

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“OPTIMIZACIÓN DE LA CRISTALIZACIÓN DEL DOMINIO TALLO  
DE LA CADENA PESADA DE LA DINEÍNA CITOPLÁSMICA  
HUMANA 1”**

**Tesis que presenta:**

**Q. B. P. Saúl Santiago Sánchez**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Edgar Morales Ríos**





Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el estímulo otorgado durante el desarrollo de esta tesis realizada en laboratorio No. 2 del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## **RECONOCIMIENTOS**

Al Instituto de Bebidas para el Bienestar y la Salud A. C. por promover y contribuir al desarrollo de la ciencia básica.

A la Secretaria de Educación Pública por impulsar el crecimiento científico y tecnológico de nuestro país.

Al Dr. Jaime Ortega López, Investigador del Departamento de Biotecnología, por la invaluable y generosa donación del equipo para purificación de proteínas a nuestro laboratorio que es raíz de este proyecto.

Agradezco la ayuda y disposición del personal del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LANSE).

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Edgar Morales Ríos por sus comentarios y llamadas de atención que fueron fundamentales para mi desempeño académico, así como su invaluable accesibilidad y sencillez para resolver cualquier duda, con franqueza, muchas gracias por incluirme como parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Carlos Gómez Lojero, por sus invaluable aportaciones a mi proyecto, dando gracias por enseñarme que sin las bases no hay explicación que sirva. También a su auxiliar de laboratorio M. C. Lourdes Leyva, por enseñarme con mucha paciencia la técnica de diálisis.

También al Dr. Ricardo Mondragón Flores, por sus preguntas persistentes, que sin ellas no fortalecería mi entendimiento global.

De igual modo a la Dra. Viridiana Olín Sandoval, quien me mostró el camino a ser más preciso con las palabras.

Mi gratitud para la Dra. Adela Rodríguez Romero, perteneciente al Instituto de Química de la UNAM, por su gran apoyo en el uso del difractor y resolución de preguntas.

Además, al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro, adscrito al Laboratorio Nacional de Genómica y Biodiversidad CINVESTAV-Irapuato por su apoyo con material y equipos.

Al Dr. Alberto Olivares Reyes y sus estudiantes, por solventar la falta de equipo sonicador.

Y por supuesto, a mi compañera de laboratorio, Jessica por ser muy crítica en cualquier situación, lo cual se fomenta en mi cada día.

Sin olvidar el gran soporte otorgado por Ricardo y Manuel del laboratorio 30, que en momentos de auxilio siempre capaces y ávidos de colaborar.

Desde luego a todos los compañeros estudiantes y personal de la comunidad de nuestro departamento que contribuyeron con su valioso tiempo, algún material o inclusive algunas dudas, permitieron dar avance día a día a nuestro proyecto.

Dedicatorias:

A mi hija Suemy, por ser mi aliento improvisado, el último respiro que me permite seguir. Gracias por llegar en el mejor momento.

A mí esposa Magaly, por su tolerancia, paciencia y fortaleza a pesar de la distancia. Mi gratitud por seguir en pie de lucha.

A mi familia y amigos que creyeron en mí, en que con trabajo y constancia todo es posible. El agradezco sus palabras de apoyo.





## RESUMEN

La dineína citoplásmica humana-1 (dineína) es un motor molecular intracelular. Su peso molecular en forma homodimérica es de 1.4 MDa, constituido de dos copias de 6 subunidades distintas. La dineína está relacionada filogenéticamente con la familia de motores moleculares de transportadores, también la miosina V y kinesina-1 pertenecen también a la misma familia. Pero a contraria a la polaridad de la kinesina I, la dineína se orienta en sentido retrógrado sobre los microtúbulos, es decir, polariza sus movimientos de membrana plasmática hacia el núcleo celular. Los motores moleculares, son encontrados únicamente en células eucariontes. Recientemente, se describió la estructura de la dineína completa en su forma autoinhibida obtenida mediante criomicroscopía electrónica. En la forma autoinhibida de la dineína, la estructura del dominio tallo tuvo una resolución promedio de 8.4 Å, suficiente para observar solo la estructura secundaria. Por otra parte, para realizar el transporte de cualquier tipo de cargamento (vesículas u organelos principalmente), la dineína, necesita de proteínas cofactoras, tales como: dinactina y adaptador de carga. En cuanto al papel de cada una, la dinactina funciona como un andamio para unir al tallo de la cadena pesada de la dineína y a una amplia variedad de proteínas adaptadoras de cargamento, que van ancladas una vesícula u organelo. Además, se ha descubierto que, dependiendo del tipo de adaptador de carga que interactúe en la formación del macrocomplejo, promueve el número de dineínas a reclutar. Con el fin de conocer las interacciones que tienen lugar en la formación del macrocomplejo dineína-dinactina-adaptador de carga, es necesario obtener estructuras a resolución a atómica mediante cristalografía de rayos-X. El acercamiento que utilizamos para resolver este proyecto fue: el de expresar fragmentos recombinantes del dominio tallo N-terminal de la cadena pesada de la dineína, purificarlos e inducir cristales, optimizando con condiciones previamente utilizadas en el laboratorio. Inicialmente trabajamos con el fragmento 1-561 aa, que contiene un segmento del dominio del tallo logrando optimizar los cristales generados hasta alcanzar alta reproducibilidad, pero los resultados de cada reflexión fueron de baja resolución en su patrón de difracción (5.3 Å). Por ello, para tener una mejora en la resolución, el gen de esta proteína fue truncado codón por codón desde el extremo carboxilo. Generamos 15 fragmentos de proteína de distinto tamaño (1-560;546 aa), todo amplificado a partir de la construcción que produce el fragmento 1-561 aa, que también es parte del dominio del tallo. Los fragmentos fueron purificados y recuperados para la inducción de cristales en las mismas condiciones de la proteína 1-561 aa. De los 15 productos de traducción purificados, sólo el fragmento 1-560 aa y tras el proceso de optimizado, presentó cristales de tamaño y grosor mayor, con respecto al fragmento 1-561 aa inducidos por el método de microbatch. El método de microbatch, nos permitió modificar múltiples parámetros para optimizar, ya que cada mezcla de reactivos resultó en diferentes morfologías cristalinas de los fragmentos mencionados. Otra técnica de optimización que se utilizó fue la gota colgante, con la que llevamos a cabo cambios puntuales, uno de ellos fue sustituir la molécula amortiguadora, que resultó en generar cristales reproducibles en tamaño y forma, entre otras aplicadas al segmento 1-560 aa. Mediante esta técnica, comprobamos que la reducción de un aminoácido confiere con mayor estabilidad al fragmento proteico, ya que, al llevar a cabo su proceso de cristalización y difracción, aumenta el número de reflexiones y la resolución (5.0 Å). Sin embargo, el número de reflexiones y resolución, en ambos patrones de difracción (fragmentos 561 y 560 aa), no fue el suficiente para obtener un conjunto de datos adecuado para resolver la estructura. Como perspectiva, se planea optimizar aún más los cristales del fragmento 560 aa mediante cambios en la concentración de la proteína, temperatura y métodos de cristalización hasta obtener un patrón de difracción para generar un conjunto de datos adecuado.

## ABSTRACT

Human cytoplasmic dynein-1 (dynein) is an intracellular molecular motor. The molecular weight of homodimeric form is 1.4 MDa and it consists of two copies of 6 different subunits. Dynein is phylogenetically related to the processive molecular motor family, although myosin V and kinesin-1 grouped to same family. While kinesin polarity is oriented to the plus end of the microtubules, i.e. cellular nucleus towards the plasmatic membrane, dynein polarity is oriented to the minus end. Molecular motors are found only in eukaryotic cells. Recently, the structure of the autoinhibited configuration of complete dynein was described by Cryo-electron microscopy. The average resolution of the tail domain in this structure is 8.4 Å, enough to observe only the secondary structure. On the other hand, to activate the processive movement, dynein needs cofactor proteins: Dynactin and cargo adaptors. Dynactin works as a support for the interaction with the tail domain of dynein and for a wide variety of cargo-adaptors for transport of vesicles or even organelles. In addition, it has been discovered that depending of the cargo adaptor that interacts with the complex, it recruits one or two dyneins. In order to study the interactions that take place in the formation of the complex dynein-dynactin-cargo adaptor, it is necessary to obtain structures at atomic resolution by X-ray crystallography. The approach we used to solve this project was to clone, purify and induce crystals of the recombinant fragments of the N-terminal tail domain of dynein's heavy chain, optimizing the crystallization condition previously used in the laboratory. Initially, we worked with the fragment 1-561 aa, this fragment contains the segment of dynein's tail domain that interacts with dynactin and cargo adaptors. We optimized the purification and the crystal production until we got high reproducibility. However, the resolution of its pattern of diffraction was poor, not enough to solve a high resolution structure (5.3 Å). Therefore, to obtain an improvement in the resolution, the gene of this protein was truncated codon by codon from the carboxyl end. We produced 15 fragments of this protein varying in size (1-560; 546 aa). These fragments were amplified from the original construction 1-561 aa, corresponding to the tail domain. The fragments were purified, and incubated for the induction of crystals on the same conditions of the protein 1-561 aa. From the 15 purified proteins, only the fragment 1-560 aa produced crystals with greater size and thickness, compared with crystals of the fragment 1-561 aa. This new crystals grew after the optimization process by microbatch method. The microbatch crystallization method allowed us to modify multiple parameters to optimize each mixture of reagents, generating different crystalline morphology from the fragments above mentioned. Another optimization technique that was used in this study, was the hanging drop. With that technique, we carry out fine changes, one of them was replacing the buffer reagent, this variable produced highly reproducible crystals in size, shape and thickness, using the segment 1-560 aa. With this technique, we proved that the truncation of one amino acid from the C-terminus, produces a protein fragment with greater stability, because, when carrying out its crystallization and diffraction process, it increases the number of reflections and the resolution of the pattern (5.0 Å). However, the number of reflections and resolution, in both diffraction patterns (fragments 561 and 560 aa), was not sufficient to collect an adequate dataset to solve the structure. As a perspective, we are planning to further optimize the crystals of the fragment 560 aa by changing the protein concentration, temperature and by using other crystallization methods to obtain a better diffraction pattern to generate an adequate dataset to solve the atomic structure and to propose a mechanism for the binding for the complex dynein-dynactin-cargo adaptor.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÍNDICE</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. CITOESQUELETO</b> .....	1
1. 1. 1. Actina .....	2
1. 1. 2. Filamentos intermedios .....	3
1. 1. 3. Microtúbulos .....	4
<b>1.2. MOTORES MOLECULARES</b> .....	5
1. 2. 1. Miosina .....	6
1. 2. 2. Kinesina .....	7
<b>1.3. DINEÍNA</b> .....	8
1. 3. 1. Dineína axonemal .....	9
1. 3. 2. Dineína citoplásmica .....	10
<b>1. 4. PROTEÍNAS COFACTORAS ASOCIADAS A LA DINEÍNA</b> .....	12
1. 4. 1. Dinactina .....	12
1. 4. 2. Adaptadores de carga .....	13
<b>1.5 REGULACIÓN DE LA DINEÍNA</b> .....	17
1. 5. 1. Ciclo mecanoquímico .....	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>4.1. General</b> .....	21

<b>4. 2. Específicos</b> .....	21
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	22
5.1. Producción de células competentes de <i>Escherichia coli</i> , cepas TOP10 y SoluBL21...	22
5. 2. Procedimiento para transformación de células <i>Escherichia coli</i> competentes por medio de choque térmico. ....	24
5. 3. Prueba de eficiencia para células <i>Escherichia coli</i> competentes. ....	26
5. 4. Extracción de DNA plasmídico (pDNA) por lisis alcalina (minipreps).....	27
5. 5. Preparación de geles de agarosa al 0.8%. ....	29
5. 6. Electroforesis en gel de agarosa.....	29
5. 7. Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	30
5. 8. Preparación de geles de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio(SDS). 31	
5. 9. Electroforesis en geles de acrilamida al 8% (SDS-PAGE) de extracto total y proteína purificada. ....	32
5. 10. Ensayos de sobre-expresión de proteínas (Perfiles de expresión, PE) .....	34
5. 11. Preparación de macrocultivos.....	35
5. 12. Lisis celular por sonicación .....	35
5. 13. Purificación de proteínas por HPLC (1er paso por columna IMAC) .....	36
5. 14. Diálisis de proteínas.....	38
5. 15. Digestión con la proteasa TEV.....	39
5. 16. Obtención del fragmento digerido por HPLC (2do paso por columna IMAC).....	40
5. 17. Filtración por cambio de amortiguador.....	40
5. 18. Purificación por filtración molecular.....	40
5. 19. Inducción de cristalización. ....	42
5. 20. Captura de cristales optimizados. ....	46
5. 21. Difracción de rayos X. ....	47
<b>6. RESULTADOS</b> .....	51

6. 1. Primers diseñados con mutaciones para producir fragmentos con un aminoácido menos, a partir del plásmido con el gen del fragmento 1-561 aa (p1855). .....	51
6. 2. Gel de agarosa al 0.8% con productos de PCR obtenidos de los primers diseñados con un aminoácido menos a partir del gen que traduce el fragmento 561 aa. ....	52
6. 3. Condiciones seleccionadas de los perfiles de expresión (PE) de cada fragmento sobre-expresado y su localización en la estructura de la dineína. ....	53
6. 4. PE del fragmento sobre-expresado en célula completa de la cepa SoluBL21 <i>E. coli</i> . por SDS-PAGE .....	54
6. 5. Cromatograma correspondiente a la primera fase de purificación por columnas IMAC. ....	54
6. 6. SDS-PAGE del monitoreo de las diferentes fracciones eluidas de la primera fase de purificación por columnas IMAC. ....	55
6. 7. Comprobación por SDS-PAGE típica de la digestión por la proteasa TEV. ....	56
6. 8. Cromatograma de filtración molecular incluyendo el método de centrifugación por cambio de amortiguador del fragmento de 561 aa. ....	57
6. 9. Ejemplo de cromatograma de filtración molecular del fragmento 560 aa con diálisis sustituyendo el método de centrifugación por cambio de amortiguador. ....	57
6. 10. Análisis de las fracciones eluidas del fragmento 560 aa por SDS-PAGE. ....	58
6. 11. Configuración global de una caja con LM para optimizar cristales de proteína. ....	59
6. 12. Comparación de los cristales optimizados por método de microbatch y gota colgante de los fragmentos 560 y 561 aa. ....	60
6. 13. Cristales optimizados del fragmento 560 aa modificando las concentraciones de la proteína total. ....	61
6. 14. Patrón de difracción obtenido de cristal optimizado por el método de gota colgante del fragmento de 561 aa. ....	62
6. 15. Patrón de difracción de cristal optimizado por gota colgante del fragmento 560 aa. ....	63
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	64
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	68
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	69

<b>10. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>70</b>
<b>10. 1. Protocolo para la preparación de marcadores de peso molecular para DNA ...</b>	<b>70</b>
10. 1. 1. Extracción de pDNA por lisis alcalina (maxipreps, Untergasser, 2006).....	70
10. 1. 2. Digestiones analíticas de pPSU1 y pPSU2 .....	72
10. 1. 3. Estandarización de los Marcadores de PM 1kb(EcoRV) y 100 bp(PstI).....	74
<b>10. 2. Purificación de la proteasa TEV en columnas IMAC.....</b>	<b>75</b>
10. 2. 1. Cromatograma típico de la purificación de la enzima TEV. ....	77
10. 2. 2. SDS-PAGE característico de las fracciones eluidas de la proteasa TEV recombinante.....	77
<b>10. 3. PE de los productos de traducción, fragmentos truncados del segmento 1-561 aa del tallo de la HC. ....</b>	<b>78</b>
<b>10. 4. PE de los productos de traducción, fragmentos cercanos al linker de la HC del tallo de la dineína.....</b>	<b>81</b>
<b>10. 5. Optimización de los fragmentos de tallo amino terminal.....</b>	<b>84</b>
<b>11. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>87</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1: Componentes del citoesqueleto de una célula eucariótica. ....	1
Figura No. 2: Formas de la actina. ....	2
Figura No. 3: Modelo estructural de los filamentos intermedios. ....	3
Figura No. 4: Representación de los microtúbulos y sus componentes. ....	5
Figura No. 5: Reconstrucciones estructurales de las 3 familias de motores moleculares citoesqueléticos.....	6
Figura No. 6: Estructura general de la miosina motora con movimiento procesivo. ....	7
Figura No. 7: Kinesina-1 motor molecular de células eucariontas.....	8
Figura No. 8: Localización de las diferentes clases de dineína. ....	9
Figura No. 9: Organización estructural de los cilios y flagelos en células eucariontas. ....	10
Figura No. 10: Modelos estructurales de la dineína. ....	11
Figura No. 11: Reconstrucción tridimensional de la partícula phi de la dineína completa obtenida por criomicroscopía electrónica. ....	11
Figura No. 12: Los movimientos de los diferentes tipos tanto de dineína como de kinesina se encuentran polarizados y coordinados. ....	12
Figura No. 13: Estructura de la dinactina adquirida por criomicroscopía electrónica a 4 Å de resolución. ....	13
Figura No. 14: Localización diversa de los diferentes adaptadores de carga relacionados a la dineína.....	14
Figura No. 15: La dineína forma un macrocomplejo con la dinactina y BICD2.....	15
Figura No. 16: El tipo de adaptador de carga establece el número de dineínas. ....	16
Figura No. 17: Ensayos de fuerza con dineína completa por el método de trampa óptica.....	16
Figura No. 18: Diferentes conformaciones en el citoplasma.....	17
Figura No. 19: Regulación de la dineína. ....	18
Figura No. 20: Ciclo mecanoquímico de la dineína. ....	19
Figura No. 21: Vector pRSET con inserto del fragmento 1-561 aa.....	25
Figura No. 22: Representación de la transformación de células competentes. ....	25
Figura No. 23: Comportamiento de la curva usando columna IMAC y coordinada con catión Ni <sup>2+</sup> . ....	36
Figura No. 24: Estructura la proteasa TEV resuelta a 2.7 Å.....	39

Figura No. 25: Funcionamiento de una columna de filtración molecular. ....	41
Figura No. 26: Diagrama de fases de la cristalización de proteínas. ....	43
Figura No. 27: Disposición general de una caja de microbatch. ....	44
Figura No. 28: Representación general del método de gota colgante montado. ....	46
Figura No. 29: Componentes y procesos de la difracción de rayos X. ....	47
Figura No. 30: Representación de la Ley de Bragg. ....	48
Figura No. 31: Funcionamiento de un difractómetro de laboratorio. ....	49
Figura No. 32: Análisis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR. ....	52
Figura No. 33: Ubicación correspondiente de cada fragmento de la dineína. ....	53
Figura No. 34: Representación de PE del fragmento 560 aa. ....	54
Figura No. 35: Cromatograma correspondiente al segmento 560 aa. ....	54
Figura No. 36: Corrimiento electroforético representativo de las fracciones colectadas por elución en columnas IMAC. ....	55
Figura No. 37: Estandarización de la digestión por la proteasa TEV. ....	56
Figura No. 38: Curvas cromatográficas típicas de la filtración molecular del fragmento 561 aa. ....	57
Figura No. 39: Curvas cromatográficas características por filtración molecular del fragmento 560 aa. ....	57
Figura No. 40: SDS-PAGE de las fracciones por filtración molecular seleccionadas. ....	58
Figura No. 41: Diseño básico de una caja de LM. ....	59
Figura No. 42: Diferentes cristales obtenidos con el fragmento 561 y 560 aa. ....	60
Figura No. 43: Cristales optimizados por el método de microbatch y gota colgante. ....	61
Figura No. 44: Patrón de difracción del fragmento 561 aa. ....	62
Figura No. 45: Patrón de difracción adquirido del fragmento 560 aa cristalizado. ....	63



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1: Modo de preparación de medio sólido LB.....	23
Tabla No. 2: Caldo super óptimo (SOB).....	23
Tabla No. 3: Elaboración del amortiguador CCMB80.....	23
Tabla No. 4: Solución de lisis alcalina I.....	28
Tabla No. 5: Solución de lisis alcalina II.....	28
Tabla No. 6: Solución de lisis alcalina III.....	28
Tabla No. 7: Componentes del amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE)10X.....	29
Tabla No. 8: Elementos necesarios para PCR.....	30
. Tabla No. 9: Digestión con enzima de restricción DpnI.....	30
Tabla No. 10: Componentes y cantidades del amortiguador de muestra.....	32
Tabla No. 11: Elementos necesarios para preparar amortiguador de cátodo.....	33
Tabla No. 12: Caldo para cultivo bacteriano Luria-Bertani(LB).....	34
Tabla No. 13: Caldo para cultivo bacteriano 2XYT.....	34
Tabla No. 14: Ingredientes para amortiguador A.....	35
Tabla No. 15: Amortiguador de elución B.....	37
Tabla No. 16: Preparación de amortiguador TEV 5X.....	38
Tabla No. 17: Secuencias de los oligonucleótidos y sus productos de traducción.....	51
Tabla No. 18: Perfiles de expresión de los segmentos amino-terminal HC del tallo.....	53
Tabla No. 19: Perfiles de expresión elegidos. Zona carboxilo terminal HC del tallo.....	53

# ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>Actina F</b>	Actina Filamentosa
<b>Actina G</b>	Actina globular
<b>ADP</b>	Difosfato de adenina
<b>Amp<sub>100</sub></b>	Ampicilina a 100 mg/mL
<b>Arp</b>	Proteína relacionada actina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenina
<b>BICD2</b>	Proteína homóloga 2 bicaudal D
<b>BICDR1</b>	Proteína homóloga relacionada BICD
<b>BME</b>	β-mercaptoetanol
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CCMB80</b>	Amortiguador 80 del Centro de Biología celular y molecular
<b>Dineína</b>	Dineína citoplásmica humana 1
<b>Dineína phi</b>	Forma autoinhibida
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm.
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EBI</b>	European Bioinformatics Institute
<b>EC</b>	Comisión de enzimas
<b>FPLC</b>	Cromatografía líquida directa de proteínas
<b>GDP</b>	Difosfato de guanina
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanina
<b>HC</b>	Cadena Pesada
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
<b>Hook3</b>	Proteína 3 de anclaje a microtúbulos
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>IC</b>	Cadena intermedia
<b>IDA</b>	Brazo interno de la dineína axonemal
<b>IF</b>	Filamentos intermedios
<b>kb</b>	Kilobases

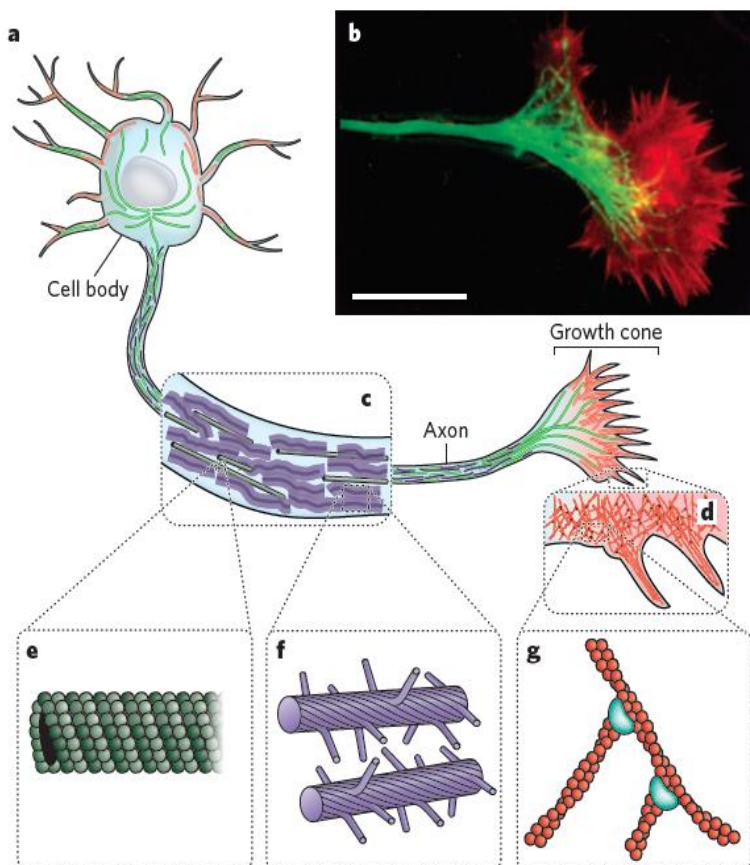
<b>LC</b>	Cadena ligera
<b>Lc8</b>	Cadena ligera de 8 kDa
<b>LIC</b>	Cadena intermedia ligera
<b>LM</b>	Licor madre
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Magnesio
<b>Min</b>	Minutos
<b>MOPS</b>	Ácido 4-moffolinopropanosulfónico
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MT</b>	Microtúbulo
<b>MTOC</b>	Centro organizador de los microtúbulos
<b>MWCO</b>	Punto de corte por peso molecular promedio
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ODA</b>	Brazo externo de la dineína axonemal
<b>OV</b>	Toda la noche
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PE</b>	Perfil de expresión
<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>PMSF</b>	Fluoruro de benzilsulfonilo
<b>pPSU</b>	Plásmido de la Universidad Estatal de Penn
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>Rab</b>	Proteína relacionada a RAS
<b>rfc</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Robl</b>	Road Block
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>Seg</b>	Segundos
<b>Supl.</b>	Suplementario(a)

<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA
<b>TcTex</b>	Proteína homóloga 1 a complejo testicular humano T
<b>TEMED</b>	N, N, N, N-Tetrametiletilendiamina
<b>TES</b>	Acido N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico
<b>TEV</b>	Virus del mosaico del tabaco
<b>Tris-base</b>	2-amino-2-(hidroximetil)-1-3-propanediol
<b>UV</b>	Ultravioleta

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1. CITOESQUELETO

Todas las células eucariontes, son capaces de reorganizar su estructura y componentes internos durante su crecimiento, división o adaptación de acuerdo con las condiciones ambientales, con el propósito de mantener una forma definida (Alberts, et, al, 2015). Las funciones mecánicas, motoras y espaciales dependen de un importante sistema de filamentos conocido como citoesqueleto. Dicho sistema no sólo le permite a la célula organizarse internamente, sino que también le sirve para interactuar directamente con otras células, habilita la comunicación entre las células por medios mecánicos (por ejemplo, motilidad) o químicos (como la quimiotaxis) dependiente del gasto de energía en forma de ATP (Fletcher & Theriot, 2004). Intracelularmente, el citoesqueleto funciona también como vía de transporte para vesículas, organelos, etc. Este transporte es llevado a cabo por proteínas motoras o motores moleculares (Fletcher & Mullins, 2010). Ver figura No. 1.



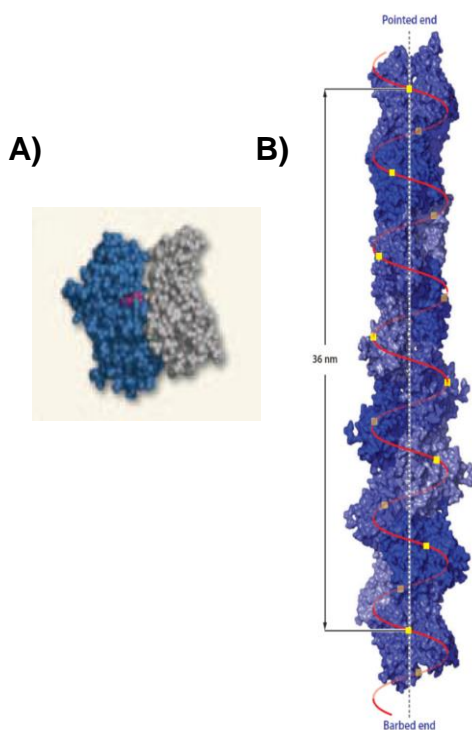
**Figura No. 1: Componentes del citoesqueleto de una célula eucarionte.**

**a)** Neurona. Éstas se caracterizan por tener proyecciones que sirven para formar el sistema nervioso. **b)** Microfotografía de fluorescencia de una célula neuronal migrando durante la formación del sistema nervioso, el color verde corresponde a los microtúbulos y el rojo a la red de filamentos de actina. **c)** El recuadro resalta una sección del axón, donde hay un grupo de filamentos intermedios (en el caso de la neurona se les conoce como neurofilamentos y coloreados en morado), forman una matriz de soporte para los microtúbulos (en verde), que sirven para llevar procesos sinápticos y tráfico intracelular. **d)** Protrusiones de las células dendríticas creadas a partir de las diferentes configuraciones de los filamentos de actina (en rojo), a estas se les conoce como filopodios (forma alargada) y la extensión o aplanamiento se le conoce como lamelipodios (en forma de "sábana"). **e)** Microtúbulos, estos consisten de un arreglo de 13 protofilamentos de dímeros de tubulina, organizados en tubo hueco. **f)** Los filamentos intermedios contienen proyecciones flexibles compuestos del mismo polímero, que son capaces de interactuar con otros filamentos de su misma especie y en el caso de neuronas determina el radio del axón. **g)** Filamentos de actina (en rojo) y puntos de nucleación promovidos por una proteína accesoria (en azul). Tomado de Fletcher & Mullins, 2010.

El citoesqueleto está constituido principalmente por 3 familias de proteínas poliméricas filamentosas intracelulares. Cada una, con diferentes propiedades que le permiten al citoesqueleto ser muy dinámico y adaptable (Drubin & Hirokawa, 1998).

