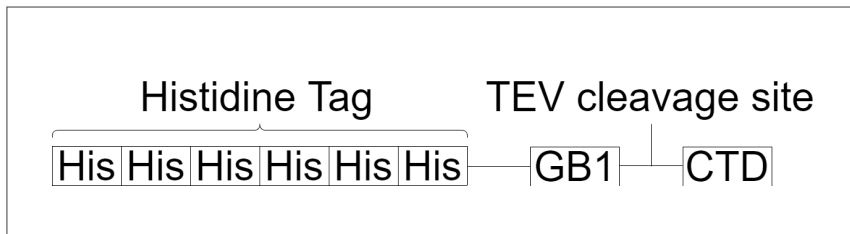


Figura 1. Complejo proteico conformado por tag de Histidina, proteína de fusión GB1, sitio de corte reconocido por TEV, y CTD F130W.

Figure 1. Protein complex formed by the histidine tag, the fusion protein GB1, the TEV cleavage site, and the CTD F130W.

Se resuspendieron las bacterias en un buffer a pH 8 compuesto de Tris a 25 mM, NaCl a 500 mM, Imidazol a 40 mM y Glicerol al 8% (solución A). A lo anterior se agregó 0.1 mM de PMSF (inactivador de proteasas), DNAsa 2 U/ml (degradador de material genético que evita una alta viscosidad de la solución) y 2 mM de β -mercaptoetanol (agente reductor). Se LISARON las bacterias con sonicador QSonica modelo Q125 frecuencia 20 kHz por 5 minutos alternando ciclos de 30 segundos entre pulso y descanso, a 50% de potencia máxima. Luego las bacterias lisadas se centrifugaron por 15 minutos a 15.000 x g, para separar la fracción correspondiente a la membrana de la citosólica. Dado que la proteína buscada es soluble, posteriormente se extrajo el sobrenadante. Se pasó este último por columnas de níquel previamente equilibradas con la solución A. Para el lavado de las columnas, se utilizó la misma solución A. Para la elución, se realizó una gradiente lineal de imidazol usando 20 ml de solución A y 20 ml de solución B (Tris a 25 mM, NaCl a 500 mM, Imidazol a 200 mM y Glicerol al 8%, a pH 8). De esta manera se recuperó la proteína de fusión de RfaH-CTD de forma paulatina. Se juntó toda la proteína recolectada y se midió la concentración para posteriormente agregar la proteasa TEV en proporción 1/20, con lo cual se removió la cola de Histidina y la proteína de fusión GB1. El corte se efectuó a 4°C toda la noche en un buffer a pH 8 compuesto de Tris a 25mM, NaCl a 500 mM, DTT (agente reductor) a 2 mM, EDTA a 1 mM y Glicerol al 8% (solución C). Teniendo en cuenta que TEV también posee un tag de Histidina, se equilibraron las columnas de níquel en la solución C y se pasó la muestra nuevamente por ellas, obteniéndose de forma aislada en el frente de la cromatografía el carboxilo-terminal CTD F130W de RfaH.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron distintos procedimientos en esta investigación y se observaron varios resultados. Se logró mutar la secuencia codificante para RfaH obteniéndose cinco cepas distintas a estudiar. A la vez, se transformó exitosamente *E. coli* DH5 α con las mutaciones, hecho evidenciado por el crecimiento bacteriano en placas con antibiótico, y

was supplemented with 0.1 mM PMSF (protease inhibitor), 2 U/ml DNAsa (to hydrolyze the genetic material, avoiding high viscosity in the solution) and 2 mM β -mercaptoethanol (reducing agent). The bacteria were **LYSED** with a QSonica Q125 sonicator at 20 kHz for 5 min at 50% max power with alternating cycles of 30 seconds between pulse and rest. Later, the lysed bacteria were centrifuged at 15.000 \times g for 15 minutes to separate the cell membrane fraction. Since the target protein is soluble, after centrifugation the supernatant was collected and ran through nickel columns previously equilibrated with solution A. For column wash the same solution A was used. For substrate elution, a lineal imidazole gradient was performed with 20 ml of solution A and 20 ml of solution B (25 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole and 8% glycerol, pH 8.0). Thus, the fusion RfaH-CTD protein was gradually recovered. All the collected protein was pooled and protein concentration was measured in order to incorporate the protease TEV in a 1/20 ratio, which removes the histidine tag and the fusion protein GB1. The protease hydrolysis was performed at 4 °C overnight in a buffer composed of 25 mM Tris, 500 mM NaCl, 2 mM DTT (reducing agent), 1 mM EDTA and 8% glycerol, pH 8.0 (solution C). Since the TEV protein also has a histidine tag, the nickel columns were equilibrated with solution C and the samples were eluted again, thus obtaining the isolated CTD F130W of RfaH in the chromatographic front.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Herein, several procedures were performed with various results. It was possible to mutate the coding sequence for RfaH, thus obtaining five different strains for study. Furthermore, *E. coli* DH5 α were successfully transformed with the mutated sequences, which was evidenced by the bacterial growth observed in antibiotic-supplemented