### 1. 1. 1. Actina

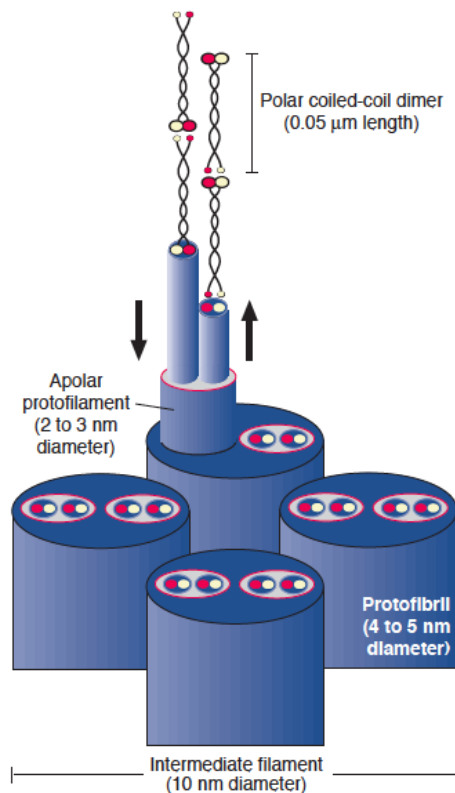
Primer componente del citoesqueleto, la actina es hallada normalmente en forma homodimérica y globular (actina G). Es un polipéptido de 375 aminoácidos y posee una hendidura donde se aloja una molécula de ATP o ADP (ver figura No. 2). Los filamentos de actina (actina F), necesitan actina G para su formación. También, para su elongación deben existir puntos de nucleación preexistentes que servirán para promover la construcción de los microfilamentos. Su morfología fue deducida con la técnica criomicroscopía electrónica (ver figura No. 2), con la que se estableció que son fibras helicoidales dextrógiras de 8 nm de diámetro. Además, son considerados los componentes más abundantes en células eucariontes (Dominguez & Holmes, 2011). Pueden organizarse en amplia variedad de configuraciones, por ejemplo, en grupos fibrilares unidireccionales y bidireccionales, redes bidimensionales o tridimensionales. Debido a su gran adaptabilidad, los microfilamentos están distribuidos en toda la célula; pero sobretodo, altamente concentrados en el córtex (ubicado debajo de la membrana plasmática). Con respecto a su función, los filamentos de actina participan en los procesos de motilidad, soporte, durante la citocinesis o como vías de tráfico intracelular (Carlsson, 2010).



**Figura No. 2: Formas de la actina.** A) Actina G o globular, observamos en color gris y azul las subunidades que conforman el dímero que, además, en medio, se encuentra una hendidura donde hay una molécula de ATP o ADP señalada en rojo. Imagen obtenida por microscopía electrónica. B) Actina F o filamentososa, es una serie de monómeros de actina G, un giro completo necesita de 13 moléculas y que al final generan una longitud de 38 nm, el extremo en punta de flecha es de baja polimerización y el barbado el de mayor polimerización, esta imagen fue obtenida por criomicroscopía electrónica. Tomado de Dominguez & Holmes, 2011

### 1. 1. 2. Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios (IF) son encontradas sólo en células eucariontes. Los IF son abundantes en el citoplasma y se encuentran sometidos a estrés mecánico constante, por ejemplo: en neuronas, células musculares, piel, etc. Poseen un diámetro de aproximadamente 10 nm. La estructura global de los IF está compuesta por  $\alpha$ -hélices en la región central, está compuesto por alrededor de 300 aminoácidos, también es conocido como dominio de “barra”; se encuentra flanqueado por un dominio cabeza no  $\alpha$ -hélice (extremo amino) y por el dominio del tallo, estas dos zonas pueden variar en cuanto a tamaño y número de aminoácidos (Léoinoux-Chambaud & Eyer, 2013). La arquitectura de los IF comprende de dos dímeros unidos de forma antiparalela produciendo un protofilamento; un filamento, compuesto de 8 protofilamentos (ver figura No. 3). Algunos tipos de IF, son la queratina, la cual es rígida y cuya función es principalmente es de soporte; caso contrario la laminina, que se encuentra formando la lámina nuclear, que es muy dinámica y flexible. En fibroblastos, se ponen de manifiesto tales propiedades, ya que su disociación y reasociación dependen de las etapas del ciclo celular (Cleveland & Fuchs, 1998).

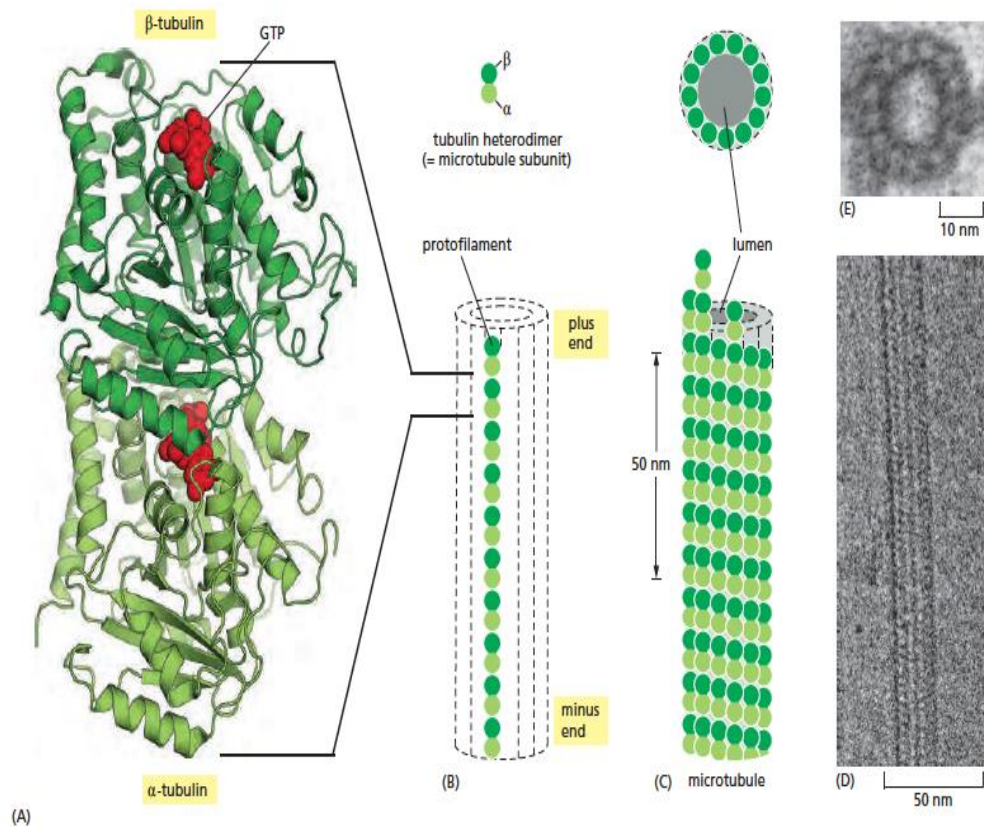


**Figura No. 3: Modelo estructural de los filamentos intermedios.** Los dímeros de las IF forman tetrámeros, están asociados longitudinal y lateralmente en protofilamentos de 2 a 3 nm de diámetro, después estos forman protofibrillas de 4 a 5 nm. Entre 2 a 4 protofibrillas se asocian para producir un entramado superenrollado compuesto de aproximadamente de 16 a 32 polipéptidos como se observa en el corte transversal de las estructuras. Tomado de Cleveland & Fuchs, 1998.

### 1. 1. 3. Microtúbulos

Los microtúbulos (MT) son polímeros cilíndricos alargados y que contienen en su interior a la matriz microtubular, compuestos de proteína soluble tubulina localizada en el citoplasma de células eucariontes. La tubulina es una proteína heterodimérica compuesta por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que están unidas por enlaces no covalentes, cada monómero de tubulina está constituido en promedio por 450 aa. La estructura monomérica de la  $\alpha$ -tubulina, se encuentra unida de forma irreversible (no intercambiable), a una molécula de GTP dentro de la interfase heterodimérica, de modo que mantiene inactiva a la tubulina  $\alpha$ . Sin embargo, en la  $\beta$ -tubulina podemos hallar una molécula de GTP o de GDP, lo que significa que es hidrolizable, lo cual determina la polimerización-despolimerización de los microtúbulos (también conocido “catástrofe-recuperación”) (Hemmat, et. al., 2018). Los heterodímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina se asocian para formar un círculo con 13 protofilamentos que constituyen la estructura básica de un MT. Los MT tienen un diámetro de 25 nm (Ver figura No.4), siendo mucho más rígidos que los filamentos de actina. Los MT se organizan a partir de los centros organizadores de microtúbulos (o MTOC por sus siglas en inglés). También llamado centrosoma, está constituido por 2 centriolos y de una matriz pericentriolar en la cual se encuentra la tubulina  $\gamma$ . Uno de los comportamientos más interesantes de los MT, es la polaridad, que está dada por la subunidad que favorezca la unión de la molécula energética y, por ende, hace posible la polimerización en un solo sentido, de modo que la tubulina- $\beta$  es la responsable de la hidrólisis del GTP a GDP se le considera como el extremo positivo, todo esto proveniente desde el MTOC. Esto también afecta de forma global a la estructura heterodimérica ya que sufre cambios conformacionales que le permiten ganar afinidad hacia la tubulina- $\alpha$  que, por deducción, es la subunidad sin actividad hidrolítica considerada como el extremo negativo (Lodish, et. al., 2016). En células eucariontes, los microtúbulos son altamente dinámicos y desempeñan diversos papeles dentro de las células, por ejemplo, segregación cromosomal durante la mitosis, motilidad (en el caso de cilios y flagelos), plasticidad celular y sobre todo permiten el tráfico intracelular mediado por motores moleculares, ya sea por kinesina o dineína (Kavallaris, 2010).

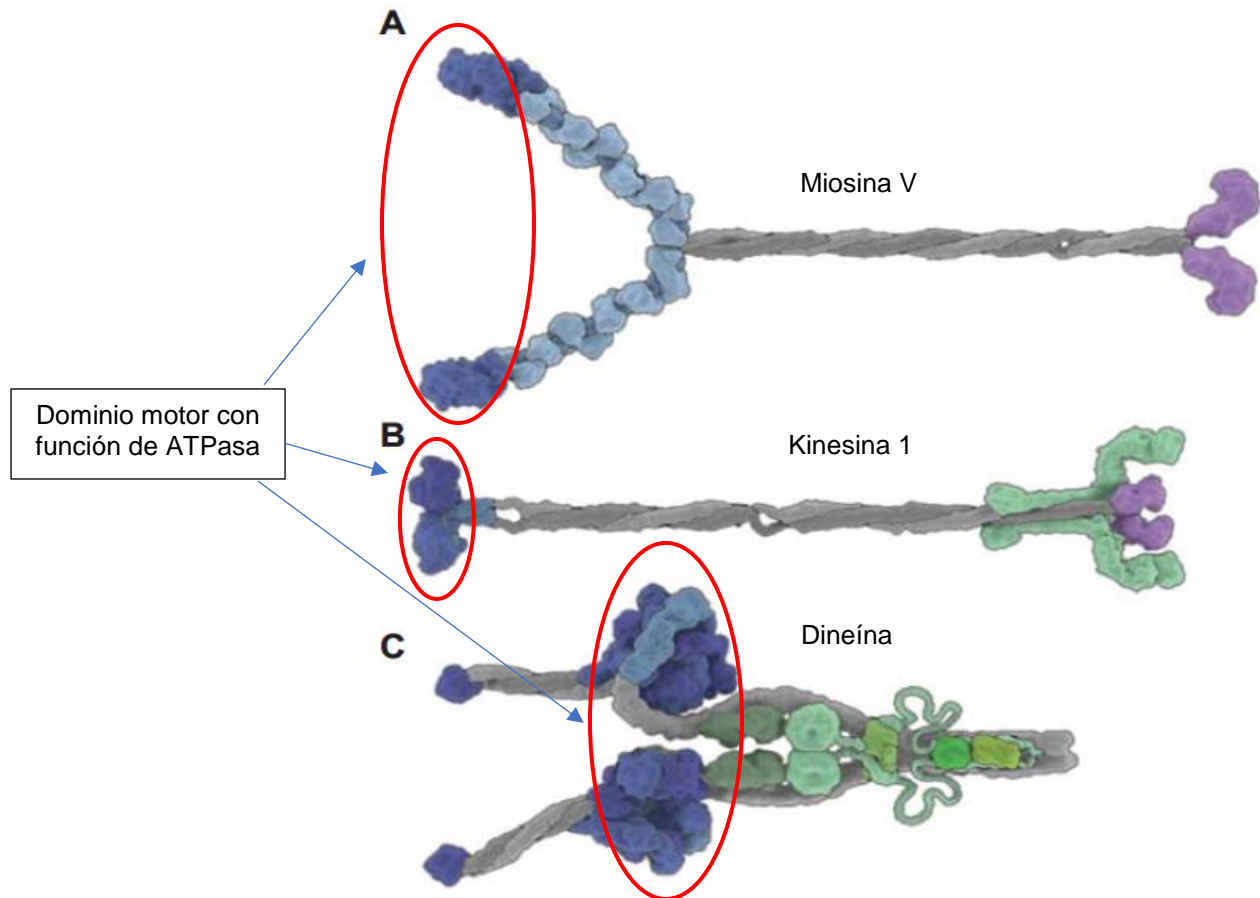




**Figura No. 4: Representación de los microtúbulos y sus componentes.** A) Heterodímero de tubulina, en verde claro se encuentra la  $\alpha$ -tubulina y la  $\beta$ -tubulina en verde oscuro, la molécula en rojo es el GTP. B) Polaridad del MT, donde la orientación se encuentra en el extremo menos la  $\alpha$ -tubulina y en el positivo la  $\beta$ -tubulina, cada heterodímero constituye una subunidad del microtúbulo. C) Microtúbulo construido a partir de 13 protofilamento en forma circular y dejando un espacio luminal (hueco). D) Fragmento de un MT visto lateral y longitudinalmente por microscopía electrónica. E) Corte transversal de un MT observado por microscopía electrónica, donde claramente podemos ver la organización en forma de anillo. Tomado de Alberts, 2015

## 1.2. MOTORES MOLECULARES

Los motores moleculares son complejos multiproteicos que se desplazan a lo largo de los filamentos del citoesqueleto (principalmente de actina y microtúbulos) haciendo uso de la energía generada por la hidrólisis del ATP por su dominio de ATPasa (Howard, 1997). Solo las células eucariontes poseen proteínas motoras, que son las encargadas de movilizar a los organelos, cambiar la morfología durante la locomoción y división celular. También participan en el transporte de cargamento en los procesos de tráfico intracelular de vesículas en la vía secretora y endocítica (Schliwa & Woehlke, 2003; Ross, et. al., 2008). Existen 3 familias de motores moleculares citoplasmáticos. Ver figura No. 5.

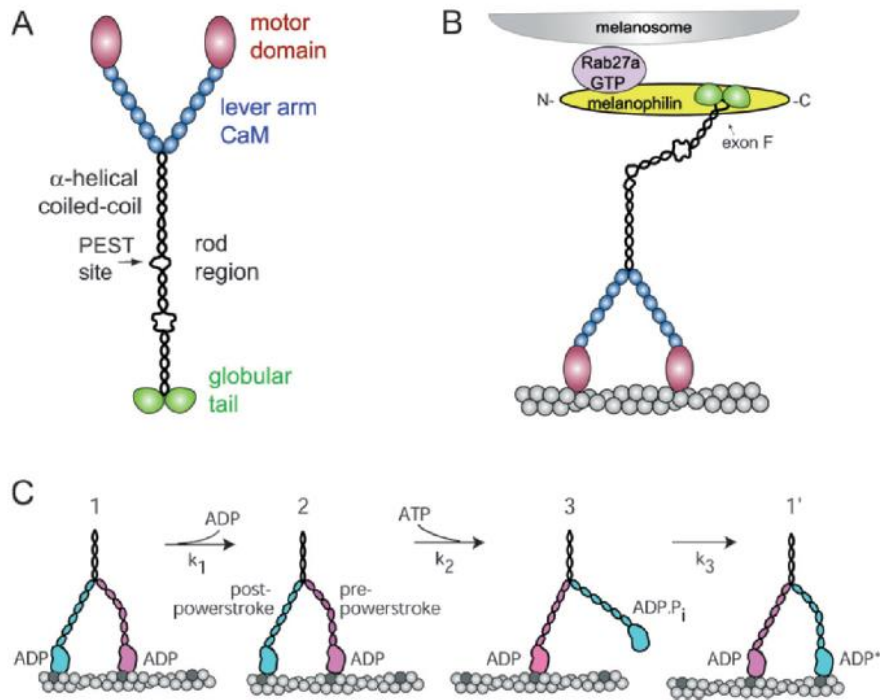


**Figura No. 5: Reconstrucciones estructurales de las 3 familias de motores moleculares citoesqueléticos.** A) Miosina V. Son motores que unen a filamentos de actina, presentan movimiento procesivo y lo llevan a cabo sobre los filamentos de actina para el transporte, principalmente, de vesículas. B) Kinesina-1. Este motor molecular dimérico involucrado en transporte vesicular y de RNA mensajero (mRNA), sus movimientos son conocidos como “mano a mano” y en sentido anterógrado a través de los microtúbulos. C) Dineína citoplásmica humana 1 (o sólo dineína). Es el motor molecular más complejo, encontrado en citoplasma y de mayor tamaño con respecto de la miosina V y kinesina-1, es encontrado en forma dimérica, las polaridades de sus movimientos son retrógrados y llevados a cabo por medio de los microtúbulos. El color gris representa las cadenas pesadas; el azul oscuro, el dominio motor; el azul claro, el brazo palanca o linker (en el caso de la dineína); las diferentes tonalidades de verde representan las diferentes subunidades en cada motor molecular; finalmente, las tonalidades de morado denotan los sitios de unión microtúbulos o filamentos de actina según sea el caso. Modificado de Carter, 2013

### 1. 2. 1. Miosina

Familia comprendida por 17 miembros hasta ahora conocidos, son proteínas motoras que se unen a los filamentos de actina, su interacción y movimiento se debe a la energía generada por hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) (Hodge & Coper, 2000). En las células eucariontes, solamente la miosina tipo V es la que tiene propiedad transportadora de cargamento (ver figura No. 6), a diferencia de la miosina tipo II, encargada de la generación de movimientos de contracción muscular (Llinas, et. al., 2012). Las funciones de la miosina tipo V son transportar componentes celulares como vesículas y principalmente organelos, además

de coordinar la formación y mantenimiento de extensiones celulares tales como: filopodios, microvellosidades, estereocilios y lamelipodios. Se sabe que la distancia que recorre paso la miosina V por cada es de 35 nm. Cuando se encuentra en estado inactivo, ésta permanece en una forma autoplegada (Trybus, 2008).

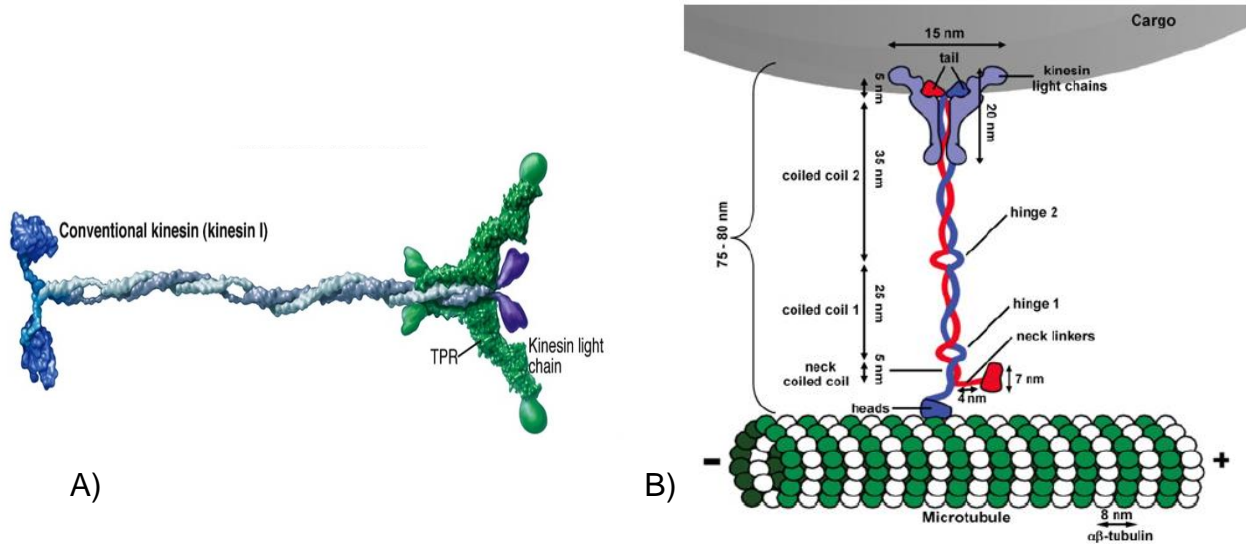


**Figura No. 6: Arquitectura general de la miosina con movimiento procesivo.** A) Dominios o subunidades que componen la miosina tipo V. B) La miosina V necesita de otros cofactores o proteínas accesorias para activar el movimiento transportador y llevar a cabo el transporte vesicular sobre los filamentos de actina. C) Mecanismo productor de movimientos utilizando la energía de la hidrólisis del ATP. Tomado de Llinas, et. al., 2012

## 1. 2. 2. Kinesina

Existen 14 miembros en células eucariontes, la kinesina 1, mejor conocida como kinesina convencional, es el motor molecular más estudiado (Hirokawa, et. al., 2009). Sus funciones son realizadas en el citoesqueleto, específicamente en los MT, los cuales sirven como vías de transporte donde ejerce la mayoría de sus procesos intracelulares, tales como: transporte de organelos, mRNA y de cromosomas. La kinesina II se encarga del transporte intraflagelar (IFT), ver figura No.12 (Lodish, et. al, 2016). Como todo motor molecular, hace uso de la energía producida por la hidrólisis del ATP para llevar a cabo sus movimientos a través de los microtúbulos y transportar su cargamento (Vale, 2003). En células neuronales y epiteliales tienen un gran papel para transportar vesículas secretorias. La kinesina-1 tiene similitud con la

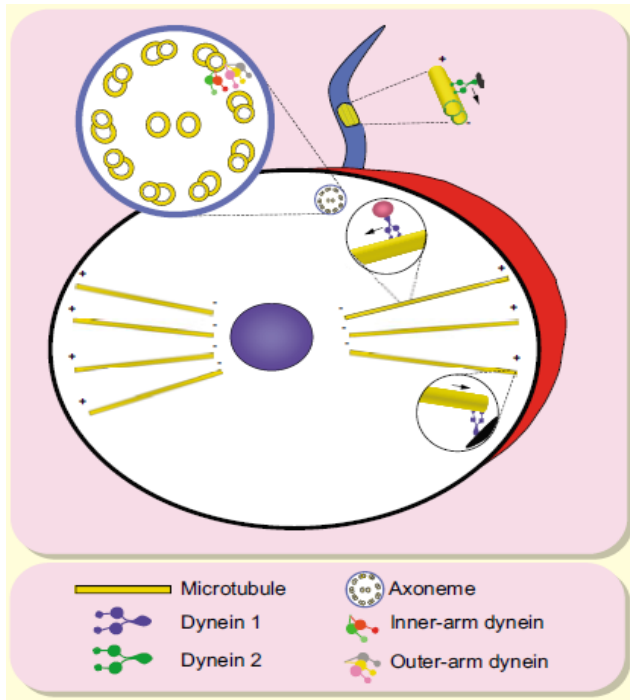
miosina V, ya que estructuralmente tienen su dominio motor orientado hacia el extremo amino terminal y el sitio de unión al cargamento está ubicado en el carboxilo terminal. Además, su movimiento para transportar es de forma anterógrada, es decir, de núcleo a membrana celular (Jeppesen & Heinrich-Hoerber, 2012), ver figura No. 7.



**Figura No. 7: Kinesina-1 motor molecular de células eucariontes.** A) Estructura y subunidades la kinesina 1, en verde, cadenas ligeras; en azul oscuro, dominio motor; azul claro, corresponde al brazo palanca, tomado de Vale, 2003. B) Mecanismo del movimiento “mano a mano”, donde se ve orientado de forma anterógrada (del signo menos a más), también muestra las diferentes distancias con fines demostrativos, tomado de Jeppesen & Heinrich-Hoerber, 2012.

### 1.3. DINEÍNA

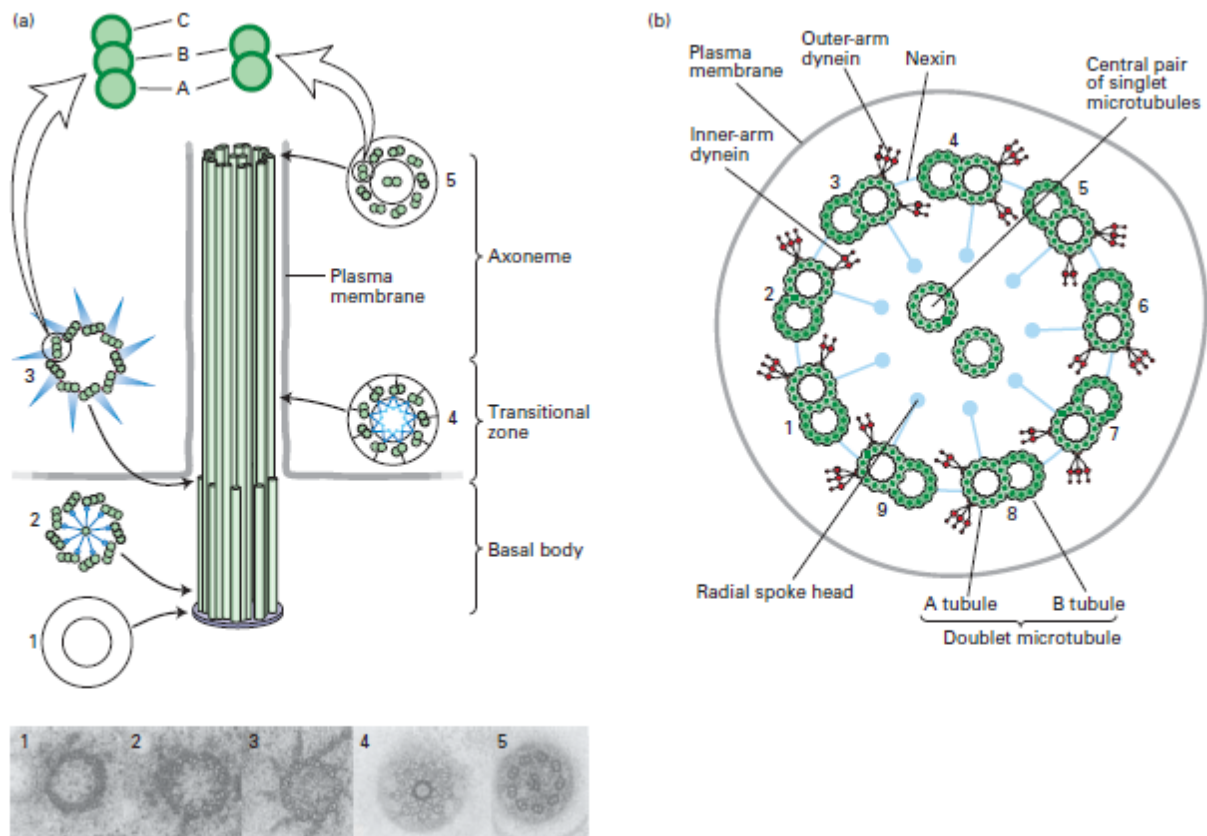
Existen dos clases de dineína: citoplásmica, la cual se subdivide a su vez en A) tipo 1, encontrada en el citoplasma de todas las células eucariontes, responsable del transporte intracelular y participar en la división celular; y B) tipo 2, encargada del transporte intraflagelar (IFT) en cilios y flagelos. La dineína axonemal es otra clase de motor molecular, cuya función es dar movimiento a los cilios y flagelos (Höök & Vallee, 2006). Ver figura No. 8.



**Figura No. 8: Localización de las diferentes clases de dineína.** En azul, corresponde a dineína citoplásmica tipo 1. En verde, dineína citoplásmica tipo 2. En diferentes colores, dineína axonemal y su posición dentro del axonema. Las flechas indican la polaridad de su movimiento. Tomado de Höök & Vallee, 2006

### 1. 3. 1. Dineína axonemal

Este tipo de dineína es encontrado en el interior de los cilios y flagelos de células eucariontes. La estructura donde realiza sus funciones es conocida como axonema, la cual consiste de un arreglo de microtúbulos de 9 dobletes, es decir, cada uno comprende un MT parcial conectado hacia un MT de 13 protofilamentos. Los 9 dupletes se mantienen unidos a través de proteínas accesorias conocidas como nexinas (ver figura No. 9). Los motores de la dineína axonemal se encuentran distribuidos a lo largo de cada doblete y apilados en fila, conocidos como brazos o motores interiores (IDT) o exteriores (ODT) (Taylor & Holwill, 1999). Comparten similitudes estructurales con la dineína citoplásmica y sobre todo en el modo de funcionamiento del dominio motor, pero en lugar de acarrear vesículas, genera el movimiento típico ondulatorio de los cilios y flagelos a partir de la hidrólisis del ATP. En células humanas es importante para la remoción de desechos en pulmones, sistema digestivo y reproductivo (Ishikawa, 2012), ver figura No. 9.