posteriormente se creció la cepa con la modificación F130W. Se utilizó Minipreps para aislar el ADN multiplicado por las bacterias y se verificó la correcta obtención de éste con la electroforesis de los plásmidos en un gel de Agarosa al 1% en buffer TAE. Los resultados del gel se ilustran en la **Figura 2**. El ver una aparición de bandas concentradas indica una gran cantidad de ADN del mismo tamaño, es decir, un solo tipo de ADN en este caso.

Para corroborar la efectividad en la mutación las muestras fueron secuenciadas por la empresa MacroGen Corporation USA, por pirosecuenciación. Los resultados fueron acordes a lo esperado, lo que indica que el procedimiento fue realizado adecuadamente, respetando las normas e indicaciones, y que además no se cometieron errores significativos de manipulación.

Luego se transformó *E. coli* BL21 con el plásmido codificante para RfaH-CTD F130W, confirmado nuevamente el éxito de este procedimiento por el crecimiento de colonias en placas con Kanamicina, se elaboró un inóculo y se indujo la expresión del CTD. Para lograr lo anterior, fue necesario asegurar varios puntos, tales como utilizar bacterias en estado óptimo y proveerlas con todo lo requerido para su desarrollo. A continuación se purificó la proteína sintetizada mediante cromatografía por columnas de níquel. Finalmente, se realizó una electroforesis en geles de Poliacrilamida al 15% en Tris-Glicina para verificar los resultados, los cuales se muestran en la **Figura 3**. Al observarse en el pozo 7 una única banda marcada, se pudo asegurar que la proteína estaba efectivamente aislada y pura.

dishes. Afterwards, the F130W-modified strain was grown. Minipreps were used to isolate the DNA multiplied in bacteria and its correct extraction was verified by electrophoresis in 1 % Agarose gels in TAE buffer. The results from the gel are shown in **Figure 2**. The appearance of concentrated bands indicates a large amount of DNA of the same size, thus one type of DNA in this case.

To check the effectiveness in the mutations, the samples were pyro-sequenced by the company MacroGen Corporation USA. The results were according to expectation, suggesting that the procedure was performed adequately, following the norms and indications, dismissing significant manipulation errors.

Afterwards, BL21 *E. coli* were successfully transformed with the coding plasmid for RfaH-CTD F130W, as suggested by the observed colony growth in Kanamycin dishes, an inoculum was prepared and the CTD expression was induced. Then, the synthesized protein was purified by nickel-affinity chromatography. Finally, to verify the results, an electrophoresis in 15% polyacrylamide gels in Tris-Glycine was performed; results are shown in **Figure 3**. The observation of a unique band in lane 7 indicates that the protein was successfully isolated and purified.

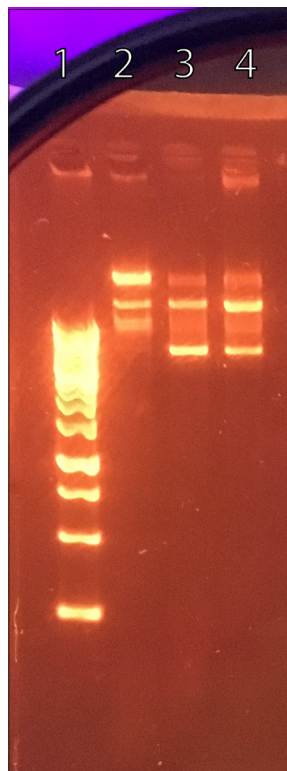


Figura 2. Gel de Agarosa al 1% en buffer TAE del resultado de las Minipreps que contiene: 1) Estándar de ADN, 2) RfaH-F130W colonia 1, 3) RfaH-F130W colonia 2, 4) RfaH-F130W colonia 3.