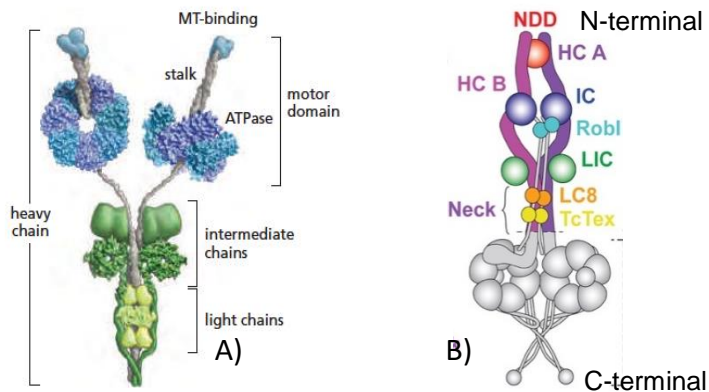


**Figura No. 9: Organización estructural de los cilios y flagelos en células eucariontes.** a) Corte longitudinal de un cilio o flagelo, muestra el modo en que se encuentran ensamblados; los números 1-5 corresponden a la imagen inferior de cortes transversales observados en microscopía electrónica; las letras A, B y C son los esquemas de las diferentes configuraciones en tripletes, dobletes y singuletes, así como las zonas en las que se divide. b) Corte transversal, presenta, en color rojo, las posiciones de la dineína axonemal con 3 dominios motores al exterior (ODA) y otra con 2 dominios motores al exterior (IDA) anclados a los MT'. Tomado de Lodish, et. al. 2016

### 1. 3. 2. Dineína citoplásmica

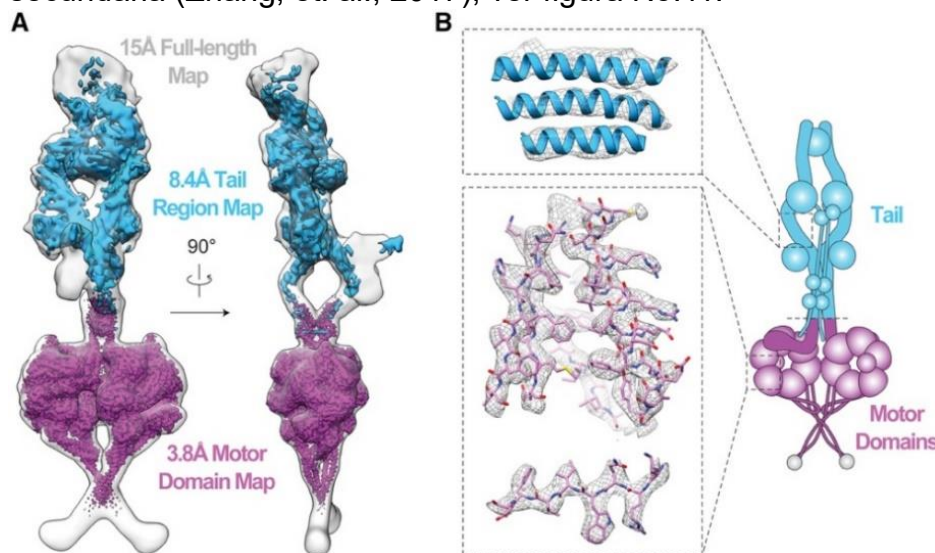
Encontrada en células eucariontes, es una proteína homodimérica cuyo peso molecular es de aproximadamente de 1.4 MDa, posee 6 subunidades: cadenas pesadas (HC), intermedias (IC), intermedias ligeras (LIC) y 3 cadenas ligeras (LC): Rob1, TcTex y Lc8, ver figura No. 10 para mayor detalle. Cada monómero está constituido por un tallo, que abarca los primeros 1455 aminoácidos. A través del extremo amino terminal, une a sus proteínas cofactoras, tales como dinactina y adaptadores de carga. Además del dominio tallo, la dineína posee un dominio motor (residuos 1456-XXXX) encargado de llevar a cabo el movimiento procesivo utilizando la energía que se genera a partir de hidrólisis del ATP. Como se mencionó al principio del apartado, existen dos tipos de dineína, citoplásmica 1 (o solo dineína) que desempeña importantes roles en la mitosis, tráfico de cargamento celular. Se ha reportado que la dineína,

se encuentra secuestrada durante infecciones virales (Reck-Peterson, et. al, 2018) y las mutaciones en los genes de la HC se asocian a malformaciones congénitas en el desarrollo neuronal y atrofia muscular espinal que han sido diagnosticadas en humanos (Hoang, et. al., 2017).



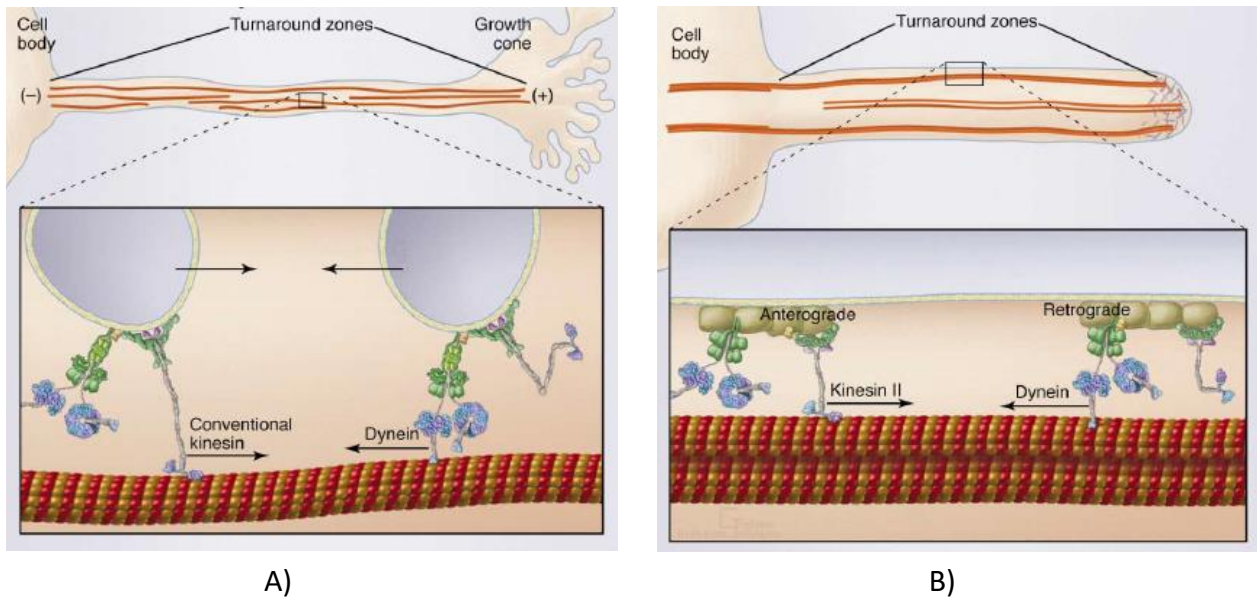
**Figura No. 10: Modelos estructurales de la dineína.** A) Composición por regiones de la dineína. B) Subunidades que componen a la dineína, conglomeradas en la región del tallo de la cadena pesada y ubicación de extremos (HC). Tomado de Alberts, et. al, 2015 y modificado de Zhang, et. al., 2017.

Recientemente, se ha puesto especial atención a la dineína humana, debido a su importancia por intervenir en varios procesos intracelulares, es por ello, se han hecho esfuerzos para purificarla y estudiar su estructura de manera recombinante. Las células sf9 provenientes de mosquito, hasta el momento, son la manera más eficaz de obtener dineína humana completa y con alta pureza (Trokter, et. al., 2012; Schlager, et. al., 2014). Mediante criomicroscopía electrónica (Cryo-EM), se ha observado a la dineína completa como partícula phi (forma autoinhibida e inactiva), por su similitud a la letra griega phi( $\Phi$ ) a baja resolución en sus diferentes regiones, a excepción de dominio motor (3.8 Å). La región del tallo se logró determinar a 8.4 Å de resolución, donde se encuentra el sitio responsable de la unión al cargamento y dominio de dimerización, con este resultado sólo fue posible deducir la estructura secundaria (Zhang, et. al., 2017), ver figura No.11.



**Figura No. 11: Reconstrucción tridimensional de la partícula phi de la dineína completa obtenida por criomicroscopía electrónica.** A) Vista completa de la dineína, donde podemos apreciar las distintas resoluciones obtenidas, dominio de dimerización (NDD) a 15 Å en gris, tallo a 8.4 Å en azul y el dominio motor a 3.8 Å en morado. B) Alcance estructural obtenido en el dominio del tallo, máxima estructura secundaria y dominio motor a resolución atómica respectivamente. Tomado de Zhang, et. al., 2017.

Por otra parte, la dineína citoplásmica-2 (dineína-2) lleva a cabo funciones de transporte intraflagelar (IFT) localizada en cilios y flagelos de células eucariontes, sus anomalías causan afecciones conocidas como ciliopatías, estas patologías afectan diversos órganos en humanos, tales como: ojo, pulmones, intestinos entre otros (Ishikawa & Marshall, 2011). La polaridad de los movimientos de la dineína-2 sobre los microtúbulos es igual al de su homólogo, es decir, desde la membrana celular hacia núcleo celular (del extremo positivo al extremo negativo), (Schmindt, et. al, 2015), ver figura No.12.



**Figura No. 12: Los movimientos de los diferentes tipos tanto de dineína como de kinesina se encuentran polarizados y coordinados.** A) Transporte vesicular en células neuronales a través de los microtúbulos, se lleva a cabo en el citoplasma del axón. B) La dineína-2, se localiza en los cilios y flagelos de células eucarióticas, observemos la disposición de los microtúbulos en doble carril. Tomado de Vale, 2003.

## 1. 4. PROTEÍNAS COFACTORAS ASOCIADAS A LA DINEÍNA

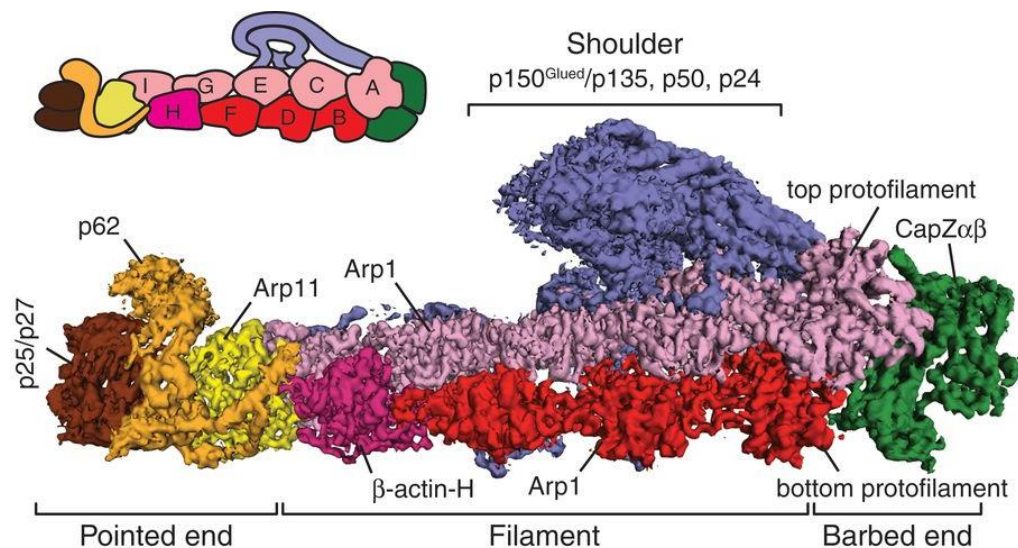
A diferencia de la kinesina-1, la dineína necesita de cofactores para activar la función transportadora, siendo la dinactina y adaptadores de carga esenciales en el transporte de cargamentos de distintos tipos durante del tráfico intracelular.

### 1. 4. 1. Dinactina

La dinactina es una proteína citosólica, que en conjunto con la dineína, llevan a cabo el transporte intracelular de vesículas en células eucariontes (Gill, et. al, 1991; Schroer & Sheetz, 1991). Es una estructura muy compleja de 23 subunidades y con un peso molecular de 1.0



MDa. Constituida de proteínas relacionadas a la actina de tipo 1 (Arp 1, por sus siglas en inglés) donde, en analogía a los filamentos de actina, está recubierta en el extremo barbado de una cubierta proteica conocido como CapZ $\alpha\beta$ , esta unión favorece la estabilidad de la estructura completa. Además, cercano al extremo barbado, está localizado un sitio conocido por su forma como shoulder u hombro que es una prominencia de composición dimérica y uno de los elementos que la integra es una prolongación llamada p150 glued cuya función es estabilizar el macrocomplejo interactuando temporalmente con el MT. Se ha logrado obtener una estructura a una resolución de 4 Å mediante criomicroscopía electrónica, mostrando a detalle la manera en que se encuentran dispuestas las subunidades, donde se alcanza a observar un surco en la zona medial y su extensión lateral asemejan más a una estructura de soporte o andamio molecular (Schroer T. A., 2004; Chowdhury, et. al., 2015; Urnavicius, et. al, 2015) ver figura No. 13.

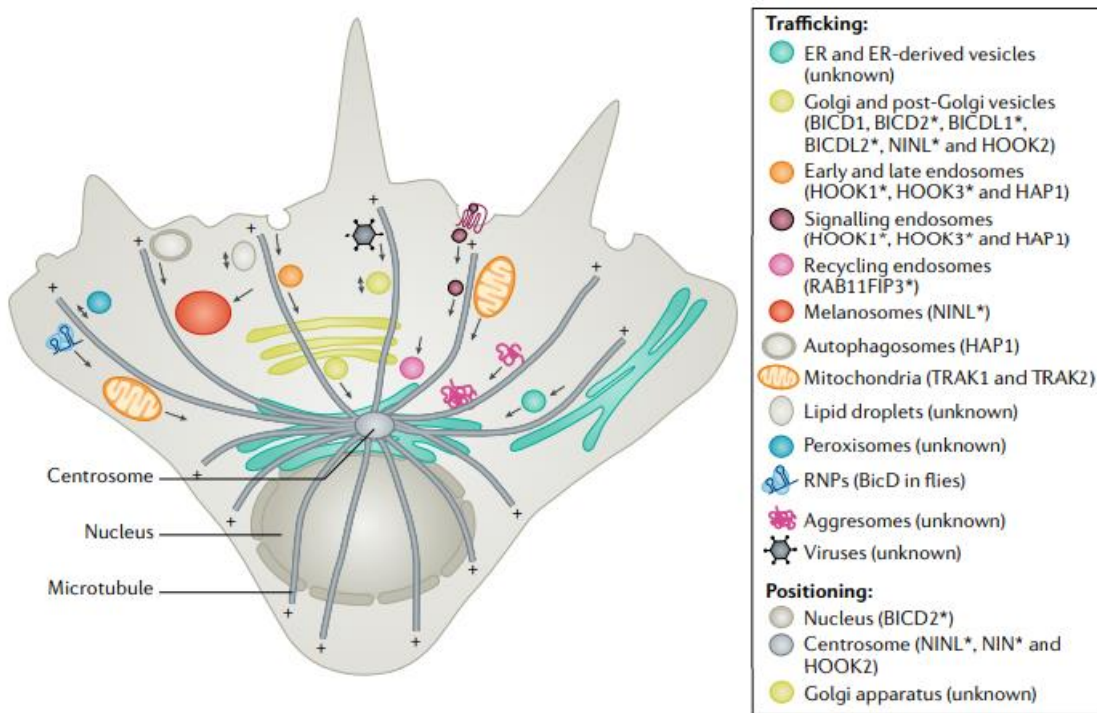


**Figura No. 13: Estructura de la dinactina adquirida por criomicroscopía electrónica a 4 Å de resolución.** En la parte superior de la figura representativa, cada letra y color respectivo corresponde a cada zona de la reconstrucción tridimensional de la dinactina y la misma escala del formato en diminuto, corresponde a las subunidades en la imagen de la parte inferior de la reconstrucción obtenida, así como el nombre de cada sitio y extensión, nótese la zona medial o central a lo largo de estructura, en esta región es donde interactúan el tallo amino terminal de la dineína y los adaptadores de cargamento. Tomado Urnavicius, et. al., 2015

#### 1. 4. 2. Adaptadores de carga

Son proteínas citosólicas que generalmente tienen un tamaño aproximado de 200 aa y una estructura secundaria en forma superenrollada (coiled-coil). No comparten identidad o un motivo común entre sí con respecto de su secuencia primaria, pero mantienen una relación

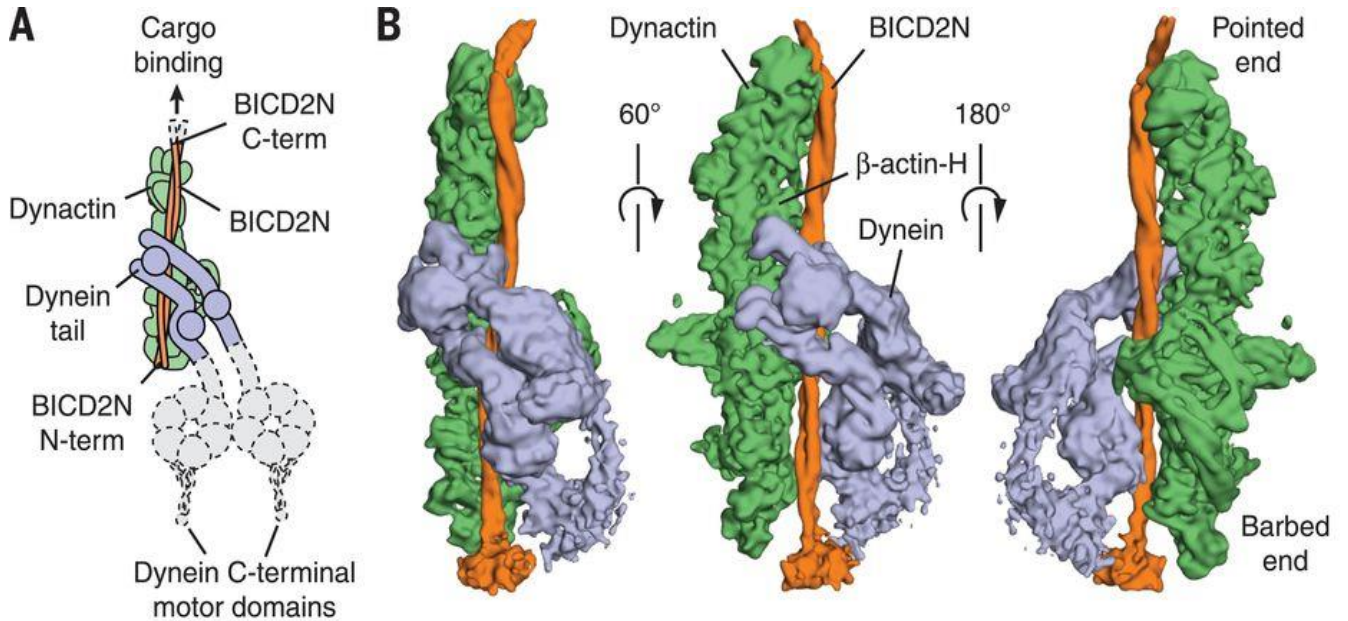
muy cercana en cuanto a interacción con la dineína y dinactina, por lo que se deduce que comparten similitud estructural y esto es lo que es reconocido por el complejo dineína-dinactina para reclutarlos (Schroeder, et. al., 2016). En el extremo carboxilo poseen un dominio de unión a proteínas generalmente tipo Rab (proteína relacionada a RAS) que sirve para unirse a su cargamento; el extremo amino terminal, es el encargado de unirse a dinactina y dineína. Actualmente, se conocen una variedad amplia de adaptadores de cargamento (Reck-Peterson, et. al., 2018), ver figura No. 14.



**Figura No. 14: Localización de los diferentes adaptadores de carga asociados a la dineína.** El cuadro de la derecha describe la gran variedad de moléculas que, hasta el momento se sabe, actúan como cofactoras de la dineína y su cargamento correspondiente ubicado en la célula de la izquierda. Tomado de Reck-Peterson, et. al., 2018

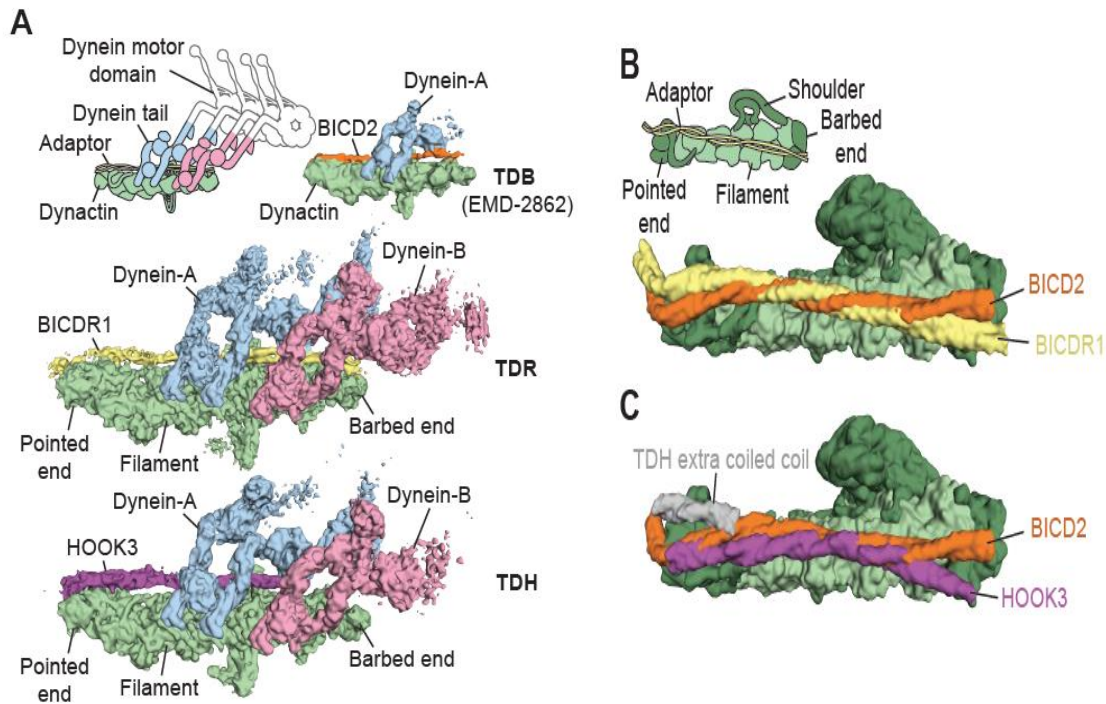
El papel de los adaptadores de carga, de acuerdo con experimentos *in vitro*, es activar el desplazamiento de la dineína, un ejemplo, es el caso de la proteína bicaudal 2 (BICD2) que se une a través de sus extremo amino terminal siempre y cuando esté presente la dinactina. BICD2 y dinactina regularán los movimientos de la dineína a grandes distancias sobre los microtúbulos, dicho mecanismo ha sido estudiado durante el transporte de vesículas de reciclaje (desde el trans-Golgi hasta el cis-Golgi) (Schlager, et. al., 2014). Cabe mencionar que BICD2 sólo estimula la unión de un homodímero de dineína, lo cual fue demostrado por criomicroscopía electrónica. En este trabajo, utilizaron BICD2 truncada, manteniendo sólo el extremo amino terminal. Además, en la dineína, se analizó ya sea solo el tallo amino terminal

o la forma completa, ver figura No. 11. Finalmente, encontraron que el complejo dinactina-dineína-BICD2 forman un macrocomplejo con uniones muy estables entre sí. Lo que explica en cierta manera, porque los desplazamientos de la dineína se mantienen por más tiempo unidos a los microtúbulos (Urnavicius, et. al., 2015). Ver figura No. 15.

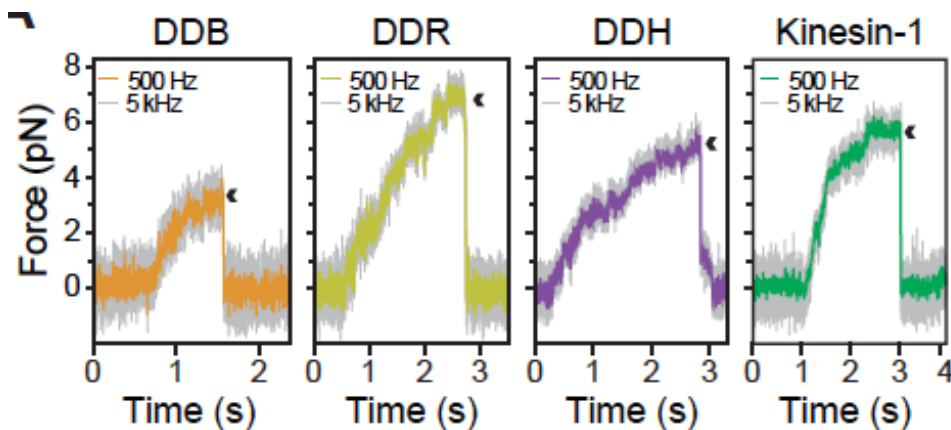


**Figura No. 15: La dineína forma un macrocomplejo con la dinactina y BICD2.** A) Mapa representativo de las interacciones entre la dinactina (verde), dineína (morado) y adaptador de carga (naranja). B) Reconstrucción tridimensional de la TDB por criomicroscopía electrónica a 8.2 Å resolución. Tomado de Urnavicius, et. al. 2015.

Por otro lado, se ha observado, también mediante crio-microscopía electrónica, que los adaptadores de carga Hook3 y BICDR1 son capaces de favorecer la unión de dos dímeros de dineína a la dinactina. Hook3 está relacionado con el tráfico de los endosomas tempranos cuyas funciones son poco conocidas (Schroeder & Vale, 2016). BICDR1 es participe en el transporte de vesículas neuronales, teniendo un papel muy importante en la neurogénesis y liberación de neurotransmisores (Schlager, et. al., 2014). Al observar este fenómeno estructural se realizaron pruebas de fuerza, mediante trampa óptica (que es una técnica que mide la fuerza generada por los complejos, ver figura No. 17, con ayuda de perlas que simulan al cargamento y a las que se les dispara un rayo para determinar la cantidad de esfuerzo realizado sobre los MT, todo esto realizado con un microscopio especializado [Belyy, et. al., 2016]), llegando a la conclusión de que en comparación con BICD2, que sólo une un homodímero de dineína, pueden transportar cargamentos de mayor tamaño a grandes distancias o al menos es la sugerencia hasta el momento (Urnavicius, et. al., 2018). Ver figuras 16 y 17.



**Figura No. 16: El tipo de adaptador de carga establece el número de dineínas.** A) En la parte superior izquierda se muestra una caricatura basada en la reconstrucción, cada color y segmento corresponden a cada sitio, Tallo (dineína): dinactina: BICDR1 (TDR), Tallo (dineína): dinactina: Hook3 (TDH) y Tallo (dineína): dinactina: BICD2 (TDB). B) Representación y comparación de BICDR1 y los coiled-coils de BICD2 sobre la dinactina, difieren, muy poco, en los sitios de contactos (en BICDR1) con el extremo negativo y positivo. C) Otra comparación de superficies entre BICD2 y Hook3 donde hay un coiled coil extra en el extremo menos y un poco más globular en el extremo positivo. Tomado Urnavicus, et. al., 2018

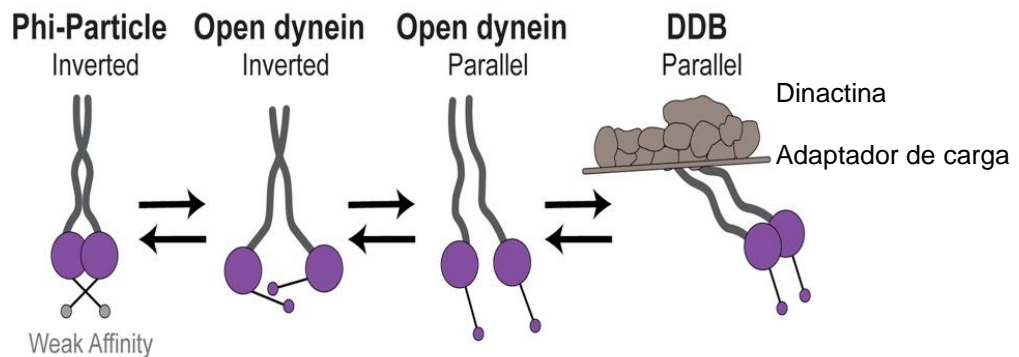


**Figura No. 17: Pruebas de fuerza con dineína completa por el método de trampa óptica.** Dos dímeros de dineína incrementan la fuerza y velocidad cuando hay interacción la dinactina y diferente adaptador de carga. Los trazos de cada recuadro fueron comparados con la kinesina-1, Dineína: Dinactina: BICD2 (DDB), Dineína: Dinactina: BICDR1 (DDR) y Dineína: Dinactina: Hook3 (DDH). La cuña negra, representa el momento en que el motor se separa de los MT. DDR presentó una fuerza de 6.8 piconewtons (pN) aproximadamente; DDH, un valor de 4.9 pN muy similar a la kinesina -1 y DDB tuvo alrededor de 3.5 pN, esto de acuerdo con los gráficos. Tomado de Urnavicius, et. al., 2018.

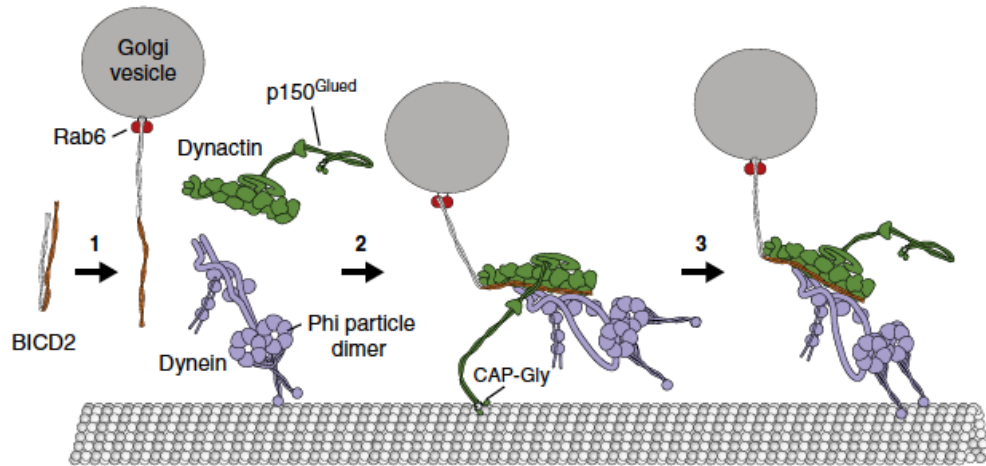
Con el estudio estructural de los complejos (Hook3 o BICDR1)<sub>1</sub>-dinactina<sub>1</sub>-dineína<sub>2</sub>, (en subíndice se muestran las estequiometrías), se concluyó que las proteínas adaptadoras de carga poseen similitud por topología para interactuar con la dinactina, que sirve como andamio, y con la dineína inducir la unión de dos homodímeros, que al parecer forman una unión muy estable favoreciendo cambios conformacionales que llevan al aumento de afinidad con los MT (Urnavicus, et. al., 2018). Por otro lado, la falta de un adaptador de carga no va a generar la separación suficiente en los dominios motores y, por lo tanto, habrá un desplazamiento muy limitado (Zhang, et. al., 2017)

## 1.5 REGULACIÓN DE LA DINEÍNA

La dineína generalmente se encuentra en el citoplasma celular forma autoinhibida, conocida como partícula phi (se debe a que en criomicroscopía electrónica se observó un gran parecido con la letra griega). Existen diferentes conformaciones de la dineína, que pueden a unirse a los microtúbulos, pero solo por periodos cortos y sin llevar a cabo los movimientos procesivos. Sólo uno de estos cambios conformacionales (figura No. 18) es el que favorece la unión de la dinactina y es en estado paralelo abierto, ya que la forma autoinhibida los dominios motores están entrelazados y por ende evita la unión de la dinactina y el adaptador de carga (Zhang, et. al., 2017, 35). Ver figura No. 19.



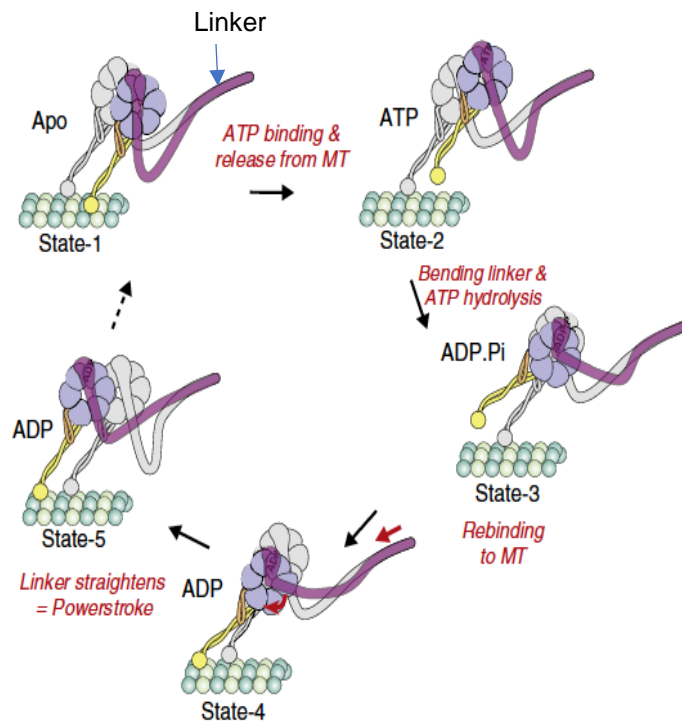
**Figura No. 18: Diferentes conformaciones en el citoplasma.** De izquierda a derecha, tenemos la forma con menor afinidad a la dinactina hasta la forma paralela abierta, que es la más favorecida a unirse al adaptador de carga y dinactina representados en el complejo DDB. Modificado de Zhang, et. al., 2017.



**Figura No. 19: Regulación de la dineína.** 1) BICD2 en su conformación plegada sobre sí misma, se despliega hasta que se une a la vesícula por su extremo carboxilo terminal (blanco) interactuando con Rab6 (rojo), unido al aparato de Golgi. 2) El extremo amino terminal de BICD2 (naranja) se une a la parte media entre la dinactina y la dineína, activando los movimientos procesivos del dominio motor. 3) Los dominios CAP-Gly de p150 favorecen una unión más estable en los microtúbulos del complejo DDB, siendo estos los pasos iniciales en los que los dominios motores llegan a la configuración idónea para activar el movimiento. Modificado de Zhang, et.al., 2017.

### 1. 5. 1. Ciclo mecanoquímico

El dominio linker es el responsable de amplificar los movimientos mecánicos del dominio motor, ocasionados por la hidrólisis del ATP (ver figura No. 20). Cabe mencionar que la estructura del dominio motor de la HC fue resuelto a 3.3 Å (Schmidt, et. al., 2012) y 2.2 Å (Kon, et. al., 2012) mediante cristalografía de rayos-X. Para comenzar su movimiento mecánico, la región AAA1 en estado apo (inicial), se encuentra disponible para recibir el ATP y el tallo carboxilo terminal se liberará del MT. Al unirse ATP al sitio catalítico, será hidrolizado y la energía liberada inducirá el doblamiento del linker (estado 3). El movimiento resultante del linker, va a favorecer que el tallo carboxilo terminal vuelva a ganar afinidad al MT pero avanzando a una nueva posición (estado 4). El linker cambia de conformación, es decir, se alinea con el otro motor, aquí termina la liberación de energía (estado 5). Finalmente, descarga los productos ADP y P<sub>i</sub>, induciendo cambios estructurales temporales en el linker para que regrese a su forma pasiva o estado Apo (Allan, 2011; Carter, et. al., 2016).



**Figura No. 20: Esquema del ciclo mecanoquímico paso a paso.** Las flechas rojas indican el movimiento del linker. Tomado de Carter, et. al., 2016

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Es de suma importancia el estudio del mecanismo de unión de la dineína en complejo con la dinactina y su adaptador de carga, ya que no existen estructuras de alta resolución de este motor molecular en los sitios de contacto con su cofactor y el adaptador, con este proyecto se propone fragmentos peptídicos del dominio tallo de la cadena pesada cristalizados. Esto, como un objetivo previo al análisis futuro de las interacciones atómicas del dominio 'tallo' de la HC de la dineína involucradas con la dinactina y los diferentes adaptadores de carga.

## **3. HIPÓTESIS**

Por medio de la obtención de fragmentos de la cadena pesada de la dineína, obtendremos a la proteína más estable, con la que obtendremos un cristal con las mejores características de difracción. Con este fragmento se estudiará, en un futuro, su estructura atómica y así se propondrá un posible mecanismo de interacción con la dinactina y adaptador de carga.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. General**

Generar una estructura cristalina de los fragmentos de la cadena pesada de la dineína, que en un desarrollo a futuro, nos permitirá adquirir una estructura a resolución atómica que servirá deducir su mecanismo de unión a la dinactina y sus adaptadores de cargo.

### **4. 2. Específicos**

- Determinar las condiciones óptimas de purificación de los fragmentos de diferente tamaño de la dineína humana recombinantes
- Establecer los parámetros de cristalización de los fragmentos purificados.
- Analizar el patrón de difracción de los cristales producidos para adquirir un conjunto de datos, que servirán para obtener la estructura a nivel a atómico.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Producción de células competentes de *Escherichia coli*, cepas TOP10 y SoluBL21.

El exceso de iones divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) permiten la formación de poros tanto en la pared celular como en la membrana interna de *E. coli*. uniéndose a las cargas negativas de los fosfolípidos y lipopolisacáridos. Además, los iones actúan sobre las primeras capas de solvatación del peptidoglucano, lo cual favorecerá la apertura de poros desde el espacio periplásmico, generando el característico estado hipertónico temporal. Esto permite la formación global de poros en ambas membranas, gracias a los cuales se podrá realizar conjugación artificial (Hanahan, 1983).

La cepa TOP10 carece de recombinasa, que evita que los fragmento insertados sufran recombinación homóloga y mantenerlos estables (sin modificaciones la secuencia insertada), es decir, que no repare el DNA plasmídico. Esta cepa también carece de endonucleasa que cortan el DNA extraño y que, al estar carente de este gen, proveerá mayor eficiencia al fragmento insertado en el plásmido. Con respecto a la cepa SoluBL21, esta carece de proteasas extra e intracelulares, que mantendrán el producto proteico estable, además, posee una modificación en las chaperonas que van a ayudar a que las proteínas recombinantes se plieguen correctamente sobre todo en aquellas que sean tóxicas (Promega, 2010).

#### **Procedimiento:**

Todo el material y soluciones a utilizar durante proceso deben estar estériles y libre de detergentes. En este protocolo se deben mantener condiciones de esterilidad (con mechero) en todo momento. Extender por estría cruzada en medio sólido LB (Ver tabla No. 1) sin ampicilina, a partir del glicerol almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de la cepa bacteriana de interés (TOP10 o SoluBL21).

**Tabla No. 1: Modo de preparación de medio sólido LB.**

Composición	Concentración final (%p/v)
Triptona	1
Extracto de levadura	0.5
Cloruro de sodio	1
Bacto agar	1.5
Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 lb/cm <sup>2</sup> , por 20 min.	
Si es requerido con ampicilina, añadir 1 µL de solución de ampicilina a 100 mg/mL (Amp <sub>100</sub> ) por cada mL de agar.	

Se tomaron 5 colonias de la placa y se inocularon en 25 mL de medio SOB (ver tabla No.2), en frascos de policarbonato de 250 mL. Se dejó incubando a 37 °C durante 18 hrs con agitación constante. Después, en 2 matraces Erlenmeyer de 1 L se añadieron 250 mL de medio SOB a cada uno y se adicionaron 10 mL de precultivo por cada litro.

**Tabla No. 2: Caldo super óptimo (SOB).**

Composición	Concentración final
Triptona	2% p/v
Extracto de levadura	0.5% p/v
Cloruro de sodio	8.56 mM
Cloruro de potasio	2.5 mM
Cloruro de magnesio	10 mM
Sulfato de magnesio	10 mM
Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 lb/cm <sup>2</sup> , por 20 min.	

Se incubó a temperatura ambiente y en agitación constante hasta alcanzar una DO a 600 nm (DO<sub>600</sub>), entre 0.3-0.6. Se debe hacer la primera medición a las 3 o 2.5 hrs. Se incubó en hielo por 30 min. Finalizado este tiempo, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se resuspendió, con vórtex, en 27 mL solución amortiguadora CCMB80 (ver tabla No. 3) por cada 250 mL de células cultivadas, se obtuvo un total de 54 mL para ambos matraces.

**Tabla No. 3: Elaboración del amortiguador CCMB80**

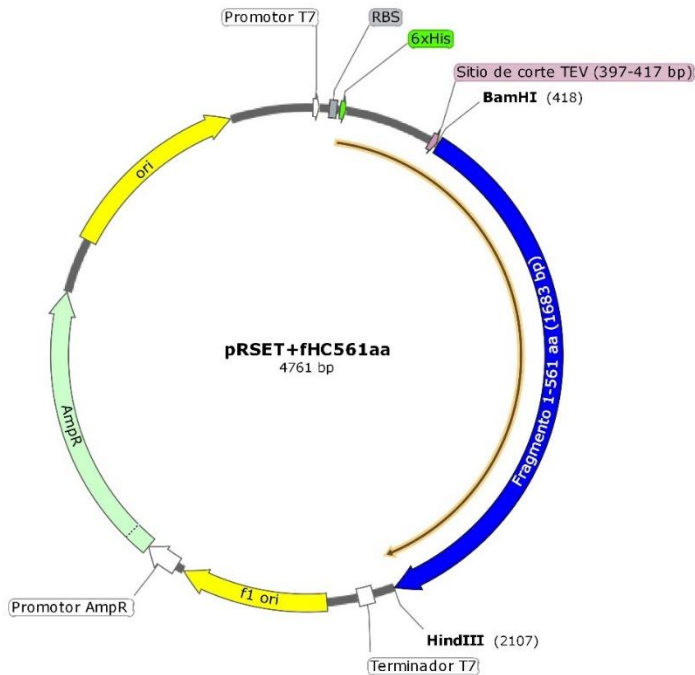
Composición	Concentración final
Acetato de potasio	10 mM
Cloruro de calcio	80 mM
Cloruro de manganeso	20 mM
Cloruro de magnesio	10 mM
Glicerol	10% v/v
Ajustar pH a 6.4 con HCl concentrado, filtrar en membrana de 0.22 µm y almacenar a 4 °C.	

Posteriormente, se incubó en hielo por 20 min, luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. Las células se resuspendieron suavemente, con vórtex, en 6-7 mL de amortiguador CCMB80 (3.33 mL por cada 250 mL de células). Se midió la DO<sub>600</sub> de la suspensión celular, mezclando 800 µL de medio SOB y 200 µL de la suspensión de células, para ajustarla a una absorbancia entre 1.0-1.5. Si no se encuentra en la absorbancia deseada, se diluyó la suspensión de células con amortiguador CCMB80, hasta alcanzar el rango anteriormente mencionado. Finalmente, se realizaron alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -80 °C.

## **5. 2. Procedimiento para transformación de células *Escherichia coli* competentes por medio de choque térmico.**

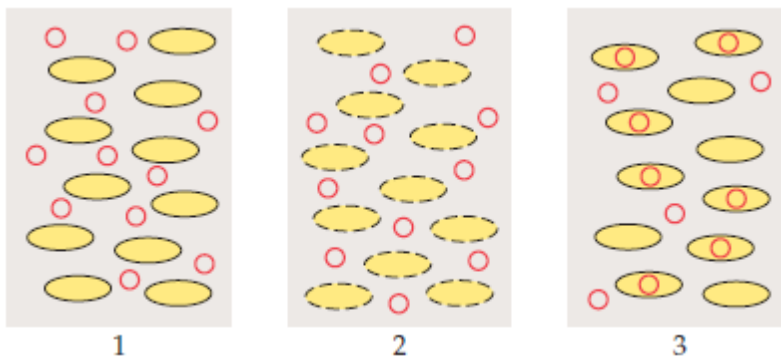
### **Plásmido pRSET**

Los plásmidos son moléculas de DNA circular extracromosomal en doble cadena, prácticamente se encuentran en todas las especies de bacterias. Existen en una amplia gama de tamaños, y dependiendo de las propiedades que posea, le conferirán eficiencia en sobreexpresión de proteínas; sensibilidad o resistencia a antibióticos, mutágenos o incluso metales pesados y producción de proteínas, o sus fragmentos, poco comunes de encontrar en cantidades mayores que para expresarlo dependerá del ciclo de replicación del hospedero, generalmente es *E. coli*. Los plásmidos se transfieren de forma libre a otras bacterias de la misma especie (Ausbel, et. al., 2003). pRSET es un vector de alto rendimiento, derivado de pUC, diseñado para la sobre-expresión y purificación de productos (DNA de plásmido y proteínas recombinantes) de genes insertados en *E. coli* (Invitrogen, 2010), ver figura No. 21 para mayor detalle sobre sus propiedades.



**Figura No. 21: Vector pRSET con inserto del fragmento 1-561 aa.** El DNA del inserto corresponde a la base de la cual obtendremos los productos de traducción disminuido en 1 aminoácido consecutivo por el extremo carboxilo. La fecha bicolor (naranja-negro) es la proteína esperada (75.49 kDa) por la maquinaria de *E. coli* cepa SoluBL21. Creado con la aplicación SnapGene® de GSL-Biotech, 2018.

También conocida como conjugación artificial, porque imitada la forma en como las bacterias transfieren material genético. Los cationes con carga positiva, de las bacterias competentes en solución, ayudaran a compactar el DNA del plásmido, solvatando las cargas negativas que poseen los grupos fosfato laterales en el DNA del plásmido, además, también van a neutralizar las cargas negativas de la membrana externa, por ende, facilitando el contacto membrana-DNA (rodeado de carga positiva y membrana con negativa). La exposición de la mezcla DNA-células a baja temperatura, da una mejora a la estabilidad en la interacción membrana externa-DNA debido a la que los fosfolípidos cambian de fase a un estado más sólido, por ello al aplicar calor a 42 °C de temperatura mejora la permeabilidad de la membrana, creación de poros, facilitando el ingreso del DNA plasmídico modificado (Vee-Aune & Aachamann, 2010), ve figura No. 22.



**Figura No. 22: Representación de la transformación de células competentes.** Paso 1, interacción plásmido-células en un medio exceso de cationes divalentes; Paso 2, aplicación de choque térmico, apertura de poros; Paso 3, internalización de los plásmidos modificados. Tomado de Glick & Pasternak, 2010.

## **Procedimiento:**

Se tomó una alícuota con 100  $\mu\text{L}$  de células *E. coli* de la cepa Top10 o SoluBL21 competentes y se añadió de 0.5 hasta 2  $\mu\text{L}$  de plásmido (la cantidad añadida algunas veces depende de la eficiencia cepa). Se mantuvo en hielo durante el proceso. Se mezcló suavemente y dejamos incubando en hielo por 30 min. Se precalentó el termobloque 5-10 minutos antes de terminar la incubación, se programó a una temperatura de 42 °C. Se colocaron los tubos dentro de los pozos del termobloque para dar a la suspensión de células un choque térmico por 45 seg a 42 °C. Retiraron los tubos e incubaron por 2 minutos en hielo. Adicionamos a la suspensión bacteriana 400  $\mu\text{L}$  de medio SOB e incubamos los tubos a 37 °C en agitación constante durante una hora. Al finalizar el tiempo centrifugamos a 14K por 5 min, desechamos el sobrenadante dejando una pequeña cantidad de líquido. Resuspendimos el botón y lo vaciamos, ayudándonos de una pipeta de microvolumétrica de 100  $\mu\text{L}$ , extendimos en placas con agar LB con Amp<sub>100</sub> por sembrado masivo. Finalmente etiquetamos, sellamos con Parafilm® el borde de las placas y dejamos incubando toda la noche a 37 °C.

### **5. 3. Prueba de eficiencia para células *Escherichia coli* competentes.**

La razón de ser de estas pruebas es para conocer la capacidad de las células bacterianas competentes para internalizar el plásmido modificado, normalmente la cepa TOP10 tiene una eficiencia mayor a  $10^7$  en comparación con SoluBL21 que llega a alcanzar  $10^6$ . Es necesario, cuantificar dicha propiedad para que las células transformadas *in vitro* expresen de forma suficiente el producto del inserto en el vector (Addison, et. al., 2004).

## **Procedimiento:**

Tomamos 1 alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de bacterias competentes de la cepa TOP10 o SoluBL21. Se preparó una solución del plásmido pUC19 a una concentración de 1pg/  $\mu\text{L}$ . Se agregó a la suspensión de competentes, un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de la solución de pUC19 a 1pg/ $\mu\text{L}$ . Se adicionó a 1 alícuota de suspensión de competentes, 10  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O miliQ. Que sirvió como control negativo. Llevamos a cabo el procedimiento de transformación de células competentes por choque térmico, omitimos centrifugación. En 3 placas de agar LB con Amp<sub>100</sub>, esparcimos 10, 25 y 50  $\mu\text{L}$  del cultivo, etiquetar como A, B y C respectivamente. De la alícuota

transformada con H<sub>2</sub>O miliQ, añadimos a la placa 50 µL del cultivo, que nos sirvió de control negativo. Se incubó toda la noche a 37 °C. (Si el control negativo presenta desarrollo de colonias, repetir el ensayo). Se contó el número de colonias en cada placa y calculó la eficiencia de acuerdo con la siguiente fórmula:

Promedio de eficiencia=  $(50A + 20B + 10 C) (3.33 \times 10^4)$  donde:

A= Número de colonias de la placa con 10 µL del cultivo

B= Número de colonias de la placa con 25 µL del cultivo

C= Número de colonias de la placa con 50 µL del cultivo

Interpretamos el resultado (si se obtiene un valor mayor o igual a 7 órdenes ( $10^7$ ) de magnitud pueden se les considera eficientes y aptas para ser transformadas).

#### **5. 4. Extracción de DNA plasmídico (pDNA) por lisis alcalina (minipreps).**

Es un método purificación de DNA plasmídico, adaptable a todo tipo de cepas tanto de *E. coli* como de otro tipo por medio de un pH elevado. Consiste en la desnaturalización y ruptura de la pared celular bacteriana, aunada a la quelación de diferentes tipos de iones metálicos (solución alcalina I). El siguiente paso es la eliminación, en su gran mayoría de las proteínas cargadas y componentes liposolubles intracelulares y extracelulares (solución de lisis alcalina II). Finalmente, la precipitación de DNA genómico bacteriano y RNA de alto peso molecular por formación de agregados (sustitución de iones de sodio por potasio) promovidos, principalmente por la reacción de neutralización (solución de lisis alcalina III). Las moléculas orgánicas restantes, son disueltas con la solución fenólica. La razón de porque el DNA genómico se desnaturalizan en gran parte, se debe a que la elevada concentración de iones OH<sup>-</sup> y acetato no permiten que recupere su forma nativa, adicional a que la estructura lineal es impedida estéricamente. Por ello, la topología del DNA plasmídico extracromosomal es superenrollada (forma compacta), lo que hace que sus bases se mantengan muy unidas, de modo que ninguno de los componentes de las soluciones alcalinas las afecte y siempre las encontremos en la fase acuosa junto con los RNA de peso molecular bajo (Birboim & Doly, 1979; Sambrook & Rusell, 2001).

## Procedimiento:

Se preparó un precultivo en 3 mL caldo LB con Amp<sub>100</sub> y se tomaron de un cultivo de células Top10 5 colonias diferentes, se dejó incubar por 18 hrs a 37 °C. Se tomaron 1.4 mL del cultivo de bacterias y se colocaron en hielo los tubos eppendorf, se centrifugó a 14K, 30 segundos a 4 °C dos veces, se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el botón en 100 µL de solución alcalina I (ver tabla No. 4) y se agitó vigorosamente en vórtex.

**Tabla No. 4: Solución de lisis alcalina I**

Componente	Solución proveedora (M)	Concentración final (mM)
Glucosa	1	50
Tris-HCl pH 8.0	1	25
EDTA pH 8.0	0.5	10
Filtrar en membrana de 0.22 µm, almacenar a 4 °C		

Se agregaron 200 µL de solución alcalina II (debe prepararse el día del experimento, ver tabla No. 5), se mezcló invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces y no se usó vórtex e incubamos en hielo.

**Tabla No. 5: Solución de lisis alcalina II**

Componente	Solución proveedora	Concentración final
Acetato de potasio	5 M	3 M
Ácido acético glacial	100%	11.5% v/v
Filtrar en membrana de 0.22 µm, almacenar a 4 °C		

Adicionamos 150 µL de solución alcalina III (ver tabla No. 6), se cerró el tubo y mezclamos invirtiendo el tubo varias veces, sin vórtex, hasta la aparición de un precipitado blanquecino insoluble, se incubó durante 3-5 min.

**Tabla No. 6: Solución de lisis alcalina III**

Componente	Solución proveedora	Concentración final
NaOH	5 M	200 mM
SDS	10%	0.1% v/v
EDTA pH 8.0	0.5 M	10
Preparar siempre al momento de realizar la técnica		

Se centrifugó por 5 minutos, 4 °C y 14K. Se transfirió el sobrenadante en un tubo nuevo cuidando de no extraer partes de la pastilla. Después, se añadió un volumen de solución fenol-cloroformo (se preparó en proporciones 25:24:1 de fenol al 89%v/v, cloroformo y alcohol



isoamílico de forma correspondiente; se saturó en solución de tris-EDTA pH 8.0 a concentración final de 10 y 1 mM respectivamente), se mezcló la fase acuosa con vórtex. Se centrifugó 2 minutos a 14K, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Precipitamos los ácidos nucleicos agregando un volumen de isopropanol, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Nuevamente, se centrifugó por 5 minutos a 14K. A veces, en el fondo del tubo, puede observamos un precipitado de color blanco. Se decantó el sobrenadante y se dejó el tubo en posición invertida con el fin de evaporar el isopropanol. Se agregó 1 mL de etanol al 70%v/v y se recuperó el DNA por centrifugación a 14K por 2-5 minutos. Se retiró por decantación el sobrenadante y dejó evaporar el remanente de solución etílica, por 5-10 minutos, en ocasiones es posible ver la pastilla de un color blanquecino. Se resuspendió el DNA en 50 µL en H<sub>2</sub>O miliQ estéril y filtrada. Se monitoreó cada muestra con electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se cuantificó la cantidad de DNA plásmidico en nanodrop Lite® de Thermofisher. Almacenamos las muestras a -20 °C.

### 5. 5. Preparación de geles de agarosa al 0.8%.

Se pesó 0.4 g de agarosa en polvo y vaciamos en matraz Erlenmeyer de 100 mL. Se agregaron 50 mL de amortiguador TBE 1X (en proporción 1:10 con la solución 10X de TBE, ver ingredientes en tabla No. 7).

**Tabla No. 7: Componentes del amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE)10X.**

Reactivo	Concentración Final (mM)
Tris-base	892
Ácido Bórico	890
EDTA disódico	20

Se calentó la solución de agarosa hasta su disolución completa, sin dejar grumos. Se montó el molde para geles de agarosa. Se añadió a la superficie del molde 5µL de solución reveladora de DNA con función similar al bromuro de etidio (SYBR Safe®). Se vertió lentamente la solución de agarosa con mucho cuidado. Se mezcló con el peine a utilizar hasta homogeneidad. Se colocó el peine para generar los pozos. Dejar gelificando de 20-30 min.

### 5. 6. Electroforesis en gel de agarosa

Transcurrido el tiempo de gelificado, se retiró cuidadosamente, el peine y desmontó el molde

con el gel con mucha precaución de no romperlo. Se llenó hasta la marca indicada en la cámara de electroforesis amortiguador TBE 1X. Se fijó el molde con el gel a la cámara. Cargamos las muestras, cada una debe contener 1:4 en proporción de DNA plasmídico y amortiguador de muestra o de acuerdo con el experimento. Se cerró la cámara y la fuente de poder se programó a un voltaje de 80 V y 60 min. para electroforar. Al término del corrimiento se visualizó e interpretó en transiluminador UV. Los estándares de peso molecular fueron realizados en el laboratorio mediante digestión de los plásmidos pPSU1 y 2 con las enzimas de restricción PstI y EcoRV. Ver material suplementario figura supl. No. 2 (Henrici, et. al., 2017)

### 5. 7. Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Diseñamos los primers, de modo que amplificaran tanto el plásmido como el gen. Cada tubo de reacción contuvo los siguientes componentes, basándonos del protocolo de New England Biolabs®, ver tabla No. 8

**Tabla No. 8: Elementos necesarios para PCR.**

Composición	Concentración final
Amortiguador HF o GC 5X	1X
dNTP's a 10 mM	200 µM
Primer Forward a 10 µM	0.5 µM
Primer Reverse a 10 µM	0.5 µM
Templado DNAp	150 ng
Polimerasa de DNA Phusion	1.0 unidades

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial, 98 °C por 10 segundos; hibridación, 98 °C por 10 segundos; 35 ciclos, gradiente de 60-71 °C; alineamiento, 2 min. a 72 °C; extensión final 72 °C por 10 minutos. Se programó el equipo T100 thermal cycler de Biorad®. Examinamos las reacciones por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Realizamos digestión con enzima DpnI (ver tabla No.9), para degradar el templado.

**Tabla No. 9: Digestión con enzima de restricción DpnI.**

Componentes	Concentración final
Enzima de restricción	1 U/ug DNA
DNA	1 ug
Amortiguador CutSmart 10X	1X
Incubar por 1 hora a 37 °C e inactivar la reacción a 80 °C por 20 min.	

Los plásmidos amplificados fueron transformados en células TOP10. Posteriormente, purificamos los plásmidos por lisis alcalina y los cuantificamos (NanoDrop Lite Microvolume Spectrophometer, Thermo Fisher®).

## 5. 8. Preparación de geles de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio(SDS).

Parte A: Montaje del sistema para gel vertical.

**Tabla No. 10: Amortiguador de Gel**

Composición	Concentración final
Tris-base	3 M
SDS	0.3% p/v
HCl diluido a 1:1	8.28% v/v
Ajustar pH a 8.25	

Tomamos un par de vidrios, uno grueso (para un gel de 0.75 ó 1.00 mm) y otro delgado, limpiamos perfectamente. Con una prensa, se empalmó cuidadosamente. Con ayuda de un soporte para geles, se colocaron y aseguramos que no haya fugas llenando el espacio con agua destilada con ayuda de una piceta, se revisaron tanto por los bordes laterales y la calza puesta en la parte inferior.

Parte B: Gel separador de acrilamida al 8%.

Preparamos, en primer lugar el gel separador, porque corresponde a la zona donde las proteínas se excluyen de acuerdo con su peso molecular; se agregó a un tubo falcon de 15 mL, los volúmenes siguientes de cada componente para cada gel, tabla No. 11.

**Tabla No. 11: Preparación de geles de acrilamida.**

Componente	Tipo de gel	Separador al 8%	Concentrador al 4%
Acrilamida al 30% v/v (mL)		1.6	0.533
Buffer de Gel (mL)		2	1
Glicerol al 80% v/v (mL)		0.8	-----
TEMED (µL)		3	4
Persulfato Amonio al 10%, PSA (µL)		30	40

El orden de los primeros 4 componentes no fue crucial y siempre se mantuvo en agitación constante, en cambio el PSA al 10% (0.1 g en 1 mL de H<sub>2</sub>O miliQ), se añadió y homogeneizó al final, ya que es el responsable de la polimerización. Antes de añadir la mezcla, se desechó el agua destilada y se hizo una marca para delimitar el volumen con el fin de apartar un espacio para la zona concentradora. Se vació la cantidad deseada, sin dejar burbujas, y se adicionó un poco agua miliQ para obtener una barrera uniforme, se dejó polimerizar entre 10-15 min. Enseguida, se preparó el gel concentrador, de acuerdo con la tabla No. 11, sin añadir glicerol al 80%. La mezcla siempre se mantuvo en agitación. Una vez que preparamos la mezcla concentradora, decantamos el agua miliQ e inmediatamente agregamos a la zona restante, sin dejar burbujas y si las hay retirar con un poco de agua, se colocó el peine (ya sea para 10 ó 15 pozos) en congruencia con el grosor seleccionado de los vidrios. Se dejó polimerizar entre 10-15 min. Se almacenaron en una bolsa con sello hermético con amortiguador de gel a 8 °C hasta su uso.