Figure 2. 1% Agarose gel in TAE buffer from the Minipreps containing: 1) DNA standard, 2) RfaH-F130W colony 1, 3) RfaH-F130W colony 2, 4) RfaH-F130W colony 3.

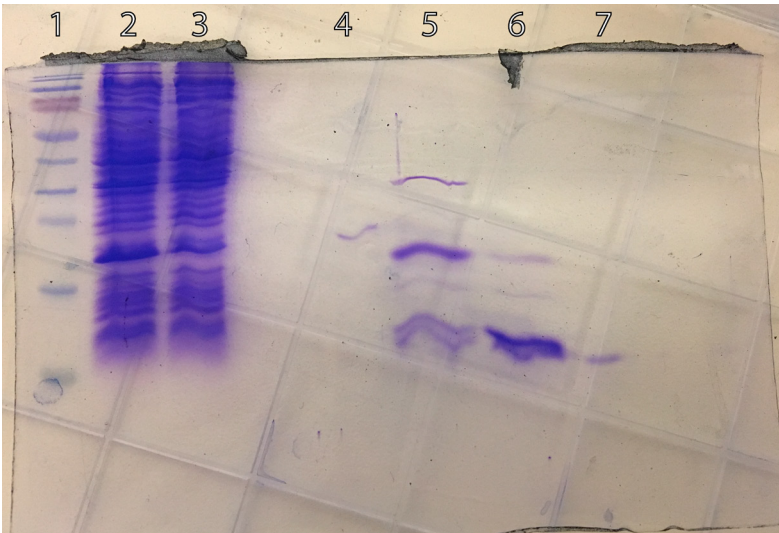


Figura 3. Gel de Poliacrilamida al 15% en Tris-Glicina que contiene: 1) Estándar de proteína, 2) Sobrenadante de la centrifugación, 3) Carga, 4) Lavado, 5) Fracciones eluidas de la columna de níquel, 6) CTD130 y proteasa TEV, 7) CTD130.

Figure 3. 15% Polyacrylamide gel in Tris-Glycine containing: 1) Protein standard, 2) centrifugation supernatant, 3) load, 4) wash, 5) eluted fraction from nickel column, 6) CTD130 and TEV protease, 7) CTD130.

4. CONCLUSIONES

A lo largo de la investigación, se buscó purificar la región CTD de la proteína RfaH con el objetivo de estudiarla de forma aislada. Para ello, se realizó exitosamente mutación de ADN, transformación de bacterias, expresión de la proteína recombinante y cromatografía de afinidad a metales. Con esta técnica es posible controlar con seguridad el momento en que se expresa la proteína en la bacteria. Además, se utilizó este método debido a la factibilidad de mutar una proteína con técnicas recombinantes. El tag de Histidina insertado en la secuencia permitió la purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Debido a que este método da como producto final un compuesto aislado, éste puede ocuparse para construir una curva de estabilidad de la proteína, la cual nos brindará información valiosa para trabajar con ella en el futuro.

Una gran aplicación de los métodos recombinantes actualmente es la producción industrial de insulina. Esta hormona se sintetiza en *Escherichia coli* como factoria celular, posterior a lo cual se purifica y se vende como fármaco en el tratamiento de la diabetes (Velasco, 1992). Otro ejemplo de aplicación es la obtención de eritropoyetina mediante células eucariontes Chinese Hamster Ovary (CHO), muy utilizada para el tratamiento de anemia (Lin et al., 1985).

En suma, el procedimiento descrito en este trabajo contribuyó al avance del estudio del factor de transcripción de genes de virulencia RfaH, permitiendo su purificación exitosa y facilitando procesos posteriores de análisis y profundización del conocimiento en la zona metamórfica de la proteína.

Agradecimientos

Quisiera agradecer al profesor César Ramírez por darme la oportunidad de participar en su investigación. Además,

4. CONCLUSIONS

Throughout this research, the goal was to purify the CTD region of the RfaH protein in order to study it in isolation. To do this, successful DNA mutation, bacterial transformation, recombinant protein expression and metallic affinity chromatography were performed. With these techniques, it is possible to control the precise moment in which the bacteria express the protein. Furthermore, this method was chosen due to the ease of mutation with recombinant techniques. The histidine tag inserted in the sequence allowed the purification by nickel-affinity chromatography. Since this method results in a final isolated compound, it can be used to construct protein stability curves, which can provide valuable information in the future.