### **5. 9. Electroforesis en geles de acrilamida al 8% (SDS-PAGE) de extracto total y proteína purificada.**

#### **A. Para extracto total**

Se preparó un gel de acrilamida, se centrifugó a 14K el tubo eppendorf con células SoluBL21 por 2-3 min. Después, se decantó el sobrenadante hasta dejar el volumen mínimo sobre la pastilla. Se programó el termobloque con agua hasta una temperatura de 100 °C. Se añadió a la pastilla de células 50 µL amortiguador de muestra (ver tabla No.10) con DTT (990 µL de amortiguador de carga, 10 µL de DTT 1 M), se mezcló perfectamente.

**Tabla No. 10: Componentes y cantidades del amortiguador de muestra.**

<b>Solución</b>	<b>Volumen (mL)</b>
Amortiguador de gel	1
Glicerol anhidro	3
SDS al 10% p/v	1
Azul de bromofenol al 1% p/v	1
H <sub>2</sub> O miliQ	4

Para obtener el extracto total, en un tubo eppendorf con la mezcla de células y amortiguador de carga se colocó en el termobloque a 100 °C por 5 min. Se montó el sistema para electroforesis vertical, el cassette debe contener los geles emparedados y ajustados debidamente, colocó dentro del tanque y vaciando en su interior amortiguador de cátodo (ver

tabla No. 11), se añadió al primer pozo el marcador de peso molecular All blue (BioRad®) que va de 250-10 kDa., se adicionó a cada pozo 5 µL de la mezcla desnaturalizada por calor. Se llenó con el volumen necesario dentro del tanque amortiguador de ánodo (200 mM de Tris base y ajustar con ácido clorhídrico (HCl) concentrado a pH 8.4).

**Tabla No. 11: Elementos necesarios para preparar amortiguador de cátodo.**

Reactivo	Cantidad (g)
Tris Base	12.11
SDS (BioRad®)	1
Tricina	17.93

Una vez que fueron añadidos los amortiguadores y se colocaron las muestras en cada pozo, se programó la fuente de poder a un voltaje de 150 V por 1 hora. Finalizado el proceso, se procedió a la remoción del gel de las placas y lo colocamos en un recipiente con agua destilada. El gel se incubó con solución teñidora (metanol 45%v/v, ácido acético glacial 10%v/v y azul brillante de Comassie 0.125%p/v) y se dejó en agitación 20-30 min o toda la noche. Se decantó la solución teñidora y se incubó al gel, con solución desteñidora (metanol 20%v/v, ácido acético glacial 15% v/v) para remover el exceso de colorante. Se vació la solución desteñidora y lavamos el gel con agua destilada, se analizó y digitalizó la imagen por escáner.

#### B. Para muestras de la purificación de las proteínas

Se preparó un gel de acrilamida al 8%, terminado el paso anterior, se montó el sistema para electroforesis vertical, se añadió al primer pozo el marcador de peso molecular All blue (BioRad®) que va de 250-10 kDa. Se homogeneizó y adicionó en proporción 1:4 (recomendado) el amortiguador de muestra (NuPAGE®) con la cantidad de muestra deseada de cada una de las fracciones obtenidas. Una vez cargadas las fracciones al gel, añadimos el volumen necesario, dentro del tanque, amortiguador de ánodo y el cassette con los geles empalmados, se fijaron y colocaron dentro del tanque. Se vació en su interior amortiguador de cátodo. Una vez que fueron agregados los amortiguadores, programamos la fuente de poder a un voltaje de 150 V por 1 hora. Se removió el gel de las placas y se colocó en un recipiente con agua destilada. Se tiño-destiño al gel como en el apartado anterior. Finalmente, se lavó el gel con agua destilada, se analizó y digitalizó el gel por escaner.

## 5. 10. Ensayos de sobre-expresión de proteínas (Perfiles de expresión, PE)

Una vez que fue purificado el plásmido(s) de interés por el método de lisis alcalina que fue obtenido de células transformadas TOP10 de *E. coli*, consecuentemente se realizó la transformación en cepas Solubl21 de *E. coli*. De la(s) placa(s) con crecimiento colonial, seleccionamos una colonia (por placa) y preparamos un precultivo de 1 mL en tubo eppendorf de 1.5 mL en caldo LB (ver tabla No. 12) más 1  $\mu$ L de ampicilina a 100mg/mL, lo dejamos incubando a 37 °C.

**Tabla No. 12: Caldo para cultivo bacteriano Luria-Bertani(LB)**

Composición	Concentración final (%p/v)
Triptona	1
Extracto de levadura	0.5
Cloruro de sodio	1
Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 lb/cm <sup>2</sup> , por 20 min.	
Si es requerido con ampicilina, añadir 1 $\mu$ L de solución de ampicilina a 100 mg/mL por cada mL de agar.	

Generamos las diferentes condiciones de incubación para cada uno de los perfiles por plásmido a analizar: Temperatura ambiente (TA), 3 horas y 1 mM de IPTG (Isopropiltiogalactosa a 1 M), 37 °C, 3 horas y 1 mM de IPTG, TA, toda la noche (OV) y 1 mM de IPTG, 37 °C, OV y 1 mM de IPTG. Por lo tanto, un perfil de expresión básico constó de 4 condiciones, cada una se preparó en tubo eppendorf de 1.5 mL y 1 mL de caldo 2XYT (ver tabla No.13), 1  $\mu$ L de Amp<sub>100</sub> y adicionó 10  $\mu$ L del precultivo. Se incubó de 3 horas a 37 °C antes de estimular con IPTG.

**Tabla No. 13: Caldo para cultivo bacteriano 2XYT**

Componente	Concentración final (%p/v)
Triptona	1.6
Extracto de levadura	1
Cloruro de sodio	0.5
Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 lb/cm <sup>2</sup>	

Al finalizar la incubación, se añadió a cada tubo 1  $\mu$ L de solución IPTG a 1 M para estímulo y fue aplicado lo mismo con las diferentes condiciones respectivas. Se realizó la electroforesis en gel de acrilamida, y analizó el grado de sobre-expresión y seleccionar la condición.

## 5. 11. Preparación de macrocultivos.

Se tomaron 5 colonias de cada plásmido y preparamos un precultivo de 40 mL en caldo LB con 40  $\mu$ L Amp<sub>100</sub>, se incubó a 37 °C toda la noche. Dicho volumen alcanzó para producir 4 litros de cultivo bacteriano, por lo tanto, por litro se hizo como sigue: suplementar a 500 mL de medio 2XYT contenido en matraz Erlenmeyer de fondo plano con 500  $\mu$ L de Amp<sub>100</sub> y se adicionó 10 mL precultivo. Se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6-0.9, se midió en el espectrofotómetro cada 1 ó 2 horas. Se tomó una muestra de 1 mL en tubo eppendorf de 1 mL como control antes del estímulo. Una vez que fue alcanzada la absorbancia dentro del rango, se añadió el estímulo con 1 mL IPTG a 1 M, 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 500  $\mu$ L de Amp<sub>100</sub> y los 500 mL restantes de caldo 2XYT se aforó a un litro, se mantuvo en incubación de acuerdo con lo interpretado en el perfil de expresión del apartado anterior. Se completó el tiempo de estímulo y se tomó una alícuota de 1 mL en tubo eppendorf de 1.5 mL, después se centrifugó en un rotor JLA 8.1000 a 4000 rpm por 25 min, para separar el paquete bacteriano, se separó colocando una bolsa en el interior de la botella, se decantó el sobrenadante cuidando de no despegar la pastilla del fondo de la bolsa o las paredes, se hizo lentamente. Se conservó cada bolsa, con su respectivo precipitado de bacterias, en congelación a -80 °C, para posterior purificación de fragmento. Se comprobó sobreexpresión con las alícuotas en SDS-PAGE de célula completa antes y después del estímulo.

## 5. 12. Lisis celular por sonicación

La pastilla celular congelada se mantuvo siempre en hielo. Se preparó amortiguador de lisis 10X (Tris-HCl pH 7.5 a 300 mM, NaCl a 2 mM y MgCl<sub>2</sub> a 20 mM). Se diluyó a una razón de 12.5 mL de amortiguador A (ver tabla No. 14) por litro de células. Por lo tanto, en 4 L vertimos 50 mL de amortiguador A para formar la suspensión de células.

**Tabla No. 14: Ingredientes para amortiguador A.**

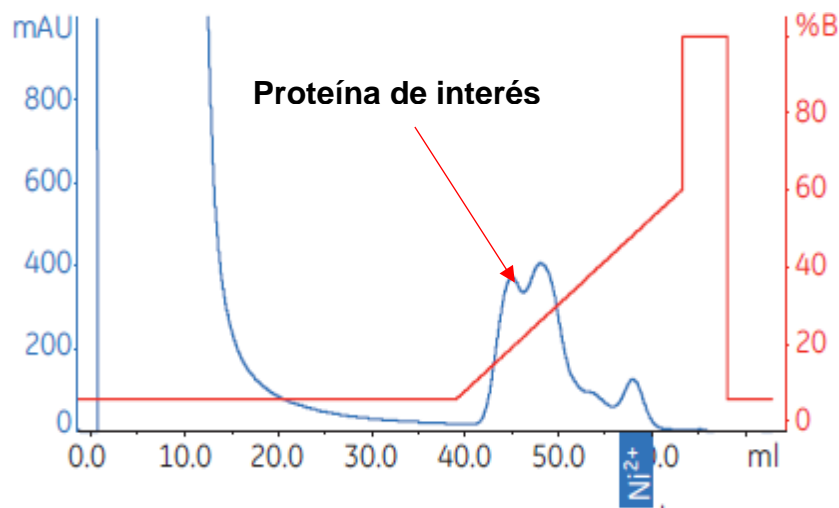
Componentes	Concentración final
Amortiguador de lisis 10X	1X
Imidazol al 2 M	10 mM
PMSF al 200 mM	1 mM
Benzamidina al 1 M	2 mM
$\beta$ -Mercaptoetanol (BME) a 14 M	3.4 mM

Se obtuvo la suspensión celular completamente homogénea, y se sonicó en pulsos de 5

segundos y 35 segundos de reposo por 10 ciclos a una potencia de 130 Watts o hasta que desaparición de la consistencia viscosa de la suspensión. Se ultracentrifugó a 40,000 rpm por 30 min. A 4 °C., se filtró el sobrenadante con membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore®) de 0.22 µM en frío. Dependiendo del volumen puede ser al vacío o con dispositivo adaptable a jeringa. Se obtuvo el clarificado celular y se mantuvo en hielo.

### 5. 13. Purificación de proteínas por HPLC (1er paso por columna IMAC)

La cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado (IMAC), es muy eficiente para proteínas marcadas con una bandera de histidinas expuesta en la superficie de proteínas recombinantes. Ya que aprovecha la propiedad de coordinación de los cationes  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$ , en primera instancia, con la molécula cargada para formar enlaces iónicos de la resina (compuesta de dextrinas) y con los electrones no compartidos del grupo imidazol de la histidina, durante el flujo del clarificado celular. La capacidad de la molécula de imidazol para competir contra el grupo imidazol (que ocupa el grupo R) de la histidina es explotada para eluir la proteína, en gradiente de 25 a 500 mM, para coleccionar las fracciones por HPLC (Berg, et. al., 2015), ver figura No. 23.



**Figura No. 23: Comportamiento de curva usando columna IMAC y coordinada con catión  $\text{Ni}^{2+}$ .** La línea rosa, es el porcentaje de capacidad de la bomba B, 1% equivale a 5 mM de imidazol. La línea azul, es la absorbancia a 280 nm, en unidades arbitrarias (UA). La flecha roja, indica la proteína de interés eluída dentro del gradiente. Tomado del manual Healthcare de GE, 2014.

#### Procedimiento:



Parte A: Lavado del equipo FPLC GE/Pharmacia-Biotech LKB FPLC system LKB Controller and LCC 501 Plus.

Se filtró agua miliQ estéril, aproximadamente 1 L e introdujimos las campanas al agua filtrada y previamente lavadas, se programó un flujo de 3 ó 5 mL/min y al 50 % de capacidad de la bomba B, se esperó de 10-15 min. hasta que se observó estabilidad en la curva de absorbancia UV a 280 nm.

Parte B: Montaje y limpieza de columnas

Se programó el flujo a 1 mL/min, se desconectó la tubería que va dirigida hacia las bombas. Cuidadosamente, se conectó en la parte superior de la columna IMAC (Inmobilized Metal Affinity Chromatography) o HiTrap® ya sea de 1 o 5 mL y las demás en un sistema en serie vertical, al final se cerró el circuito de flujo. Lavamos las columnas, a un flujo de 3 mL/min y 50% de capacidad bomba B, con agua filtrada y estéril hasta estabilidad de la curva UV.

Parte C: Elución y colección de fracciones

Una vez alcanzada la estabilidad con agua estéril y filtrada en la curva UV, pausar el equipo, eluir 10 mL de imidazol 1 M filtrado para limpieza de columnas, utilizar la bomba B a 100%, lavar la campana en todo momento al hacer cambio de solución. Cambiar al amortiguador B (ver tabla No. 15), pausar el equipo antes de hacer cualquier cambio de solución, y eluir en bomba B al 100% de su funcionamiento. Estabilizar curva UV.

**Tabla No. 15: Amortiguador de elución B.**

<b>Solución</b>	<b>Concentración final</b>
Amortiguador de lisis 10X	1X
Imidazol al 2 M	500 mM
PMSF al 200 mM	1 mM
Benzamidina al 1 M	2 mM
$\beta$ -Mercaptoetanol (BME) a 14 M	3.4 mM

Se equilibró con amortiguador A, usando la bomba A a 100% de funcionamiento, hasta alcanzar estabilidad. El flujo fue de 1-5 mL/min. (es el máximo soportado por las columnas), se tomó clarificado celular como control. Se lavó con amortiguador A hasta alcanzar la estabilidad del

detector UV, a 100% de capacidad, el flujo programó a 3 mL/min y colectamos las fracciones de proteínas no unidas a la columna, se tomó una alícuota para analizar en el gel. Se eluyó para colectar fracciones a un gradiente, con amortiguador B, con incrementos de 5% hasta el 100% de capacidad cada minuto, a un flujo de 5 mL/min. Colectamos 12 fracciones, el lote de fracciones siempre se mantuvo en hielo. Se examinó, mediante un SDS-PAGE, para seleccionar las fracciones que contenían la proteína de interés.

#### 5. 14. Diálisis de proteínas.

De acuerdo con el instructivo, se calculó la longitud de membrana, los datos necesarios fueron el volumen aproximado de la solución de proteína que se obtuvo y el valor en mL/cm de la membrana, ya que de ello dependió la cantidad de membrana a usar. La membrana de diálisis (Thomas Scientific®) de corte molecular promedio de 12 a 14 kDa y una capacidad de 6.4 mL/cm se lavó con agua destilada, para hidratar la membrana hasta separación. Posteriormente se procedió a preparar 3 litros de amortiguador TEV 1X (1:5 de amortiguador TEV 5X, (ver tabla No. 16), y 1:1000 de DTT 1 M), que fungió como solución de diálisis, se preparó en fresco. La solución se vertió en un vaso de precipitados de 1 L amortiguador TEV 1X y se cubrió con papel aluminio.

**Tabla No. 16: Preparación de amortiguador TEV 5X.**

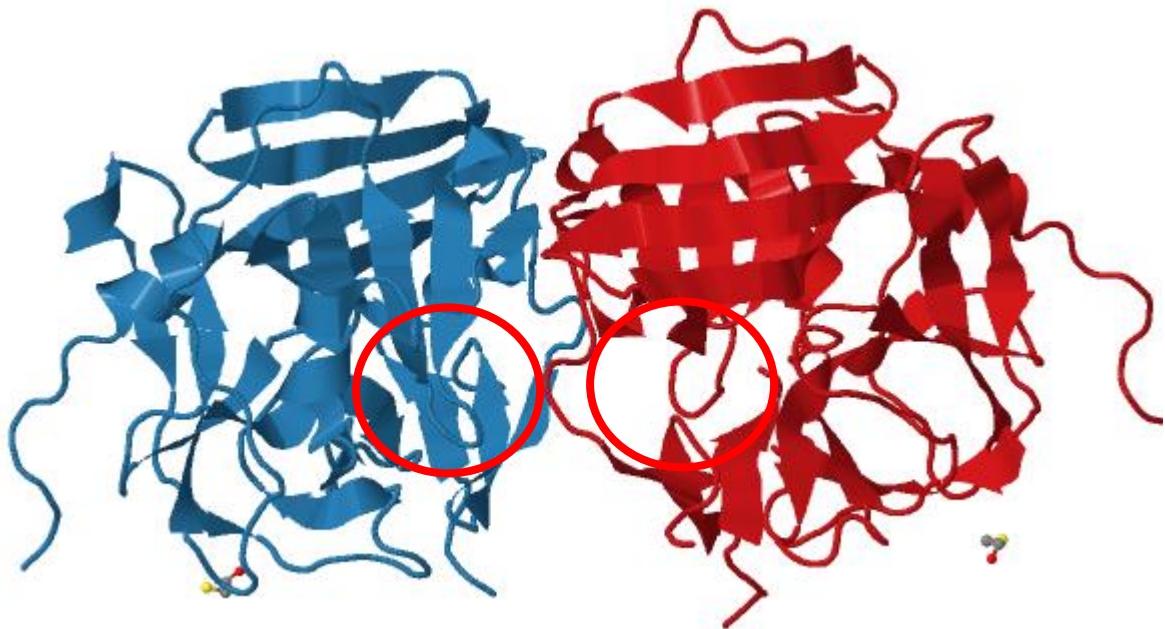
<b>Ingredientes</b>	<b>Concentración final</b>
Glicerol anhidro	50% v/v
Tris-Base 1 M pH 7.5	100 mM
Cloruro de Potasio (KCl)	750 mM

Se manipuló despegando uno de los extremos y con un trozo de hilo cáñamo se anudó 3 veces, asemejando un triángulo, para sellar el extremo. Con una pipeta serológica estéril de 5 ó 10 mL, y vació lentamente dentro de la membrana sellada, sin generar burbujas. Se cargó la muestra revisando, en todo momento, la ausencia de fugas. Vaciamos todas las fracciones seleccionadas y se selló, anudando de la misma manera que el extremo inferior. Dejamos una extensión de hilo que nos servirá como sostén. La pipeta serológica que se usó para cargar la muestra, la colocamos transversalmente sobre la boca del vaso de precipitados de 1 L para usarla de soporte. Sujetamos la membrana con la extensión de hilo en la parte media de la pipeta y fijamos con cinta adhesiva la pipeta serológica y el hilo a la boca del vaso. Introducimos una bala magnética a nuestro sistema y procedemos a mantener en agitador magnético, ajustamos la velocidad de modo que no afecte la bolsa de diálisis y el recambio de solutos sea

constante y homogéneo. Se dejó dos horas en el cuarto frío, como primera fase de diálisis. Se decantó la solución y se vertieron los 2 L restantes un vaso de precipitados de 2 L. Como segunda fase, se dejó el mismo sistema de agitación toda la noche en el cuarto frío. Finalmente, se recuperó la bolsita de diálisis y la solución de proteínas sin imidazol se transfirió en un recipiente estéril.

### 5. 15. Digestión con la proteasa TEV.

Proveniente del genoma del virus del mosaico del tabaco y perteneciente a la familia de las endopeptidasas de cisteína (E. C. 3.4.22.44) con sitio de reconocimiento y corte E-X-X-Y-Q-S/G, donde X representa cualquier residuo (EBI, 2017; Moss, 2018). En años recientes se ha añadido a la secuencia de vectores tipo plásmido como una manera de retirar proteínas reporteras, posee una estructura dimérica y pesa 54 kDa, posee una gran especificidad a su sustrato (Nunn, et. al., 2005), ver figura No. 24. En nuestro laboratorio poseemos una cepa productora de la enzima TEV para generarla en macrocultivos y posteriormente purificarla por medio de HPLC, ver material suplementario punto 10. 2. Para nuestros fines, la enzima será utilizada para retirar la bandera de histidinas de los fragmentos de la HC de la dineína.



**Figura No. 24: Estructura la proteasa TEV resuelta a 2.7 Å.** Los círculos en rojo corresponden a los sitios de reconocimiento y donde lleva a cabo la actividad catalítica. Podemos observar 2 moléculas de BME. Tomado de PDB1Q31, Nunn, et. al, 2005.

## **Procedimiento:**

Terminada la diálisis, se tomó una alícuota antes de la digestión. Se adicionó a la solución de proteína dializada, 50  $\mu\text{L}$  de enzima TEV a 4 mg/mL (como estándar) por litro de cultivo bacteriano. Se incubó a 8 °C toda noche. Se comprobó, al día siguiente, la digestión de la bandera de histidinas con SDS-PAGE.

### **5. 16. Obtención del fragmento digerido por HPLC (2do paso por columna IMAC).**

Filtramos los amortiguadores (A y B) antes de introducirlos al equipo. Se obtuvo una digestión completa con la enzima TEV y procedimos a purificar la proteína sin bandera de histidina de los residuos generados. Se llevó a cabo el mismo procedimiento de la parte A y B del punto 5.13. Colectamos las fracciones, a un flujo de 3 mL/min, en cada tubo la colecta duró 2 minutos (6 mL aproximadamente) con el amortiguador A. El número de fracciones puede variar. Con el amortiguador B, se eluyeron los residuos y enzima TEV, ya que ambos poseen bandera de histidinas. Se mantuvo en hielo el lote de fracciones obtenido.

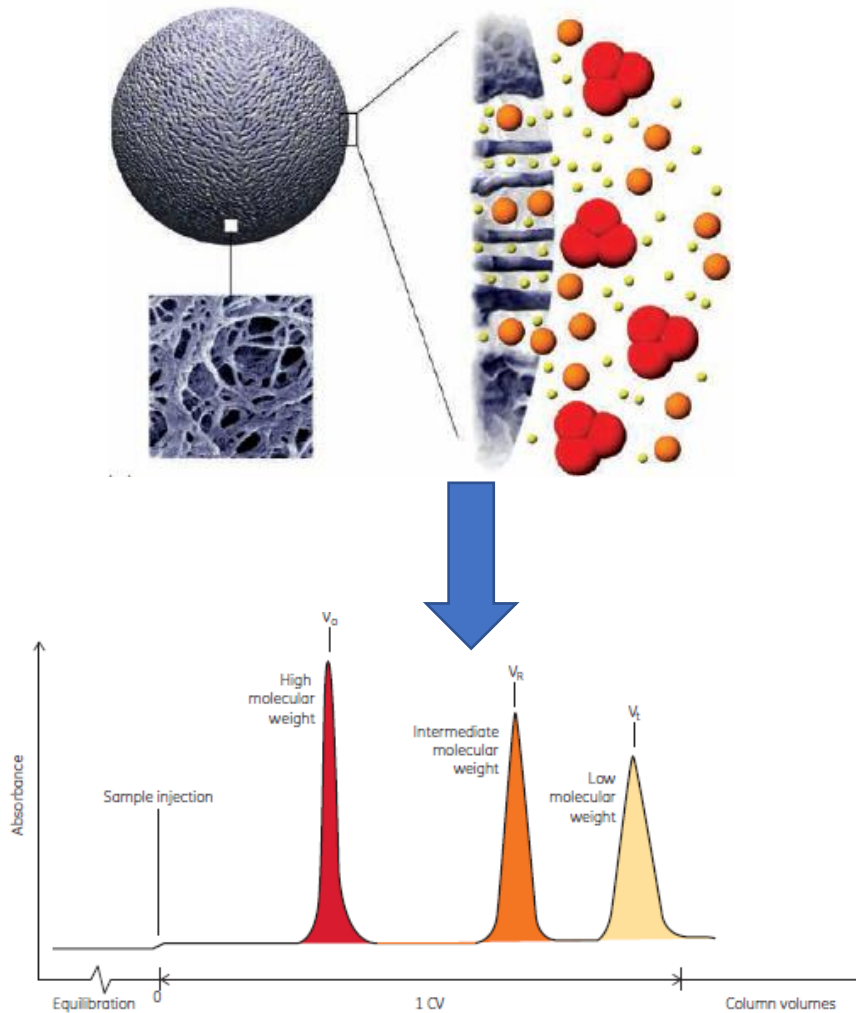
### **5. 17. Filtración por cambio de amortiguador**

Las fracciones se mantuvieron en hielo durante el proceso. En tubos Amicon® con un MWCO de 30K de 15 mL, cargamos las fracciones hasta llenarlo. Se centrifugó a 4200 rfc (fuerza centrífuga relativa) por 10 min, en principio, y a 4 °C. Con el paso de las subsiguientes fracciones, la membrana de filtración se satura. Se incrementó el tiempo de centrifugación de 5 minutos por vez, porque se observó que el volumen no disminuía. Los desechos de la filtración se decantaron en tubos falcon de 50 mL. Se concentró al volumen mínimo posible, regularmente a 250  $\mu\text{L}$ . Se extrajo la solución de proteína concentrada y vació en tubo eppendorf de 1.5 mL, se hicieron lavados al tubo Amicon® con amortiguador TEV 1X, se llevó a un volumen final de 700  $\mu\text{L}$ .

### **5. 18. Purificación por filtración molecular.**

Con este método las macromoléculas son separadas de acuerdo con el tamaño, con respecto del punto de corte que posea la resina o fase fija (matriz con partículas esféricas e inerte químicamente), que va pasando a través de la columna disueltas en un amortiguador (para

nuestro caso es amortiguador TEV 1X o fase móvil) que servirá para llevar a cabo la elución. Dependiendo del tamaño de las biomoléculas es el tiempo de retención que tendrán, es decir, que la migración de la proteína va a generar diferentes picos (en el equipo de HPLC) conforme al peso molecular (o morfología) (Baynes & Dominiczak, 2011), ver figura No. 25



**Figura No. 25: Funcionamiento de una columna de filtración molecular.** En la parte superior, se muestra una esfera que compone la matriz de la columna y a su vez el entramado que posee al interior a nivel microscópico. Al lado derecho, es una representación de cómo biomoléculas, dependiendo del tamaño o forma, ingresan o no a los poros de la esfera. Abajo, representa los picos de un cromatograma, donde cada una de las moléculas va a eluyéndose, cada color corresponde a cada proteína. Tomado de Healthcare, GE, 2014

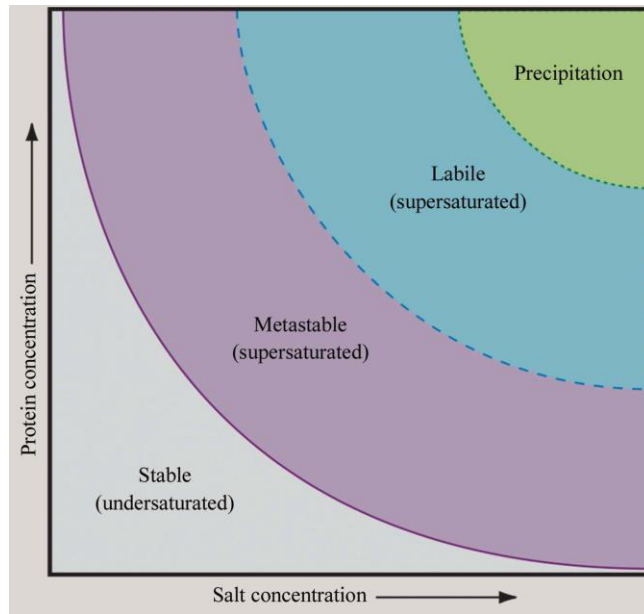
### Procedimiento:

Filtramos el amortiguador TEV 1X, el volumen necesario, y agua miliQ estéril. Se lavó el equipo con agua filtrada y estéril, las bombas estuvieron al 50% de capacidad. Se disminuyó el flujo

de las bombas a 0.5 mL/min, y se instaló la columna de superdex 200®. Se lavó la columna con agua filtrada y estéril, programamos las bombas a 50%. Se hizo con al menos 2 volúmenes de columna (48 mL). Se cambió al amortiguador TEV 1X y se lavó la columna hasta que se equilibró con 1 volumen de columna, se fijó un flujo de 0.5 mL/min y en ambas bombas mantuvimos el 50% de capacidad. Posteriormente, la muestra de proteína concentrada 700 µL se centrifugó a 14K por 2 min. Se aspiró el sobrenadante, con una jeringa estéril de 1 ó 3 mL, y transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL lentamente, sin generar burbujas. Lavamos el loop con agua miliQ filtrada y estéril, también, con amortiguador TEV 1X. Se cargó la muestra de proteína concentrada y se observó el comportamiento gradual de las curvas a la absorbancia de 280 nm. Al momento de observar un incremento, inmediatamente se colectaron las fracciones eluidas, cada una con 500 µL o bien por 1 minuto, en tubos eppendorf de 1.5 mL. El primer levantamiento lo comprendió la proteína agregada. Se analizó cuales contienen la proteína de interés con un SDS-PAGE, se tomaron los extremos inicial y final de cada curva generada. Al tener identificadas las fracciones que comprendieron la proteína de interés, se llevó a cabo la técnica de filtración por cambio de amortiguador, se concentró hasta 1 mL. Se reunieron las fracciones seleccionadas en tubo falcon de 15 mL. El equipo, se lavó con agua filtrada y estéril con 2 volúmenes de columna al 50% de funcionamiento de las bombas.

## **5. 19. Inducción de cristalización.**

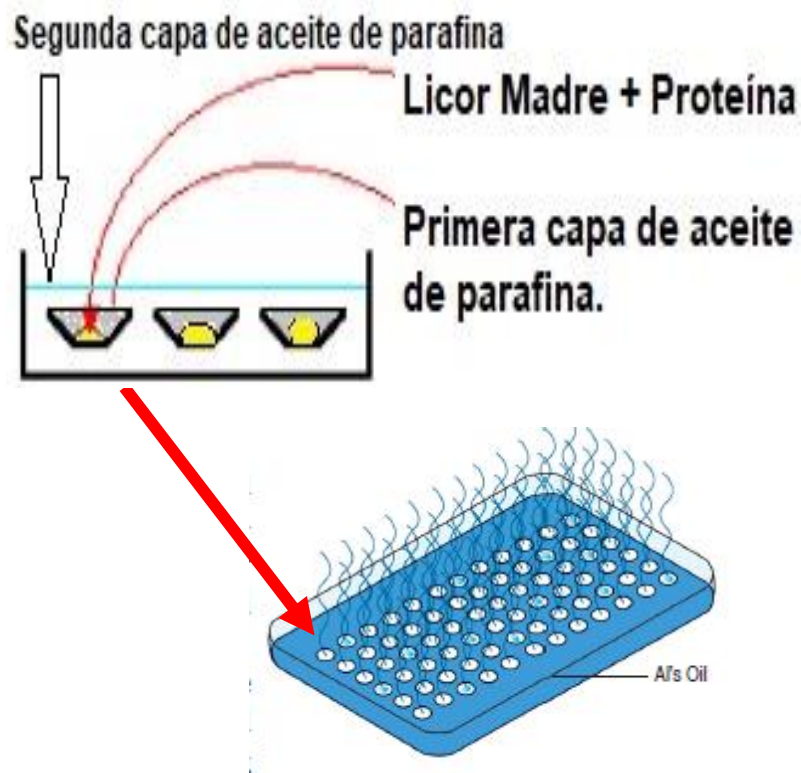
Para obtener una estructura de una proteína nativa o recombinante (con mutaciones o fragmentos) a nivel atómico, es necesario conocer y aplicar las estrategias necesarias para cristalizar una proteína y que al final de estos procesos se adquiriera un patrón de difracción aceptable. Entonces, la finalidad de obtener un arreglo cristalino de proteína, o de cualquier macromolécula de esta naturaleza, es que sirve como soporte amplificador, es decir, que al incidir los rayos X, generaremos un patrón de difracción y un conjunto de datos que nos ayudará a deducir su estructura, porque dentro del cristal existen un número muy grande de macromoléculas empaquetadas de una forma específica (McPherson, 2003; Drenth, 2009). Por esta razón, es necesario conocer el comportamiento de la cristalogénesis, descrito en un diagrama de fases de la figura No. 26.



**Figura No. 26: Diagrama de fases de la cristalización de proteínas.** Representación de las diferentes zonas que pueden generarse durante la cristalización, la zona metaestable es la que favorece la aparición de estructuras cristalinas de proteínas. Para ellos debemos optimizar con otras metodologías. Tomado de McPherson & Gavira, 2014.

#### Parte A: Método de Microbatch.

Es una de las técnicas de mayor uso y antigüedad, además, una de sus ventajas es que podemos realizar optimizaciones con los diferentes reactivos contenidos en el licor madre. El principio es el siguiente: la mezcla del licor madre y la solución de proteínas crean un nivel de supersaturación lo suficientemente alto (corresponde a zona lábil) para mantener el proceso de nucleación. Las moléculas de proteína harán transición de fase, de líquido a sólido (comienza zona metaestable). Con el paso del tiempo, el cristal crecerá y, por lo tanto, el nivel de supersaturación disminuirá porque las moléculas de proteína formarán parte de la estructura cristalina, continuando hasta que la solución de macromoléculas alcance el estado saturado, lo que significa que ninguna otra biomolécula ya no podrá formar parte del cristal, porque la solución tendrá una concentración de proteína total mucho menor que la inicial, pero el agua se evaporará y sostendrá un estado continuo de supersaturación y así sucesivamente, hasta la deshidratación (Boistelle & Astier, 1988; Broide, et. al., 1996), ver figuras Nos. 26 y 27.



**Figura No. 27: Disposición general de una caja de microbatch.** La parte superior, representa a detalle, los componentes de cada pozo. La imagen inferior, es la vista panorámica de la caja completa, las líneas ondoladas, azul, representan el vapor de agua difundiéndose. Modificado de D'Arcy, et. al., 2004 y Hampton Research, 2017.

### Procedimiento:

El protocolo de inducción inicia con el diseño *in silico* (ir a página web: [www.hamptonresearch.com/make\\_tray.aspx](http://www.hamptonresearch.com/make_tray.aspx)) donde generamos un documento digitalizado tanto de las concentraciones y volúmenes finales (generalmente de 500  $\mu$ L cada pozo) de cada pozo para una caja de 60(10 x 6) pozos de 2 mL (definir los reactivos en los rangos en X e Y, cuales reactivos son constantes, etc) con diferentes concentraciones de los reactivos que componen a cada licor madre. Se diseñó para que contengan diferentes concentraciones, en cada pozo, de: precipitante (polietilenglicol, PEG), iones (divalentes  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ), amortiguador (HEPES pH 7.5) y un aditivo (glicerol). Posteriormente, se limpió con aire comprimido la caja para licor madre con pozos de 2 mL, se etiquetó con los rangos y concentraciones de cada componente. Se preparó añadiendo cada componente de forma individual y se homogeneizó manualmente y fue sellado, cubriendo los pozos, con cinta adhesiva de alta resistencia.

Después, se limpió con aire comprimido, la caja de microbatch de 10 X 6 pozos de 8  $\mu$ L y etiquetó con el tipo de proteína, concentración, proporción, volumen y temperatura. Se colocó

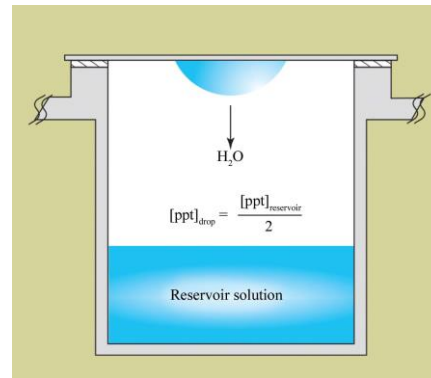


en cada pozo la proporción deseada, por ejemplo, si es 1:1, debe ser 1  $\mu\text{L}$  de proteína, previamente descongelada y mantenida en hielo, con 1  $\mu\text{L}$  de licor madre, y así sucesivamente con cada línea. Cada pozo debe ser cubierto con la cantidad necesaria de aceite de parafina, después de añadir ambas soluciones, para evitar la evaporación rápida del agua contenida en la mezcla de soluciones final. Al finalizar, bañaron todos los pozos de caja de microbatch con 3.5 mL de aceite de parafina, se le colocó la tapa e incubó a 18 °C. Se observó con el microscopio estereoscópico diariamente para dar seguimiento al crecimiento de los cristales. Una vez transcurridos 7 días (que es el tiempo óptimo para la mayoría de los cristales de proteína) se comparó y seleccionó, con el diseño *in silico*, las concentraciones de los componentes de licor madre y con ello establecimos un espectro de optimización cristalográfica. El siguiente método necesario a aplicar, a dicho rango de cristales obtenidos por microbatch, para continuar la optimización es la gota colgante.

#### Parte B: Gota colgante

Al colocar las soluciones de licor madre y proteína en una gota, inicialmente se encontrarán diluidas. La gota sufrirá evaporación de agua hasta equilibrarse con la solución madre del reservorio, y disminuirá su tamaño, pero incrementan las concentraciones de licor madre y proteína cuyo efecto resultante es la supersaturación, llevando al cambio de fase del estado líquido al sólido (promoviendo la metaestabilidad), es decir, hasta alcanzar la zona lábil o nucleación. Mientras el vapor de agua, tanto en la gota suspendida como en el reservorio de LM, no alcance el equilibrio la estructura cristalina continuará creciendo alimentándose de la solución de macromoléculas, siempre y cuando se mantenga el estado de supersaturación. El punto final de la inducción de la cristalogénesis, se alcanzará por dos situaciones, la primera es causada por el cambio de solución de proteínas y LM en estado saturado; la segunda razón, es que ya se alcanzado el equilibrio en la difusión de vapor, tanto en la gota colgante y el reservorio de LM (Chayen, 1997; Berforgs, 2009), ver figuras Nos. 26 y 28.

**Figura No. 28: Representación general del método de gota colgante montado.** Vista longitudinal de un botón de una caja para gota colgante. La fórmula representa la concentración de final de las soluciones tanto de licor madre y proteínas, después de que el vapor haya difundido al equilibrio. Tomado de McPherson, et. al., 2014



### Procedimiento:

Para gota colgante, se tomaron los pozos con mejor crecimiento cristalográfico provenientes del método de microbatch. Se limpió con aire comprimido una caja de pozos anchos de 5 x 3 y botones siliconizados. Se Añadió a cada pozo 350  $\mu$ L de licor madre de la condición seleccionada, previamente preparada de forma individual. Se colocó sobre los botones, 3 gotas en arreglo triangular de 1  $\mu$ L de proteína purificada y 0.5, 1 y 2  $\mu$ L de licor madre respectivamente sobre la gota de proteína pura. Se cubrió con 250  $\mu$ L de aceite de parafina el pozo que contenía licor madre. Cuidadosamente, se cerró el botón con las gotas suspendidas. Se incubó en las mismas condiciones en las que fueron inducidos con la técnica de microbatch. Se observó y se eligió el rango aproximado del crecimiento del cristal en proporciones volumen/volumen. Con esta información, se realizó un monitoreo para conocer la proporción con cristales de morfología óptima. Los incrementos fueron hechos de 0.1 en 0.1  $\mu$ L de LM, partiendo el rango seleccionado. Se observó el crecimiento día a día para adquirir el cristal óptimo y por ende las condiciones. Para que un cristal se considere óptimo, debe cumplir las siguientes características: tamaño incrementado con respecto del método de microbatch; morfología constante; y que sea reproducible en las proporciones donde presenta las dos propiedades anteriores.

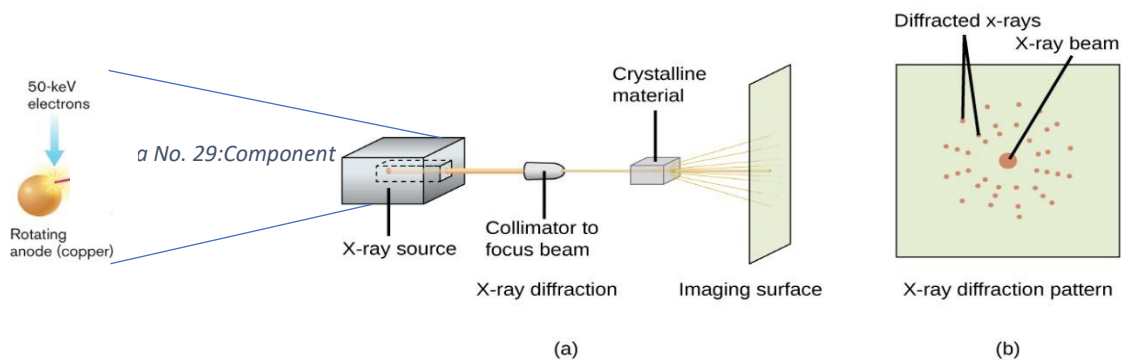
### 5. 20. Captura de cristales optimizados.

Para mantener los cristales íntegros, se preparó una solución crioprotectora (glicerol de 20-35% v/v) modificada del LM original. Se eligieron los cristales optimizados, tanto de las cajas

de microbatch como de gota colgante. Con un loop microscópico y de acuerdo con el diámetro observado, generalmente de 0.1-0.5 mm de diámetro, se tomó el cristal y una vez dentro del loop se bañó con la solución crioprotectora.

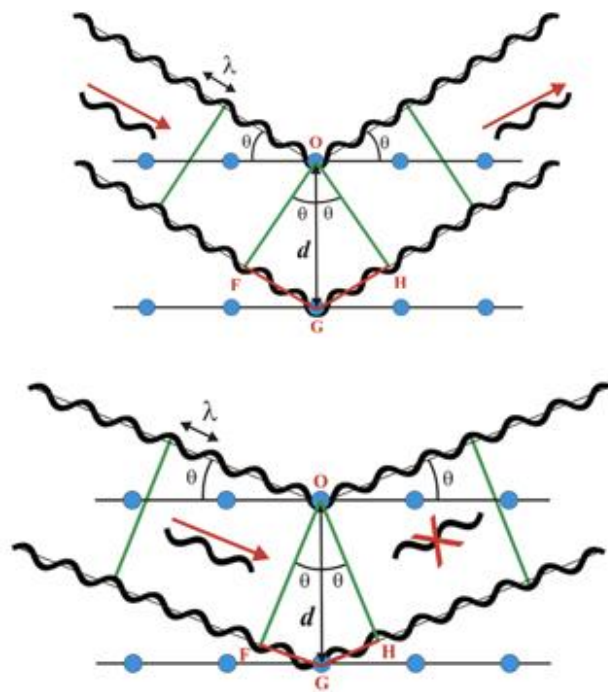
## 5. 21. Difracción de rayos X.

Los rayos X fueron descubiertos por el físico alemán Wilhelm Roetgen en 1895, llamándolos así debido a que en ese tiempo su naturaleza era desconocida, posteriormente fueron controlados en un sistema o aparato, que actualmente tiene aplicaciones médicas y de investigación básica. Mientras que Laue y Bragg, en 1912, los aplicaron al análisis de moléculas cristalinas, al principio para estudios estructurales en sales inorgánicas. Fue hasta la segunda mitad del siglo XX, que se convirtió en una de las técnicas analíticas para la deducción estructural de macromoléculas biológicas a nivel atómico aplicadas a un cristal de proteína pura (Hammond, 2009). En el caso de un difractómetro de laboratorio, los rayos-X son generados cuando a los electrones acelerados, por un pulso de alto voltaje, chocan contra una esfera (en este caso de cobre), y el efecto resultante es la producción de fotones de longitud de onda corta y por ende de alta energía que son capaces de internalizarse en los átomos de la biomolécula cristalizada, pero son una forma de energía altamente dañina para los seres vivos. Por ello, el efecto general de los rayos X es que van a dispersarse en todas direcciones dentro del cristal (interferencia), los átomos de la estructura proteica absorben la energía proveniente de los fotones, que en consecuencia excita a los electrones a un nivel superior de energía y que al final los fotones producidos por la excitación electrónica de todas las moléculas van a revelarse en forma de un patrón de difracción (Drenth, 1999), ver figura No. 29.



**Figura No. 29: Componentes y procesos de la difracción de rayos X.** En la parte izquierda, tenemos una esfera de cobre que al ser excitada genera fotones a una longitud de onda de 1.54 Å. a) Sistema de difracción de rayos X, la fuente de poder genera los rayos X, que son después colimados hacia el material cristalino. b) Resultado la interferencia entre el rayo y el cristal, genera un patrón de puntos disperso en la placa detectora, patrón de difracción. Tomado de Open Stax-Rice University, 2016.

Existen muchos factores para decidir qué o cuales cristales tienen la suficiente calidad para producir difracción de rayos-X y que sirvan para alcanzar el patrón de difracción ideal, lo que implica que deben probarse varios cristales que ya hayan sido optimizados y sean altamente reproducibles (Rhodes, 2006). Una de las leyes que rigen por qué las reflexiones se comportan de una forma en específico con respecto de la resolución, es la ley de Bragg. Nos dice que mientras los planos de un cristal, si tienen la misma distancia, generan la misma longitud de onda, es decir, son cooperativos o están en fase, lo que significa habrá reflexión y por ende patrón de difracción definido, caso contrario si no hay cooperatividad entre las longitudes de onda, éstas se cancelan y, por lo tanto, no habrá reflexiones (CSIC, 2018). ver figura No. 30.

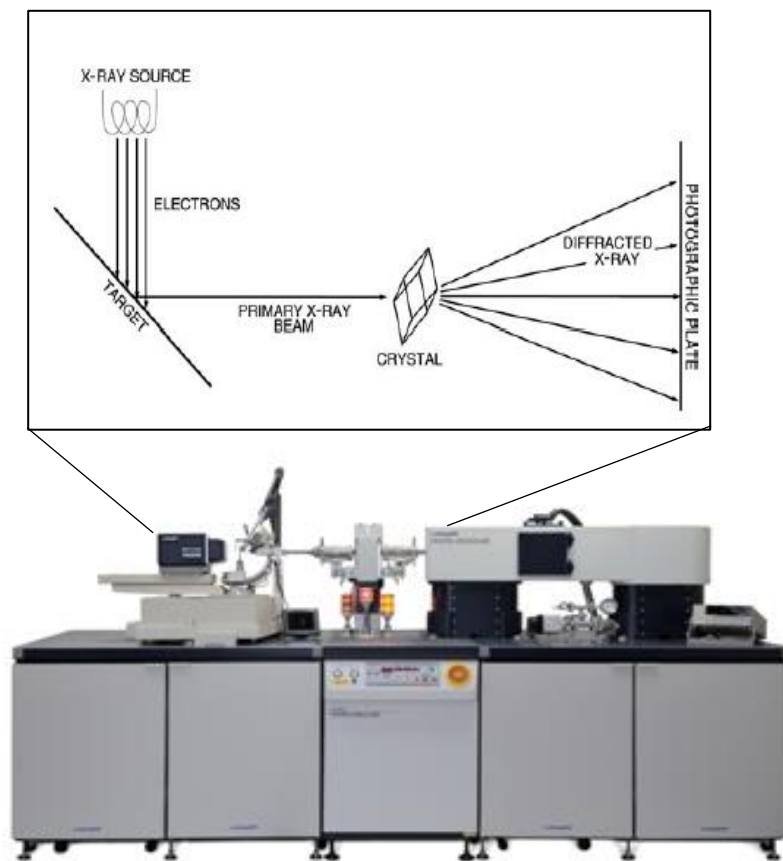


**Figura No. 30: Representación de la Ley de Bragg.** a) Planos que propagan longitudes de onda ( $\lambda$ ) con interferencia constructiva generada por los vectores salientes y entrantes,  $\lambda(FG+GH) = 2d\text{sen}\theta$ . b) Planos propagadores de longitudes de onda con interferencia destructiva, globalmente se representan como  $\lambda(FG+GH) = d\text{sen}\theta$ , la amplitud del ángulo ( $\theta$ ) es desigual, aun teniendo la misma distancia entre planos ( $d$ ). Tomado de CSIC, 2018.

## Difractómetro de rayos X de laboratorio

Es un equipo que forma parte esencial en biología estructural, ha servido en la identificación estructural de diferentes moléculas biológicas, a partir de un cristal inducido artificialmente. Los componentes básicos para su funcionamiento constan de una fuente de poder que genere una

gran energía canalizada a una esfera de metal que impacte directamente y que en consecuencia produzca electrones de alta velocidad, que mediante una serie de monocromadores van a dirigir al rayo hacia la proteína cristalizada, en donde internamente los núcleos de los átomos del cristal van a interferir a los rayos X y que al encontrar una salida van ser detectados por una placa detectora, lo cual interpretara como un patrón de difracción (McPherson, 2003), ver figura No . Recordemos que la razón de cristalizar una proteína es que en un espacio limitado y con ayuda de los rayos X es amplificar la manera en que se encuentra su estructurada a nivel a atómico. Ver figura No. 31.



**Figura No. 31: Funcionamiento de un difractómetro de laboratorio.** La imagen superior representa la forma en los rayos X generados por el equipo y son dirigidos exactamente al centro del cristal. La parte inferior al equipo correspondiente al modelo MicroMax™-007 HF de la empresa RIGAKU. Tomado de McPherson, 2009 y RIGAKU Corporation, 2018 respectivamente.

**Procedimiento:**

Una vez capturado el cristal, el loop debe ser montado y ajustado sobre el goniómetro. Se fijó con ayuda de la cámara, para centrar el cristal. Se programó a 2 ángulos, uno de 90° y otro de 45°, y exposición a los rayos X por 100 segundos. Se dispararon los rayos X al cristal y se generó un patrón de difracción digital, a 90° de rotación y posteriormente a 45°. Se analizó la información, para descartar anisotropía o alguna patología asociada al cristal de acuerdo al número de reflexiones que se observaron.

## 6. RESULTADOS

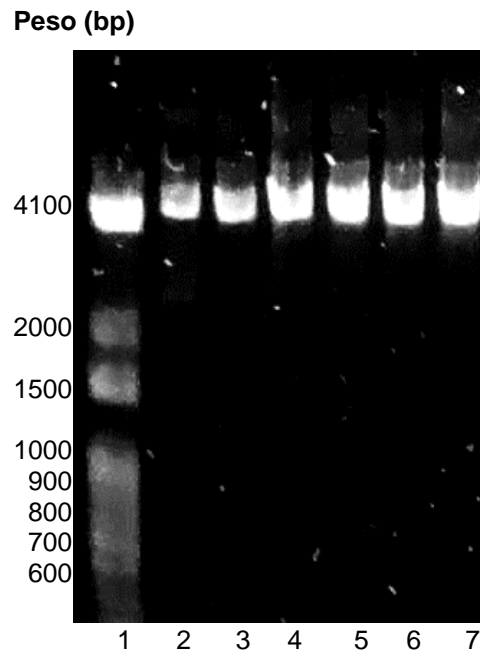
### 6. 1. Primers diseñados con mutaciones para producir fragmentos con un aminoácido menos, a partir del plásmido con el gen del fragmento 1-561 aa (p1855).

Oligonucleótido	Producto de traducción (No. aa)
F-1: ATCGCGTTTAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-1: AGCTTTTAAACGCGATCAATTCTCTCAT	560
F-2: TTGATCGCTAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-2: AGCTTTTAGCGATCAATTCTCTCATCAT	559
F-3: GAATTGATTA AAAAGCTTGATCCGGCTGC R-3: AGCTTTTAATCAATTCTCTCATCATACC	558
F-4: AGAGAATTTAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-4: AGCTTTTAAATTCTCTCATCATACCTCT	557
F-5: ATGAGAGATAAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-5: AGCTTTTATCTCTCATCATACCTCTTCA	556
F-6: ATGATGAGTAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-6: AGCTTTTACTCATCATACCTCTTCATTG	555
F-7: GGTATGATTA AAAAGCTTGATCCGGCTGC R-7: AGCTTTTAATCATACCTCTTCATTGCTG	554
F-8: AGAGGTATTA AAAAGCTTGATCCGGCTGC R-8: AGCTTTTAATACCTCTTCATTGCTGCTT	553
F-9: TGAAGAGGTA AAAAGCTTGATCCGGCTGC R-9: AGCTTTTACCTCTTCATTGCTGCTTCCC	552
F-10: CAATGAAGTAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-10: AGCTTTTACTTCATTGCTGCTTCCCAAG	551
F-11: CAGCAATGTAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-11: AGCTTTTACATTGCTGCTTCCCAAGCCT	550
F-12: AAGCAGCATAAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-12: AGCTTTTATGCTGCTTCCCAAGCCTCGG	549
F-13: GGGAAGCATAAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-13: AGCTTTTATGCTTCCCAAGCCTCGGTTT	548
F-14: CTTGGGAATAAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-14: AGCTTTTATTCCCAAGCCTCGGTTTCTT	547
F-15: AGGCTTGGTAAAAGCTTGATCCGGCTGC R-15: AGCTTTTACCAAGCCTCGGTTTCTTCTT	546

**Tabla No. 17: Secuencias de los oligonucleótidos y sus productos de traducción.**

A partir de la secuencia del DNA plasmídico, se diseñaron los oligonucleótidos para llevar a cabo la eliminación de aminoácidos específicos del extremo carboxilo terminal del fragmento 1-561 aa que fue el inicial. En la tabla No.18, podemos observar en la columna de la derecha el producto de traducción teórico.

**6. 2. Gel de agarosa al 0.8% con productos de PCR obtenidos de los primers diseñados con un aminoácido menos a partir del gen que traduce el fragmento 561 aa.**



**Figura No. 32: Análisis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR.** Carril 1, Marcador de peso molecular de 100 bp; Carril 2-4, temperaturas de 70.1, 68.5, 66.3 °C respectivamente con el gen que traduce el fragmento de 555 aa (4746 bp); Carriles 5-7, temperaturas de 70.1, 68.5, 66.3 °C respectivamente del fragmento de 553 aa (4737 bp).

Se obtuvieron los productos de PCR con la eliminación del codón objetivo, descrita en tabla No. 18, es decir, plásmidos derivados del fragmento inicial con mutaciones. En la figura No. 32, vemos los productos de amplificación. Confirmada la presencia del amplificado, procedemos a eliminar el templado con la enzima DpnI. La actividad de esta enzima es hidrolizar el DNA metilado en el templado. Terminada la digestión, se probó cada plásmido amplificado transformado en las cepas de *E. coli* TOP10 y SoluBL21. La primera cepa sirve para obtener DNA plasmídico materia prima, con el método de lisis alcalina, para posteriores transformaciones; la segunda cepa, sirve para sobre-expresar el fragmento de proteína con deleciones, mediante perfiles de expresión de cada una de ellas. El marcador de peso molecular de 100 bp (digerido con enzima de restricción PstI) fue producido en el laboratorio, también otro marcador de 1 kb (digerido con enzima de restricción EcoRV) a partir de las cepas pPSU1 y pPSU2 (Henrici, et. al., 2017), ver figura supl. No. 2.



### 6. 3. Condiciones seleccionadas de los perfiles de expresión (PE) de cada fragmento sobre-expresado y su localización en la estructura de la dineína.

Tabla No. 19: Perfiles de expresión elegidos. Zona carboxilo terminal HC del tallo.

Plásmido	Condición Seleccionada	Rango (aa)
p1697	37° C, OV	974-1455
p1698	37° C, OV	984-1455
p1699	37° C, OV	1002-1455
p1700	37° C, OV	1027-1455
p1701	37° C, OV	1046-1455
p1702	37° C, OV	1056-1455
p1703	37° C, OV	1074-1455
p1704	37° C, OV	1085-1455
p1705	37° C, OV	1097-1455
p1706	37° C, OV	1104-1455
p1707	37° C, OV	1110-1455
p1708	37° C, OV	1136-1455
p1709	37° C, OV	1156-1455
p1710	37° C, OV	1159-1455
p1711	37° C, OV	1182-1455
p1712	37° C, OV	1206-1455
p1713	37° C, OV	1235-1455
p1714	37° C, OV	1251-1455
p1715	37° C, OV	1265-1455
p1716	37° C, OV	1269-1455
p1717	37° C, OV	1303-1455
p1718	37° C, OV	1313-1455
p1720	37° C, OV	1392-1455
p1721	37° C, OV	974-1265
p1722	37° C, OV	984-1265
p1723	37° C, OV	1002-1265
p1724	37° C, OV	1027-1265
p1725	37° C, OV	1046-1265
p1726	37° C, OV	1056-1265
p1727	37° C, OV	1074-1265
p1728	37° C, OV	1085-1265
p1729	37° C, OV	1097-1265
p1730	37° C, OV	1104-1265
p1731	37° C, OV	1110-1265

Tabla No. 18: Perfiles de expresión de los segmentos amino-terminal HC del tallo.

Plásmido	Condición Seleccionada	Tamaño (aa)	Peso (kDa)
p1855	37° C, OV	561 (E)	63.90
p1855-1	37° C, 3 horas	560 (V)	63.77
p1855-2	37° C, OV	559 (R)	63.67
p1855-3	37° C, OV	558 (D)	63.52
p1855-4	37° C, OV	557 (I)	63.40
p1855-5	37° C, OV	556 (R)	63.29
p1855-6	37° C, OV	555 (E)	63.13
p1855-7	37° C, 3 horas	554 (D)	63.00
p1855-8	37° C, OV	553 (Y)	62.89
p1855-9	37° C, 3 horas	552 (R)	62.72
p1855-10	37° C, OV	551 (K)	62.57
p1855-11	37° C, 3 horas	550 (M)	62.44
p1855-12	37° C, OV	549 (A)	62.31
p1855-13	37° C, OV	548 (A)	62.24
p1855-14	37° C, OV	547 (E)	62.17
p1855-15	37° C, 3 horas	546 (W)	62.04

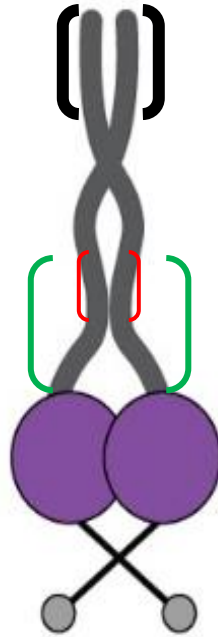
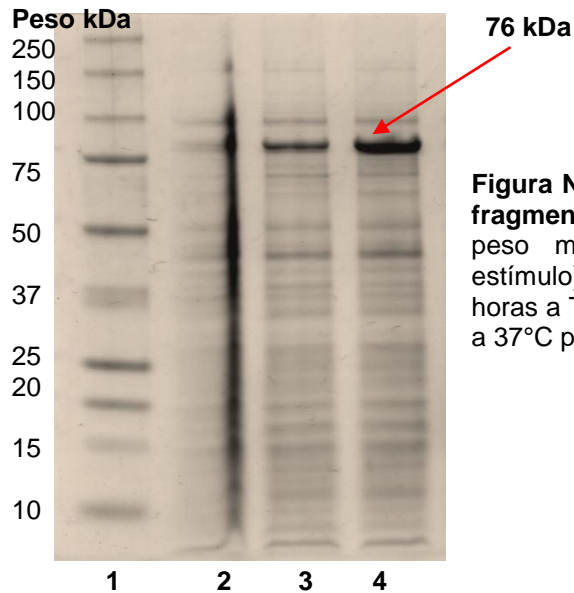


Figura No. 33: Representación de la zona correspondiente de cada fragmento de la dineína. Los colores indican la ubicación aproximada en la estructura del tallo amino terminal de la HC de la dineína.