A great use of the recombinant methods is the current industrial production of insulin. This hormone is synthesized in *Escherichia coli* as cellular factories, and then the protein is purified and sold as a drug for the treatment of diabetes (Velasco, 1992). Another example is the obtention of erythropoietin using the eukaryotic cells Chinese Hamster Ovary (CHO), which is used in the treatment of anemia (Lin et al., 1985).

In summary, the procedure shown here contributed to advance the study of the transcription factor of virulence genes RfaH, allowing for its successful purification and facilitating future work of further analysis and deepening the knowledge of the metamorphic region of the protein.

Acknowledgments

To professor César Ramírez, who gave me the chance of participating in his research. Furthermore, I thank Alejandro

doy las gracias a Alejandro Molina por su desempeño excepcional como académico en cada sesión de laboratorio y por su contribución a la redacción de este informe.

Molina for his exceptional academic performance in each laboratory session and his contribution to the drafting of this manuscript.

GLOSARIO

ALFA HÉLICE: estructura secundaria helicoidal que forman las cadenas de aminoácidos de una proteína al plegarse e interactuar mediante puentes de hidrógeno.

BETA PLEGADA: estructura secundaria de lámina en zigzag que forman las cadenas de aminoácidos de una proteína al plegarse e interactuar mediante puentes de hidrógeno.

LISAR: romper la integridad de la célula destruyendo la membrana plasmática.

MINIPREPS: método que utiliza columnas y centrifugación para purificar ADN.

MUTAGÉNESIS: producción de mutaciones en una secuencia de ADN.

OD600: densidad óptica observada a 600 nanómetros.

PCR: abreviatura de Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una técnica que utiliza ciclos de temperatura para amplificar una cantidad de ADN.

PELLET: al realizar una centrifugación, se separará la solución en dos. La parte compacta que se concentra en el fondo del tubo se denomina pellet.

PRIMER: secuencia pequeña y específica de material genético (entre 20 y 40 pares de bases) necesaria para realizar PCR.

SECUENCIAR: obtener la secuencia de nucleótidos de una hebra de materia genético.

SOBRENADANTE: al realizar una centrifugación, se separará la solución en dos. El líquido que se obtiene en la parte superior del tubo se denomina sobrenadante.

T_m: temperatura específica en que cada primer se une al 50% a la hebra de ADN, se debe tener en cuenta al realizar PCR.

TRANSFORMAR: insertar en una célula material genético externo.

GLOSSARY

ALPHA HELIX: helicoidal secondary structure that chains of amino acids form while folding and interacting through hydrogen bonds in a protein backbone.

BETA BARREL: zigzag-sheet secondary structure that chains of amino acids form while folding and interacting through hydrogen bonds in a protein backbone.

LYSE: to break the cellular integrity by destroying the plasmatic membrane.

MINIPREPS: DNA purification method that relies on purification columns and centrifugation.

MUTAGENESIS: the process of mutations on a DNA strand.

OD600: optical density observed at 600 nm wavelength. PCR: acronym for Polymerase Chain Reaction, a technique that relies on temperature cycles to amplify a segment of a DNA strand.

PELLET: upon centrifugation, solutions can be separated in two portions. The compact remnant that is concentrated in the bottom of the tube is termed pellet.

PRIMER: small and specific sequence of genetic material (approximately 20-40 base pairs) necessary for PCR specificity.

SEQUENCE: obtain the nucleotide sequence of a strand of genetic material.

SUPERNATANT: upon centrifugation, solutions can be separated in two portions. The liquid on top of the pellet is termed supernatant.

T_m: specific temperature for every primer at which 50% of the DNA molecules have their strands separated, it needs to be considered for PCR conditions.

TRANSFORMATION: the act of inserting foreign genetic material into a cell.

PRINCIPIO CIENTÍFICO

La purificación de proteínas por cromatografía de afinidad se basa en la atracción de la proteína de interés por un compuesto particular de la columna cromatográfica. Esta afinidad no la poseen los otros elementos de la solución, por lo que al pasar esta por la columna únicamente la proteína que se busca purificar quedará atrapada dentro, mientras que los demás componentes caerán. Posteriormente se introduce un competidor a la columna, que posee

SCIENTIFIC PRINCIPLE

Protein purification by affinity chromatography is based on the attraction of the protein of interest for a specific compound present in the chromatographic column. This affinity is not present in other elements within the solution; thus, by eluting the sample through the column, only the protein of interest will remain attached to it, while the rest of the components will flow out. Later, a competitor is introduced to the column; typically, these

la característica de ser más afín a ella que la proteína de interés. Por lo tanto el competidor desplazará a la proteína causando que esta eluya por la columna. De esta forma es posible obtener la proteína pura para su futuro uso. La **Figura 4** ilustra las etapas de obtención de una proteína recombinante pura a través de cromatografía de afinidad.

molecules have greater affinity for the column than the protein of interest. Therefore, the competitor will displace the protein of interest causing its elution out of the column. In this way, it is possible to isolate the protein for its future use. **Figure 4** illustrate the steps involved in the purification of a recombinant protein through affinity chromatography.