En la tabla No. 20 se listan las condiciones elegidas de los PE de cada uno los fragmentos cercanos a la zona del linker, que fueron generados a partir de la biblioteca de plásmidos del laboratorio. Son segmentos de proteína acortados desde el extremo amino terminal, en el tallo de la HC. La tabla No. 19, describe las proteínas mutadas con un aminoácido menos, desde el extremo carboxilo terminal, también, se muestra el aminoácido final en cada fragmento. Finalmente, el peso molecular teórico obtenido la aplicación online ProtParam de ExPASy (Gasteiger, et. al., 2005). Ver figura No. 33

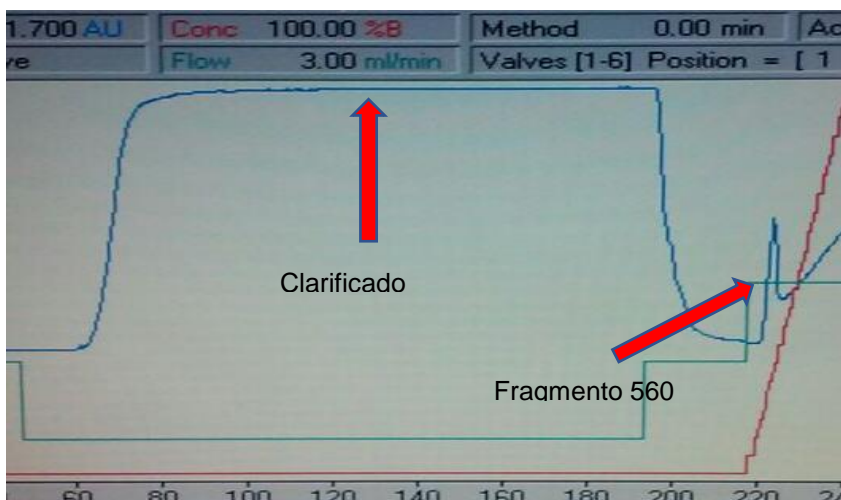
#### 6. 4. PE del fragmento sobre-expresado en célula completa de la cepa SoluBL21 *E. coli*. por SDS-PAGE



**Figura No. 34: Representación de PE del fragmento 560 aa.** Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2, Control (sin estímulo); Carril 3, Estímulo con IPTG por 3 horas a TA; Carril No. 4, Estímulo con IPTG a 37°C por 3 horas.

La electroforesis representativa de la figura No. 34 muestra la sobreexpresión del fragmento y el criterio utilizado para seleccionar la condición, fue con base en la relación proteína sobre-expresada con respecto a las proteínas de fondo provenientes de la célula y con la flecha roja señalamos la banda de mayor intensidad correspondiente a nuestra proteína. La condición seleccionada en este caso fue de 37°C por 3 horas que servirá para escalar a macrocultivos.

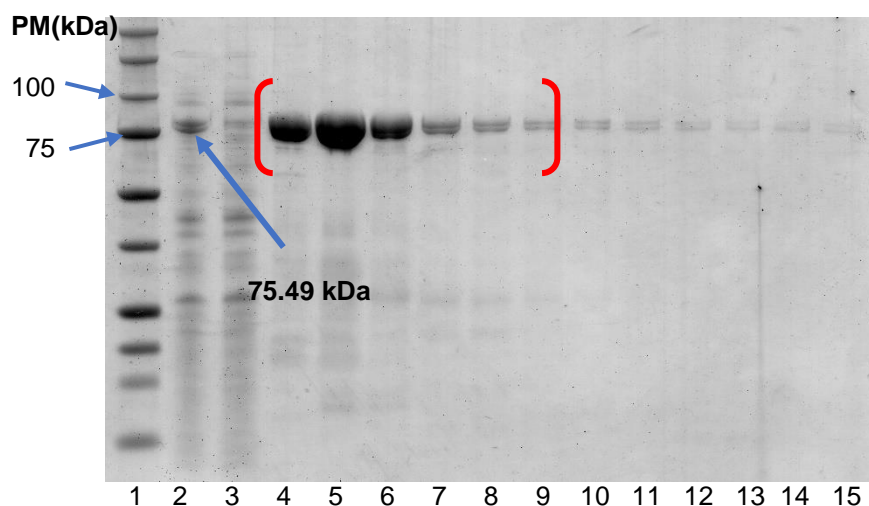
#### 6. 5. Cromatograma correspondiente a la primera fase de purificación por columnas IMAC.



**Figura No. 35: Cromatograma correspondiente al segmento 560 aa.** Línea Azul: Absorbancia a 280 nm; Línea verde: flujo (ml/min); Línea roja: Gradiente de Imidazol a 500 mM.

Para obtener el clarificado celular, a las pastillas celulares obtenidas por centrifugación, de los macrocultivos (generalmente 4 L) se les añade la solución de lisis (amortiguador A) y fueron sonicadas para ocasionar ruptura de las membranas celulares y de este modo obtener la proteína sobre-expresada. Como las proteínas que se usaron en este estudio son de naturaleza soluble, después de ultracentrifugar, estas se encuentran en el sobrenadante. Este fue filtrado con una membrana de poro de 0.22 micrómetros y unidas a columnas de níquel, mediante un HPLC a un flujo de 3 mL/min. Eluimos a la proteína mediante un gradiente de imidazol a 500 mM en incrementos de 5% en 5% de capacidad de la bomba B, cada minuto, a un flujo de 5 mL/min, colectamos las fracciones de 3 mL cada una. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE. Ver figura No. 35.

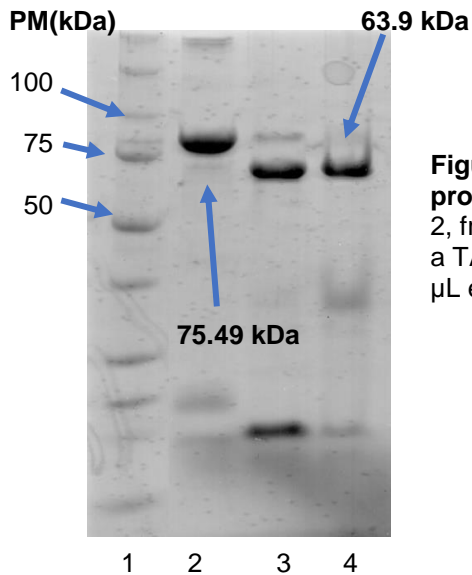
## 6. 6. SDS-PAGE del monitoreo de las diferentes fracciones eluidas de la primera fase de purificación por columnas IMAC.



**Figura No. 36: Corrimiento electroforético representativo de las fracciones colectadas por elución en columnas IMAC.** Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, clarificado celular; Carril 3, Lavado con amortiguador con imidazol a 10 mM; Carriles 3-15, fracciones 1-12. Las fracciones seleccionadas se marcan con paréntesis rojo (F1-F6). Un aumento de 5 en 5% en el gradiente, equivale a un aumento de 25 en 25 mM.

Realizamos la selección de las fracciones con mayor cantidad de proteína mostrada en la figura No. 36, las 6 fracciones elegidas, con un volumen de 5 mL cada una, fueron dializadas para retirarles el imidazol. El fragmento 1-560 aa con la bandera de histidinas tiene un peso molecular de 75.36 kDa, siendo lo esperado en el SDS-PAGE.

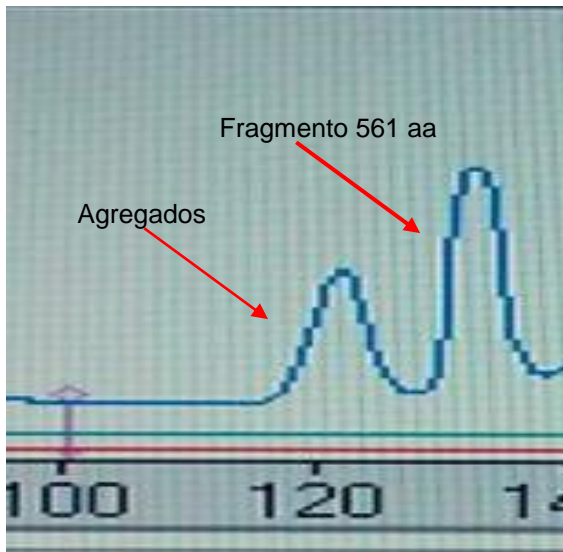
## 6. 7. Comprobación por SDS-PAGE típica de la digestión por la proteasa TEV.



**Figura No. 37: Estandarización de la digestión por la proteasa TEV.** Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, fragmento 560 sin digerir; Carril 3, digestión por 6 horas a TA; Carril 4, digestión OV a 8 °C. Cantidad de TEV 300  $\mu$ L en 4 L de cultivo bacteriano.

Para estandarizar las condiciones en que la enzima digiere la sección que contiene la bandera de histidinas, se llevó a cabo un SDS-PAGE con muestras tomadas a diferente tiempo, el cual se muestra en la figura No. 37. Como podemos observar, la condición en la que se produjo un mejor corte por la enzima TEV (ver material suplementario punto 10. 2.) en este caso, fue incubando toda noche a una temperatura de 8 °C. En el caso del carril 2, no hubo un corte del sitio completo, puede deberse a la forma en que encuentra plegado en el fragmento proteico. Finalmente, el volumen de 300  $\mu$ L de TEV a 4  $\mu$ g/ $\mu$ L fue el óptimo para la digestión *in vitro*. Posteriormente se realiza la segunda fase por columna IMAC, programando el HPLC a un flujo de 3 mL/min y la duración por fracción eluída es de 2 min, (6 mL), en este caso tenemos un volumen 60 mL de digerido, una precaución a la hora de realizar la segunda fase es que debemos de revisar no haya agregados de la enzima TEV, en caso de aparecer se debe filtrar la solución de proteínas. Las fracciones fueron centrifugadas por la técnica de cambio de amortiguador por filtración para separar el fragmento con una membrana de MWCO de 30 kDa.

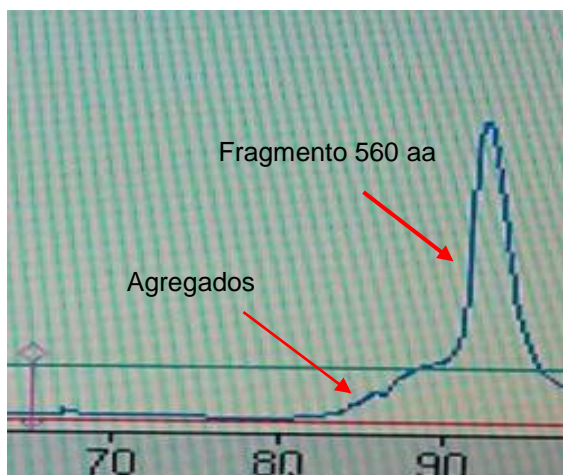
## 6. 8. Cromatograma de filtración molecular incluyendo el método de centrifugación por cambio de amortiguador del fragmento de 561 aa.



**Figura No. 38: Curvas cromatográficas típicas de la filtración molecular del fragmento 561 aa.** Línea Azul-Absorbancia a 280 nm, Línea-verde-flujo en mL/min., Línea rojo-Porcentaje del funcionamiento de la bomba B. Flecha rosa, inyección de la muestra y las flechas rojas indican a qué tipo de analito pertenecen.

Uno de los métodos más prácticos para acelerar el proceso de purificación, es el cambio de amortiguador por filtración, el beneficio para nuestro fragmento inicial fue que tuvo implicaciones en el rendimiento al momento de realizar la filtración molecular, podemos observar un incremento en la curva de proteínas agregadas con respecto del fragmento 561 aa, del cual tenemos que esperar 15 min. para que sea eluído y comenzar a coleccionar a un flujo de 0.5 mL/min, o cada fracción de 1 min. En las curvas definitivas, puede observarse una gran pérdida en proteína agregada. El amortiguador inicial es el que contiene 10 mM imidazol y el final es el TEV 1X con DTT. Por ello, decidimos buscar un método que nos ayudará a disminuir o eliminar este problema. Ver figura No. 38.

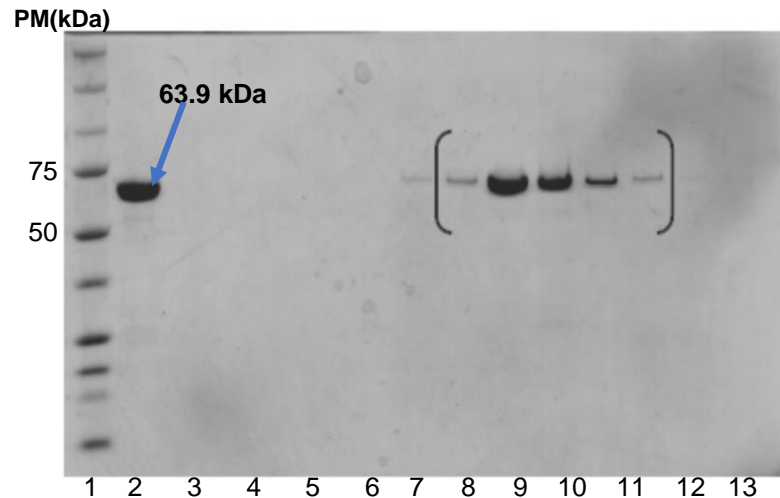
## 6. 9. Ejemplo de cromatograma de filtración molecular del fragmento 560 aa con diálisis sustituyendo el método de centrifugación por cambio de amortiguador.



**Figura No. 39: Curvas cromatográficas características de la filtración molecular del fragmento 560 aa.** Línea Azul-Absorbancia a 280 nm, Línea-verde-flujo en mL/min., Línea rojo-Porcentaje del funcionamiento de la bomba B. Flecha rosa, inyección de la muestra y las flechas rojas indican a qué tipo de proteína corresponde.

La diálisis representó la mejor opción para disminuir los agregados de proteína, ver figura No. 40. En cambio la curva correspondiente al segmento 560 aa tuvo un incremento muy notorio con respecto de cambio de amortiguador por filtración. El MWCO de los poros de la membrana de celulosa fue de 12-14 kDa, fue lo que posiblemente favoreció la rápida difusión del imidazol y otros componentes, como proteínas pequeñas.

## 6. 10. Análisis de las fracciones eluidas del fragmento 560 aa por SDS-PAGE.



**Figura No. 40: SDS-PAGE de las fracciones por filtración molecular seleccionadas.** Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, fragmento 560 aa digerido; Carriles 3-7, fracciones 1-5; Carriles 8 y 9, fracciones 7 y 9; Carril 10, fracción 11; Carril 11, fracción 13; Carril 12, fracción 15; Carril 13, fracción 17; Carril 14, fracción 19; Carril 15, fracción 21. Los paréntesis en negro fueron las seleccionadas para concentrarlas. Flecha azul indica banda de interés y peso molecular.

La selección de las fracciones para el SDS-PAGE, fue tomando las fracciones que corresponden al inicio y final de la curva de los agregados. Del mismo modo, fue seleccionado para el fragmento 560 aa. En la figura No. 40, se observa que sólo fueron 6 las fracciones que contenían proteína, la cual fue reunida, cuantificada y concentrada.

## 6. 11. Configuración global de una caja con LM para optimizar cristales de proteína.

Rango de PEG 4K 19.8-28.26%

Rango de Iones divalentes Ca/Mg 94-500 mM

0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 19.80 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 20.74 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 21.68 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 22.62 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 23.56 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 24.50 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 25.44 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 26.38 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 27.32 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 28.26 % PEG 4K 0.094 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 19.80 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 20.74 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 21.68 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 22.62 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 23.56 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 24.50 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 25.44 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 26.38 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 27.32 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 28.26 % PEG 4K 0.175 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 19.80 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 20.74 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 21.68 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 22.62 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 23.56 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 24.50 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 25.44 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 26.38 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 27.32 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 28.26 % PEG 4K 0.256 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 19.80 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 20.74 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 21.68 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 22.62 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 23.56 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 24.50 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 25.44 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 26.38 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 27.32 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 28.26 % PEG 4K 0.337 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 19.80 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 20.74 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 21.68 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 22.62 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 23.56 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 24.50 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 25.44 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 26.38 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 27.32 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 28.26 % PEG 4K 0.418 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 19.80 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 20.74 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 21.68 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 22.62 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 23.56 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 24.50 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 25.44 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 26.38 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 27.32 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % Glicerol 28.26 % PEG 4K 0.499 M Divalentes Ca/Mg

**Figura No. 41: Diseño básico de una caja de LM.** Diferentes concentraciones de los mismos reactivos que la componen, nos permiten tener un amplio margen de optimización para la inducción de cristales.

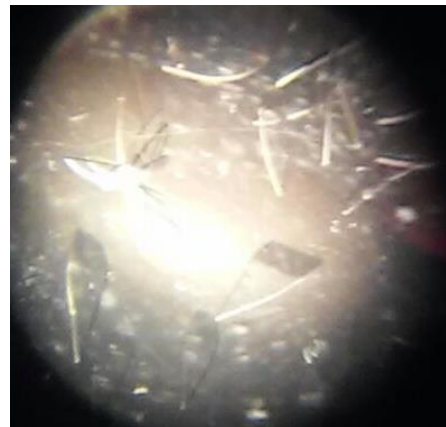
Todas las proteínas que no han sido cristalizadas, deben someterse a una prueba con diferentes mezclas de soluciones y reactivos distintos como base, en las que generalmente en cada condición se ha logrado cristalizar una proteína. Estos parámetros son conocidos como condiciones al azar (son más de 2 mil condiciones diferentes), si hay presencia de cristales en cualquiera de ellas, el paso siguiente es optimizar de acuerdo con las proporciones de los

reactivos que contenga el LM, la caja en la figura No. 41 es un ejemplo común. El fragmento 561 aa ya había sido analizado por condiciones al azar en nuestro laboratorio, proporcionando las condiciones que hasta ahora hemos modificado en gran medida para la optimización de los cristales.

## 6. 12. Comparación de los cristales optimizados por método de microbatch y gota colgante de los fragmentos 560 y 561 aa.



A. Cristal fragmento1-561 aa



B. Cristal fragmento1-560 aa



C. Cristal fragmento1-561 aa



D. Cristal fragmento1-560 aa

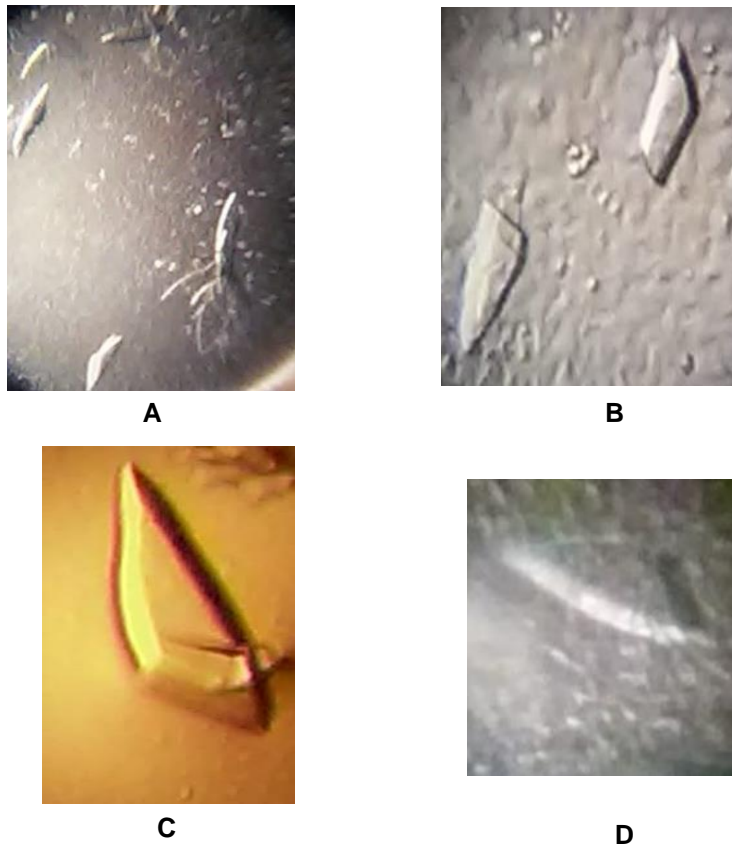
**Figura No. 42: Diferentes cristales obtenidos con el fragmento 561 y 560 aa.** A y B cristales obtenidos por método de microbatch. C y D cristales inducidos por el método de gota colgante. Ambas concentraciones fueron a 10 mg/mL.

Puede notarse que los cristales generados con los 2 métodos se muestran en la figura No. 42. Los fragmentos fueron inducidos en las mismas condiciones de cristalización, para microbatch 12.35%p/v PEG 4K, 50 mM de iones divalentes, 20%v/v de glicerol y 100 mM de HEPES a pH 7.5 y una concentración de proteína de 10 mg/mL. Cabe mencionar que son las mismas



condiciones con las que cristalizó el fragmento 561 aa. Para gota colgante, la única variación fue la molécula amortiguadora, en el inserto C se utilizó Tris-base 100 mM pH 7.4; en el inserto D, MOPS 100 mM pH 7.4. Ver material suplementario punto 10. 5., para detalles en los diseños optimizados.

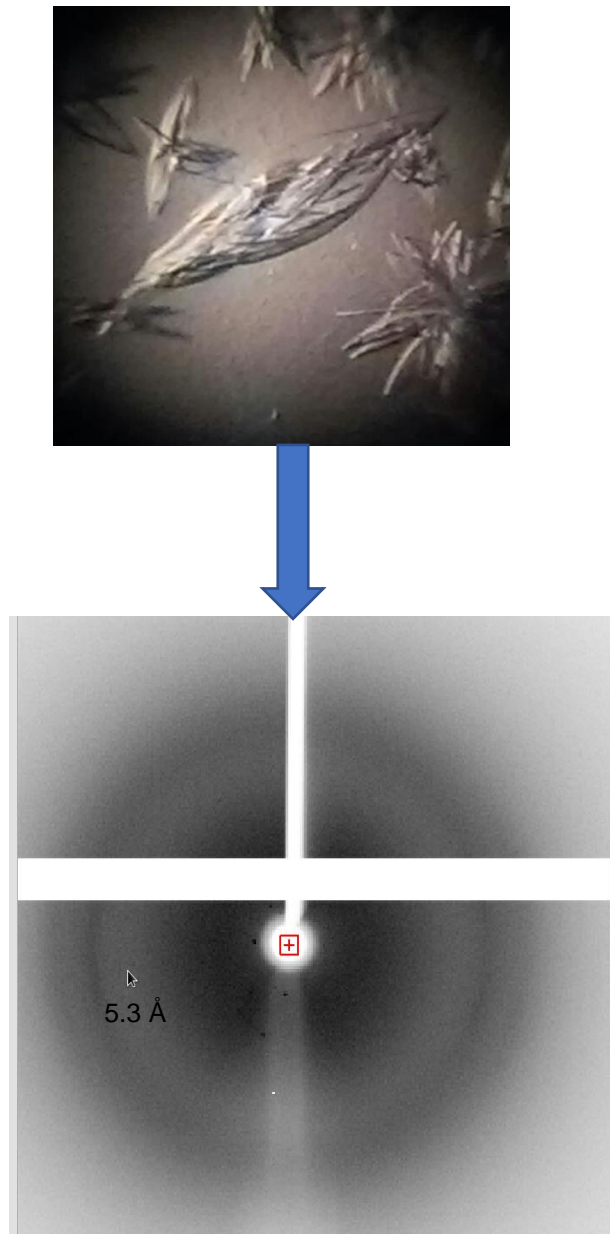
### 6. 13. Cristales optimizados del fragmento 560 aa modificando las concentraciones de la proteína total.



**Figura No. 43: Cristales optimizados por el método de microbatch y gota colgante.** A y B, método de microbatch a 5.26 mg/mL de proteína total. C y D, método de gota colgante a 12.22 mg/mL.

Para optimizar los cristales, es necesario crear o modificar las condiciones, ya sea cambiando el tipo de molécula amortiguadora, el pH, el tipo de ion, la concentración de proteína total, etc. Por ello, la figura No. 43, en los insertos A y B, a pesar de ser una concentración de proteína a 5.26 mg/mL, se presentó la cristalogénesis pero a costa de un porcentaje de PEG 4K y divalentes elevado (entre 25-28% v/v, divalentes 170-200 mM). En el inserto C, solamente se cambió la concentración de proteína total a 12.22 mg/mL (fueron las mismas que la figura No. 42). En el inserto D, se sustituye cloruro de bario por los divalentes  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ .

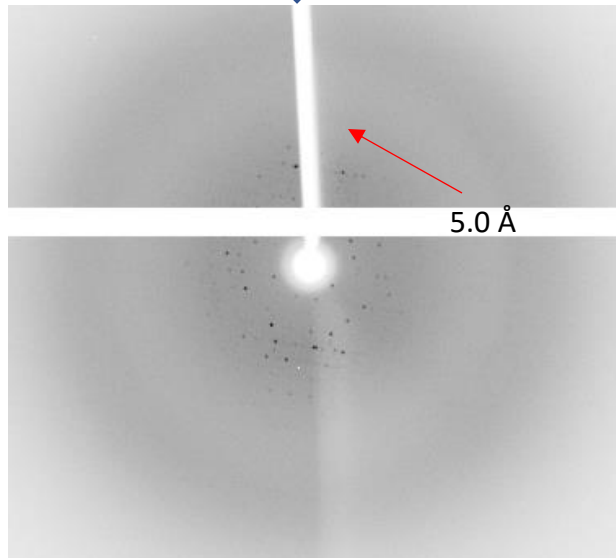
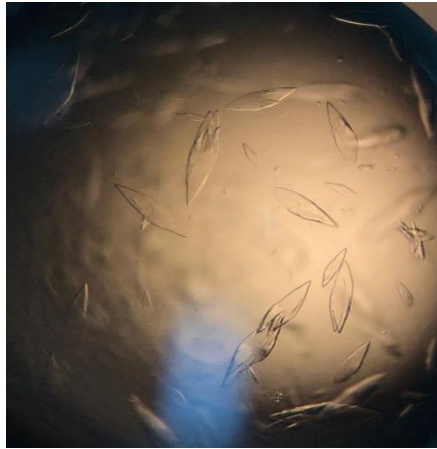
**6. 14. Patrón de difracción obtenido de cristal optimizado por el método de gota colgante del fragmento de 561 aa.**



**Figura No. 45: Patrón de difracción del fragmento 561 aa.** El patrón de difracción corresponde al cristal de la parte superior, el mejor fue a 90° de rotación. La flecha indica el punto donde se ubica la reflexión con mayor resolución.

Los patrones de difracción son obtenidos de los cristales optimizados por los diferentes métodos que hasta el momento hemos realizado, en este caso, el cristal fue montado en el difractor al modelo MicroMax™-007 HF de RIGAKU. Las difracciones se realizaron a dos ángulos de rotación, 90° y 45°. Las imágenes a 90° fueron las mejores. Debido a que presentó un fenómeno conocido como anisotropía, significa que el cristal tiene resoluciones y reflexiones diferentes en sus caras. La resolución máxima fue de 5.3 Å. Ver figura No. 45.

## 6. 15. Patrón de difracción de cristal optimizado por gota colgante del fragmento 560 aa.



**Figura No. 46: Patrón de difracción adquirido del fragmento 560 aa cristalizado.** El número de reflexiones aumentó, lo que es indicativo que al retirar un aminoácido hay cierta mejora en la retícula de difracción. Obtenido a una rotación de 90°. La flecha roja indica la reflexión con mejor resolución.

El fragmento 560 aa rotado a 90°, tuvo un número mayor de puntos de reflexión, aunque esto no fue suficiente para eliminar la anisotropía del cristal, hubo una ligera mejora en la resolución, lo que nos alienta a diseñar más condiciones para mejorar la calidad de los cristales inducidos. 5.0 Å fue la resolución máxima alcanzada para los cristales optimizados, ver figura No. 46 cuadro superior.

## 7. DISCUSIÓN

Los criterios de selección aplicados a los perfiles de expresión fueron hechos con base en la abundancia relativa cualitativa de la proteína total, visualizados en los SDS-PAGE de célula completa con la cepa Solubl21 de *E. coli* respecto del fragmento de interés (1-546;561 aa ó 974;1235-1455 aa) sobre-expresado en las diferentes condiciones realizadas (incubación a temperatura ambiente ó 37 °C, 3 horas o toda la noche de estímulo con 1 mM de IPTG), cuyo fin es llevarlo a producción masiva (>1 L).

La purificación del fragmento proteico fue facilitada por la presencia de una bandera de histidinas que genera el plásmido pRSET y que al eluir el clarificado celular saturará las columnas IMAC, es decir, la formación de complejos de coordinación en el átomo de níquel, la función desempeñada por la molécula de imidazol es competir contra las moléculas de histidina debido a su similitud estructural (presenta un grupo imidazol en la cadena lateral). Además, otro beneficio del plásmido pRSET, es que genera un sitio de corte para la proteasa TEV, inicialmente los fragmentos tienen un peso molecular mayor, por ejemplo, la proteína 561 aa, tiene un peso aproximado de 75.49 kDa (ver figura No. 36) y una vez digerido sufre una disminución quedando en 63.9 kDa, lo cual nos deja con el fragmento específico de la HC demostrado por los SDS-PAGE después de la exclusión molecular, ver figura No. 40.