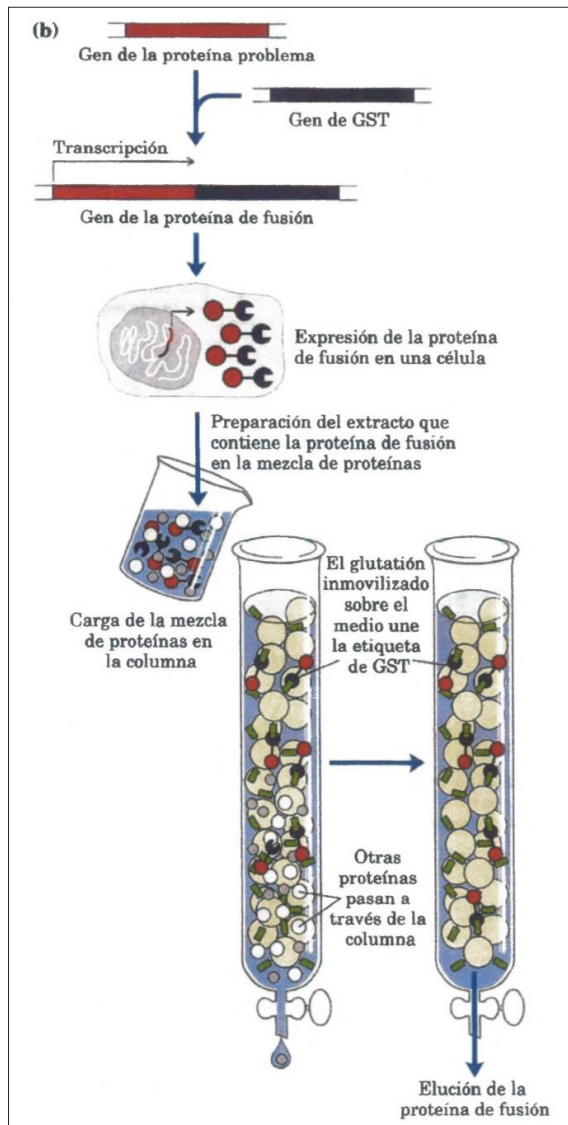


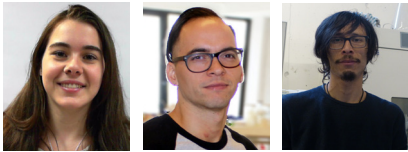
Figura 4. Expresión y purificación de una proteína recombinante a través de cromatografía de afinidad (Lehninger, 2009).

Figure 4. Expression and purification of a recombinant protein through affinity chromatography (Lehninger, 2009).

REFERENCES

- Artsimovitch, I., Landick, R. (2002). The Transcriptional Regulator RfaH Stimulates RNA Chain Synthesis after Recruitment to Elongation Complexes by the Exposed Nontemplate DNA Strand. *Cell*, 109, 193-203.
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R. & Rehman, Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Gao, Q., Xu, H., Wang, X., Zhang, D., Ye, Z., Gao, S. & Liu, X. (2013). RfaH Promotes the Ability of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* O2 Strain E058 To Cause Avian Colibacillosis. *Journal of bacteriology*, 195(11), 2474-2480.
- Lehninger, A. (2009). Principios de Bioquímica. (5ta ed.). Barcelona: D. L. Nelson & M. M. Cox.
- Knauer, S., Rösch, P. & Artsimovitch, I. (2012). Transformation. *RNA Biology*, 9(12), 1418-1423.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S. M., Lai, P., H. & Goldwasser, E. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(22), 7580-7584.
- Tost, J. & Gut, I. G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature Protocols* 2, 2265-2275.
- Velasco, N. (1992). Insulina como fármaco. *ARS MEDICA*, 21(1), 21-24. Recuperado de <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/issue/view/21-1-1992>

EQUIPO DE INVESTIGADORES / RESEARCH TEAM



Camila
Pavesi

César
Ramírez-
Sarmiento

José Alejandro
Molina