Sustituir la diálisis, tuvo dos funciones fundamentales: la primera, es que disminuye la gran concentración inicial de imidazol (contenida en el amortiguador B), evitando la formación de agregados de fragmentos digeridos; la segunda, es que baja concentración (menor a 20 mM) de imidazol, de modo, que no inhibe estéricamente la enzima y por ende la digestión se realice adecuadamente. La baja eficiencia de la enzima TEV puede verse afectada el plegamiento el sitio de corte, ya que puede encontrarse en diferentes grados de exposición, que de acuerdo a la figura No. 37 observamos una banda de ligera intensidad en el fragmento no cortado (carril 3), aunque otra razón, va a depender de la secuencia primaria, es decir, que tipos de aminoácidos estén cerca de la zona de digestión, por lo regular las prolinas que flanqueen el sitio de corte afectan disminuyendo la actividad catalítica, aunque este no es el caso (Hook & Truman, 2013). Normalmente, para concentrar las fracciones eluidas en la segunda fase de la columna IMAC, aplicamos la técnica de centrifugación por cambio de amortiguador, pero en el caso de los fragmentos proteicos 561 y 560 aa, la cantidad de agregados era alrededor del 50%, ver figuras No. 38, representando una gran pérdida, posiblemente suceda porque durante el proceso de concentración, la interacción física de las proteínas por compactación sobre la

membrana de filtración durante la centrifugación, los cambios bruscos de temperatura o incluso proteínas residuales que pudieran promover la agregación provenientes de la primera fase purificación por columnas IMAC, otro factor podría ser la elevada concentración de imidazol, ya que en algunas fracciones puede llegar a tenerse, en promedio, 250 mM. Por ello, otro de los beneficios proporcionados por la diálisis fue disminuir los agregados, a menos del 10% aproximadamente (figura No. 39).

La pureza estimada por filtración molecular es cercana al 98-99%(ver figura No. 40), siendo suficiente para inducir la cristalogénesis, el mínimo de pureza reportado es del 95% (Hickman & Davies, 1997). Posteriormente cuantificamos la proteína y la concentramos a 10 mg/mL que se toma como un estándar para la cristalografía de proteínas (Berforgs, 2009).

Los cristales obtenidos en las figura No. 42, insertos A y C, corresponden al fragmento 1-561 aa (de aquí en adelante 561 aa), la morfología inicial muestra un patrón en flor de 5 pétalos con el método de microbatch, el desarrollo cristalogénico fue en una condición con una concentración de PEG 4K (21.4%) e iones divalentes de Ca/Mg (220 mM) alta, a partir de aquí comenzamos la optimización y una vez obtenido cristales individualizados, realizamos un tamizaje con el método de gota colgante, siendo las proporciones 1:1 (Proteína:Licor Madre), donde logramos tener cristales de con mayor tamaño y grosor, ésta fue la morfología final. En tanto para el fragmento 560 aa, se modificó la composición y concentraciones del licor madre para beneficiar al cristal, fue el que tuvo cambios más notorios fue reemplazar la molécula amortiguadora HEPES por TRIS o MOPS a pH 7.4, todo esto en el método de gota suspendida, el resultado ver figura No. 42, insertos B y D, que muestran el crecimiento favorable tanto como en tamaño y grosor, creemos que el cambio de medio o incluso la estructura misma de la molécula, afectó positivamente la cristalogénesis, la morfología final adquirida fue rómbica o trivialmente conocida como “macla”. Otro de los cambios realizados, como condiciones adicionales, fue sustituir el peso molecular del PEG 4K que es el inicial por otros de menor peso, por ejemplo: 2K, 1K, 400, 200, etc., con la finalidad de saber si habría mejora en nuestros cristales (Van Driessche, et. al., 2018). Esta optimización fue llevada a cabo mediante el método de microbatch y al realizar las observaciones durante una semana (que es el tiempo en que el fragmento 560 aa cristaliza) ninguno de los pozos presentó cristales, lo cual puede deberse a que estos tipos de PEG, debido a su tamaño, no cubren adecuadamente la primera capa de solvatación de la proteína, permitiendo el libre movimiento de algunos o todos los sectores del fragmento que presentan una cinética externa elevada.

Los iones divalentes Ca/Mg, tienen una participación importante para la cristalización, porque permiten que la estructura interna de la proteína comience a estabilizarse en una forma metaestable, es decir, en forma de cristal. El mecanismo es que los cationes compiten por los espacios internos que el agua ocupa o forma complejos de coordinación en estados de oligomerización cristalinos (no fisiológicos). Por ello, otro de los reactivos del LM reemplazados fueron los iones divalentes por los pertenecientes a la familia de los alcalinotérreos (en forma de cloruros de bario, estroncio, calcio) e incluso combinaciones de ellos ( $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$ - $Sr^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ - $Sr^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ - $Sr^{2+}$ ) todas a 50 mM, ninguno exhibió algún cambio prometedor(excepto el ion  $Ba^{2+}$ , ver figura No. 43, inserto D), en algunas combinaciones hubo precipitación de la proteína (efecto de salting-out). El cambio de concentración en la proteína, por disminución a 5.26 mg/mL tuvo un gran efecto en la cristalización por el método de microbatch, exponiendo cristales con un grosor y tamaño aceptables, al inducir con una concentración menor de proteína, se necesita una mayor concentración de PEG 4K e iones divalentes Ca/Mg (178 mM), lo que sucede a nivel molecular, es que las soluciones concentradas de PEG 4K (hasta 28%) están cubriendo de forma efectiva las primeras capas de solvatación en una concentración menor de proteína . En la figura No. 43, insertos A y B, se observa que la concentración de proteína es inversamente proporcional a la concentración de PEG 4K a e iones divalente Ca/Mg. El caso contrario sucede a mayor concentración de proteína (12.22 mg/mL) es menor la concentración de PEG (12.35%v/v) e iones divalentes Ca/Mg(50 mM), tal como lo vemos en la figura No. 43, inserto C.

En gota colgante, con el fragmento 560 aa, se indujeron cristales con la proteína concentrada a una concentración de 12.22 mg/mL, tuvo 3 proporciones que presentaron cristales con las características esperadas y fueron 1:0.7, 1:0.8 y 1:0.9. La explicación, es que a mayor concentración de proteína el PEG 4K e iones divalentes alcanzan el equilibrio el estado metaestable más rápido (3 días) en estas proporciones que con la concentración estándar (5 días).

El recorte de un aminoácido a nuestro segmento inicial (561 aa), afectó de manera importante la cristalogénesis y el número de reflexiones del cristal. Fue el residuo de glutámico en el extremo carboxilo, que generalmente tiene carga negativa a pH 7.5 es polar y soluble, que debido a su carga afectaba la forma de los cristales o el proceso en si. Para el caso de 560 aa, en el extremo carboxilo tiene un residuo no polar e hidrofóbico, valina, que otorgó estabilidad a la estructura de forma global y sobretodo sin afectar la conformación porque cristalizó en las mismas condiciones que el fragmento 561 aa. En el caso del resto de los fragmentos, ninguno

cristalizó en las condiciones de optimización de 561, aquí pudo haberse llevado a cabo el efecto de catástrofe, es decir, que se pudo manifestar a partir del segundo aminoácido truncado, cambiando totalmente la conformación de todos los segmentos de proteína. También, ambos fragmentos abarcan el arreglo hélico 3, que contiene el dominio de dimerización (NDD), importante para la autoinhibición y que, además, contiene la conformación estructural para interactuar con la dinactina y el adaptador de carga (Urnavicius, et. al., 2018). Por otra parte el patrón de difracción de 561 aa, tuvo una resolución final de 5.3 Å y un número de reflexiones insuficiente para deducir alguna estructura atómica, además los cristales tienen un problema conocido anisotropía, es decir, que las caras difieren en resolución y número de reflexiones en diferentes ángulos de rotación (90° y 45°), es una patalogía del cristal muy común, aunque de acuerdo a la ley de Bragg, podemos explicar que el promedio de las longitudes de onda (del mismo tipo, pero muy baja) de interferencia constructiva (o destructiva, si generan desfases o en cuanto a su amplitud o frecuencia) puede generarnos resoluciones bajas, y por ellos fue corroborado en difrentes rotaciones. En cambio el fragmento 560 aa, presenta una retícula con aumento en el número de reflexiones, se alcanza en cierta medida a observar un patrón de difracción pero la resolución de los puntos no es la suficiente, siendo sólo de 5.0 Å de resolución, sin dejar de presentar anisotropía. En ninguno de los patrones de difracción fue posible adquirir un grupo de datos.

## 8. CONCLUSIONES

- Al cristalizar el fragmento 561 aa se obtuvo un patrón de difracción, pero con resolución máxima fue de 5.3 Å que no es adecuado para obtener datos para una posible estructura atómica.
- Al truncarse el fragmento de 561 aa codón por codón desde el extremo carboxilo terminal, alcanzamos una mejora en longitud y grosor de los cristales, aunque el patrón de difracción continúa muy bajo con el fragmento de 560 aa (5 Å).
- Los cambios de molécula amortiguadora, peso molecular y concentración de PEG, no dieron una respuesta a la cristologénesis siempre y cuando se mantenga la concentración de 10 mg/mL.
- La combinación entre el cambio de concentración de proteína, de molécula amortiguadora, así como los iones mejoran la calidad de los cristales en términos de tamaño y morfología.
- La resolución alcanzada hasta el momento no es suficiente para obtener una estructura atómica.
- Los cristales del fragmento 560 aa parecen tener mayor estabilidad con respecto a los obtenidos con el fragmento 561 aa y esto se sabe, porque, tienen una mayor reproducibilidad en cristales individualizados.
- Los cristales del fragmento 560 aa parecen tener mayor estabilidad con respecto a los obtenidos con el fragmento 561 aa y esto se sabe, porque, tienen una mayor reproducibilidad en cristales individualizados.
- Se observó reproducibilidad, en tamaño y grosor, de los cristales a una concentración de 5.26 mg/mL únicamente por el método de microbatch a una elevada concentración de precipitante (PEG 4K AL 28%).

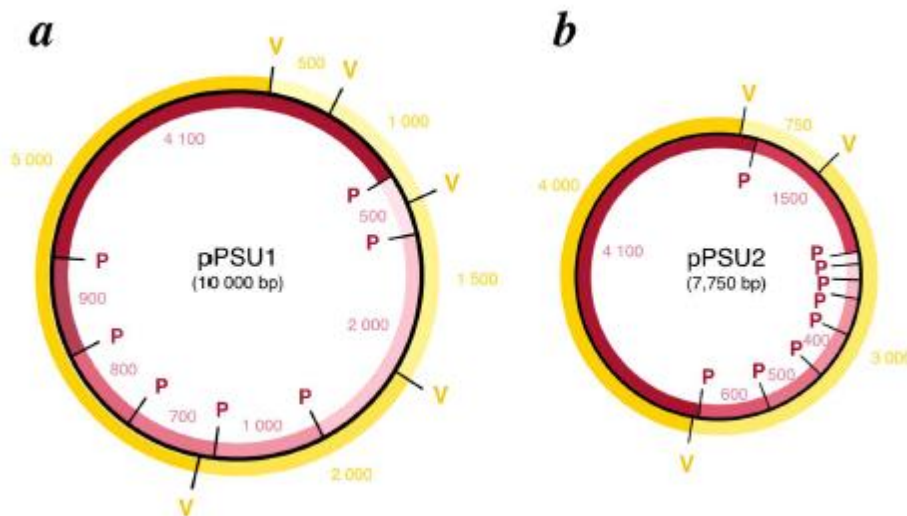


## 9. PERSPECTIVAS

- Continuar con la optimización de los cristales del fragmento 560 aa, mediante el diseño de nuevos rangos de optimización, elevación de la concentración, así como el uso de metodologías alternativas (micro y macrosembrado de cristales, entre otras).
- Obtener un grupo de datos adecuado para generar la estructura atómica del fragmento 560 aa a mayor resolución.
- Una vez optimizadas las condiciones de cristalización y análisis por difracción, se realizarán el análisis de datos y la generación de un modelo atómico del fragmento perteneciente al dominio tallo.

## 10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### 10. 1. Protocolo para la preparación de marcadores de peso molecular para DNA



**Figura Supl. No. 1: Plásmidos diseñados para producción de marcadores de peso molecular de DNA.** El color amarillo y con letra V, corresponde a la extensión y sitios de corte con la enzima de restricción EcoRV, que genera un marcador de 1kb. El color rojo-rosa, representa los sitios de corte de PstI (letra P) y su tamaño, la digestión con esta enzima produce un patrón de 100 bp. La nomenclatura es para ambos plásmidos, a y b, porque tienen fragmentos en común. Tomado de Henrici, et. al., 2017.

#### 10. 1. 1. Extracción de pDNA por lisis alcalina (maxipreps, Untergasser, 2006)

Se transformaron los plásmidos pPSU1 y pPSU2 en la cepa Top10 por el método de choque térmico. Se prepararon las soluciones en cantidad suficiente de acuerdo con el número de muestras. Además, se solicitaron con antelación los rotores JLA-8.1000, JA-14 y JA-20. Se hicieron precultivos inoculando con 5 colonias a 3 mL de caldo LB con Amp<sub>100</sub>. Los incubamos toda la noche a 37 °C. Inoculamos vaciando 2 mL de precultivo a 500 mL de caldo LB con 500 µL Amp<sub>100</sub>. Se hicieron alícuotas con glicerol, de la siguiente manera: se tomaron del precultivo 500 µL (con cepa transformada pPSU1 y 2) y vació en tubo eppendorf de 1.5 mL, se tomaron 500 µL de glicerol estéril al 50% y se almacenaron a -80 °C. Esto para cada plásmido. Centrifugamos por 5 min. a 4,000 rpm (4,000 G) en el rotor JLA-8.1000 y 4 °C. Se resuspendió el botón en 100 mL de buffer STE frío (ver tabla supl. No. 1).

**Tabla Supl. No. 1: Solución Salina-Tris-EDTA(STE)**

Reactivo	Concentración final (mM)
NaCl	100
Tris-HCl pH 8.0	10
EDTA pH 8.0	1

Se centrifugó la suspensión creada a 5,200 rpm (4,000 G) con el rotor JA-14, por 5 minutos a 4 °C. Se resuspendió la pastilla en 20 mL solución de lisis alcalina I (Ver tabla No. 4). Se añadieron 400 µL de lisozima a 50 mg/mL (1 mL de H<sub>2</sub>O miliQ y 50 mg de lisozima). Se mezcló con vórtex para homogeneizar. Se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 40 mL de solución de lisis alcalina II (ver tabla No. 5). Se homogeneizó con vórtex e incubó la suspensión por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 30 mL de solución de lisis alcalina III frío (ver tabla No. 6), se mezcló suavemente. Se incubó por 10 minutos en hielo y homogeneizó nuevamente con vórtex. Se centrifugó por 15 minutos a 6,000 rpm (5,500 G) con el rotor JA-14 a 4 °C. Recortamos 4 ó 6 cuadros de gasa de 10 x 10 cm y fueron puestos sobre la boca de un vaso de precipitados de 250 mL, esto con el fin de retener las partículas flotantes en el sobrenadante. Se añadieron 55 mL de isopropanol e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 20 minutos, 6,000 rpm (5,500 G) con el rotor JA-14 a 4 °C. Decantamos, cuidadosamente, el sobrenadante cuidando de no despegar la pastilla. Se transfirió la pastilla con 5 a 10 mL de etanol al 70%v/v en tubos de 15 ó 25 mL debemos, se descargó suavemente sobre las paredes del tubo para retirar todo el remanente. Centrifugamos por 20 minutos a 6,000 rpm (4,000 G) con el rotor JA-20 a 4 °C y decantamos el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla se disolvió en 2.5 mL de amortiguador TE (ver tabla supl. No. 2), se hizo manual (no vértex) y lentamente.

**Tabla Supl. No. 2: Amortiguador Tris-EDTA(TE)**

Reactivo	Concentración final (mM)
Tris-HCl pH 8.0	10
EDTA pH 8.0	1

Adicionamos 40 µL de solución de RNAsa A a 2 µg/µL (QIAGEN®), incubamos por 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionamos 1.5 mL fenol, 1.5 mL de cloroformo y 60 µL de alcohol isoamílico, mezclamos perfectamente por inversión. Centrifugamos por 5 minutos a 6,000 rpm (4,000 G) con el rotor JA-20 a 4 °C, y transferimos, cuidadosamente, la fase acuosa en un tubo limpio de 25 mL. Adicionamos 3 mL de cloroformo y 120 µL de alcohol isoamílico, mezclamos

perfectamente por inversión, centrifugamos por 5 minutos a 6,000 rpm (4,000 G) utilizando el rotor JA-20 y a 4 °C, y transferimos la fase superior en un tubo limpio de 25 mL. Se agregaron 3 mL de cloroformo y 120 µL de alcohol isoamílico, homogeneizamos completamente por inversión. Centrifugamos por 5 minutos a 6,000 rpm (4,000 G) con el rotor JA-20 y a 4 °C. transvasamos la fase superior en un tubo limpio de 25 mL. Adicionamos 300 µL de acetato de sodio (3 M y pH de 5.2) y 1.8 mL de isopropanol, mezclamos por inversión varias veces, incubamos durante 10 minutos a temperatura ambiente para inducir la precipitación. Centrifugamos por 20 minutos a 10,000 rpm (12, 000 G) con el rotor JA-20 a 4 °C, se removió el sobrenadante y se añadieron 15 mL de etanol al 70%v/v, mezclamos por inversión varias veces, centrifugamos por 10 minutos a 10,000 rpm (12, 000 G) con el rotor JA-20 a 4 °C, se removió el sobrenadante y añadieron 15 mL de etanol al 70% v/v, mezclamos por inversión varias veces. Centrifugamos por 10 minutos a 10,000 rpm (12, 000 G) con el rotor JA-20 a 4 °C, se removió el sobrenadante y se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm (12, 000 G) con el rotor JA-20 a 4 °C. Pipeteamos el líquido remanente, dejamos secar a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, añadimos de 300 a 500 µL de amortiguador TE o H<sub>2</sub>O miliQ estéril y filtrada.

### 10. 1. 2. Digestiones analíticas de pPSU1 y pPSU2

Se realizó de la siguiente forma: montamos las siguientes mezclas de reacción enzimática para ambos plásmidos. Controles (sin digerir):

**Tabla Supl. No. 3: Reacciones de digestión de los pPSU1 y 2 para controles.**

	NEBuffer 3.1 10x (µL)	pPSU1 1 µg/µL (µL)	pPSU2 1 µg/µL (µL)	EcoRV 20 U/µL (µL)	PstI 20 U/µL (µL)	Agua miliQ (µL)	Volumen Final (µL)
Mix 1	5	5				40	50
Mix 2	5		5			40	50
Mix 3	5	5	5			35	50

Después, en las digestiones analíticas se obtuvo una concentración final de aproximadamente 125 ng/µL:

**Tabla Supl. No. 4: Reacciones de digestión analítica de los plásmidos pPSU1 y 2.**

	NEBuffer 3.1 10x ( $\mu\text{L}$ )	pPSU1 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	pPSU2 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	EcoRV 20 U/ $\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	PstI 20 U/ $\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	Agua miliQ ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Final ( $\mu\text{L}$ )
Mix 4	5	5		0.5		39.5	50
Mix 5	5		5		1	39.0	50
Mix 6	5	5	5	0.5		34.5	50
Mix 7	5	5	5		1	34.0	50

Se incubó a 37 °C, durante 2 horas para digestión y posteriormente electroforamos en un gel de agarosa al 0.8% para comprobar la digestión. Después llevamos a cabo las digestiones preparativas (ver tabla supl. No. 5), dejamos ambos plásmidos a una concentración de 250 ng/ $\mu\text{L}$ . Incubamos a 37 °C toda la noche para la reacción enzimática, y al otro día electroforamos en un gel de agarosa al 0.8% tomando 0.5  $\mu\text{L}$  de cada producto final mezclamos con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga.

**Tabla Supl. No. 5: Proporciones para digestiones preparativas.**

	NEBuffer 3.1 10x ( $\mu\text{L}$ )	pPSU1 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	pPSU2 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	EcoRV 20 U/ $\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	PstI 20 U/ $\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )	Agua miliQ ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Final ( $\mu\text{L}$ )
Mix 1 (control)	20	0.5	0.5				10
Mix 2	5	50	50	1		79	200
Mix 3	5	50	50		5	75	200

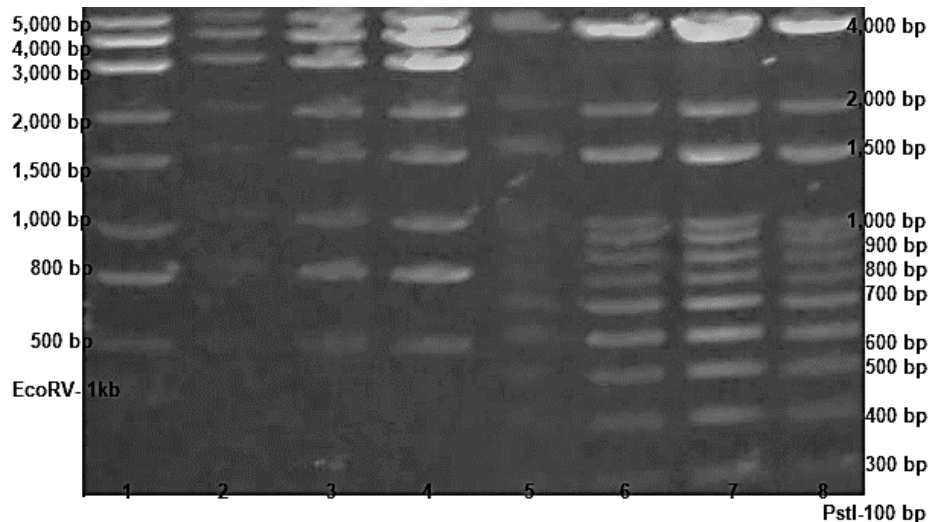
Realizamos las diluciones a partir de las digestiones preparativas de acuerdo con las siguientes proporciones, ver tabla supl. No. 6. Las concentraciones finales quedaron a 50 ng/ $\mu$ L de DNA digerido.

**Tabla Supl. No. 6: Volúmenes finales para obtener marcadores de 1kb y 100 bp.**

	Buffer TE (mL)	Digerido con EcoRV(mL)	Digerid con PstI (mL)	Buffer de carga 10X (mL)	Volumen Final (mL)
Marcador 1 kb	1.75	0.5		0.25	2.5
Marcador 100 bp	1.75		0.5	0.25	2.5

### 10. 1. 3. Estandarización de los Marcadores de PM 1kb(EcoRV) y 100 bp(PstI).

Se estandarizó el volumen ideal en que los marcadores tienen mejor visibilidad, electroforamos en geles de agarosa al 0.8% y con volúmenes crecientes de los marcadores de 1 kb y 100 bp. (ver figura supl. No. 2). Se determinó que el volumen ideal fue de 10  $\mu$ L para ambos plásmidos.



**Figura Supl. No. 2: Gel de agarosa al 0.8% p/v con diferentes volúmenes de las digestiones preparativas (125  $\mu$ g/ $\mu$ L).** Carril 1, Marcador de peso molecular 1 kb; Carriles 2-4, volúmenes 1, 5 y 10  $\mu$ L del digerido EcoRV; Carriles 5-7, volúmenes 1, 5, 10  $\mu$ L digerido PstI.

## 10. 2. Purificación de la proteasa TEV en columnas IMAC.

Se preparó un precultivo (40 mL) de la cepa SoluBL21 transformada con el plásmido productor de la enzima TEV. Después, se tomaron 10 mL del precultivo de la cepa SoluBL21 con el plásmido productor de proteasa TEV y fueron vaciados 500 mL de medio 2XYT suplementado con 500 µL Amp<sub>100</sub>, a los macrocultivos se les incubó a 37°C por 3 horas, como primera fase, y se les midió la DO<sub>600</sub> hasta que el alcanzar una absorbancia de 0.6-0.9. Una vez que estuvieron al rango de absorbancia, se les estimuló con 1 mL de IPTG a 1 M y 1 mL de MgSO<sub>4</sub>, aforamos a un 1 L de cultivo, con 500 mL de caldo 2XYT y 500 µL Amp<sub>100</sub>. Incubamos toda la noche a 37 °C. Se extrajo el botón celular por centrifugación a 4000 rpm por 25 min. a 4 °C, se conservó en congelación a -80°C. Se preparó la solución de lisis (ver tabla supl. No. 7) y añadió a las células a razón 12.5 mL/litro, hasta formar una suspensión.

**Tabla Supl. No. 7: Solución de lisis para cepa con TEV recombinante.**

Componente	Concentración final
Solución TGI 5X	1X
PMSF a 200mM	1 mM
Benzamidina a 1 M	2 mM
BME a 14 M	10 mM
Filtrar con membrana de PVDF de 0.22 µm	

Se añadió a la suspensión celular, la cantidad necesaria de NaCl para una concentración final de 250 mM y de sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a concentración final de 1 M, de acuerdo con la tabla de Wood, 1976. La suspensión de células se sonicó (en 10 ciclos con pulso de 5 y 35 segundos de reposo) y ultracentrifugó a 40,000 rpm, por 30 min a 4 °C, se filtró el sobrenadante con membrana de 0.22 µm. Se lavó el equipo y columnas, ver parte B de punto 5.13. Se utilizó la solución proveedora TGI 5X (Tris-HCl pH 7.5 1 00 mM, Glicerol al 50% e imidazol 100 mM) y preparamos amortiguador B-TEV (ver tabla supl. No.8) y equilibramos las columnas con un flujo de 3 mL/min a 100% de bomba B.

**Tabla Supl. No. 8: Solución amortiguadora B para proteasa recombinante TEV.**

Componente	Concentración final
Solución TGI 5X	1X
Imidazol 2 M	500 mM
NaCl a 5 M	250 mM
BME a 14 M	5 mM
Ajustar a pH 7.5 con HCl. Filtrar con membrana de PVDF de 0.22 µm	

Se eluyó el clarificado celular, a un flujo de 1 mL/min, colectamos la fracción saliente. Equilibramos con amortiguador A-TEV (ver tabla supl. No. 9), se programó el equipo a 0% de capacidad de bomba B. y un flujo de 3 mL/min.

**Tabla Supl. No. 9: Solución amortiguadora A para proteasa recombinante TEV**

Componente	Concentración final
Solución TGI 5X	1X
NaCl a 5 M	250 mM
BME a 14 M	10 mM
Filtrar con membrana de PVDF de 0.22 µm	

Eluímos con amortiguador B a un flujo de 3 mL/min y 100% de capacidad de bomba B, colectamos las fracciones, se observó el incremento paulatino de la absorbancia, no hacer en gradiente. Colectamos cada fracción de 6 mL o por un tiempo de 2 min a un flujo de 3 mL/min. Dializamos el imidazol con tubos Amicon®, con la técnica de centrifugación por cambio de amortiguador. Preparamos solución de diálisis (ver tabla supl. No. 10.).

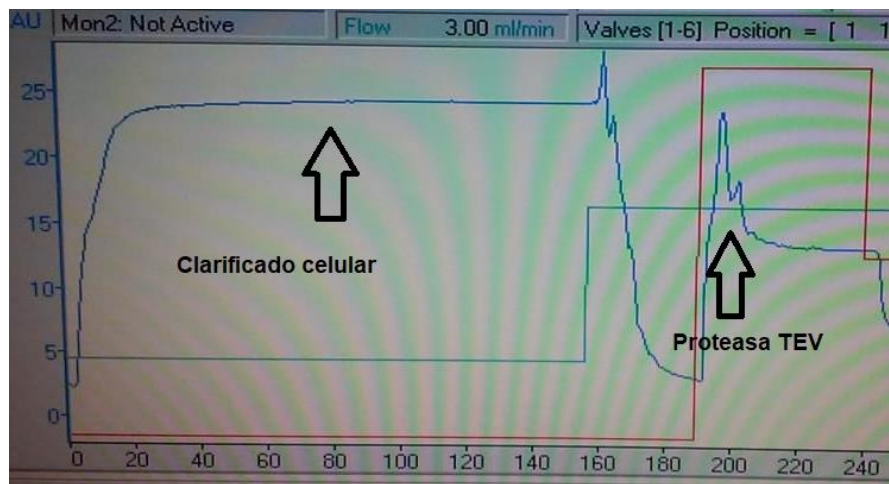
**Tabla Supl. No. 10: Solución de diálisis para proteasa recombinante TEV.**

Componente	Concentración final
Tris-HCl pH 7.5 1 M	20 mM
Glicerol anhidro	12.5%v/v
NaCl a 5 M	250 mM
BME a 14 M	5 mM
Filtrar con membrana de PVDF de 0.22 µm	

Examinamos con SDS-PAGE para descartar fracciones sin proteína, concentramos y cuantificamos, con el método de Bradford la proteína obtenida a 4 mg/mL. Separamos en alícuotas de 100 µL de la solución de enzima TEV en tubos eppendorf de 0.6 mL y almacenamos a -80 °C.

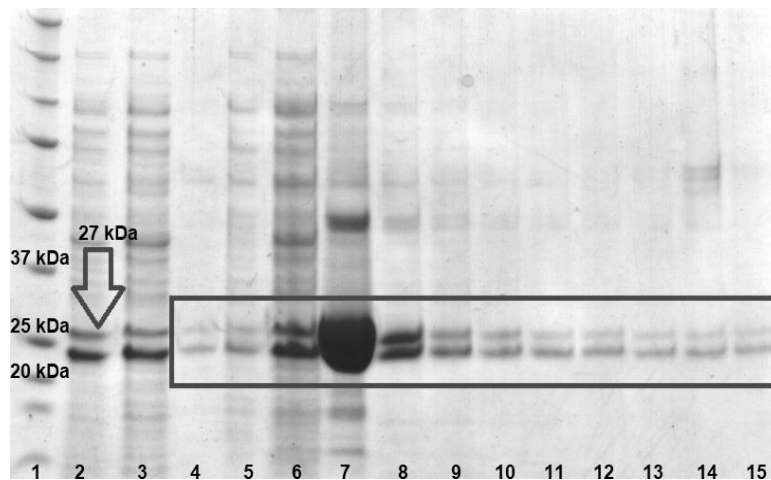


### 10. 2. 1. Cromatograma típico de la purificación de la enzima TEV.



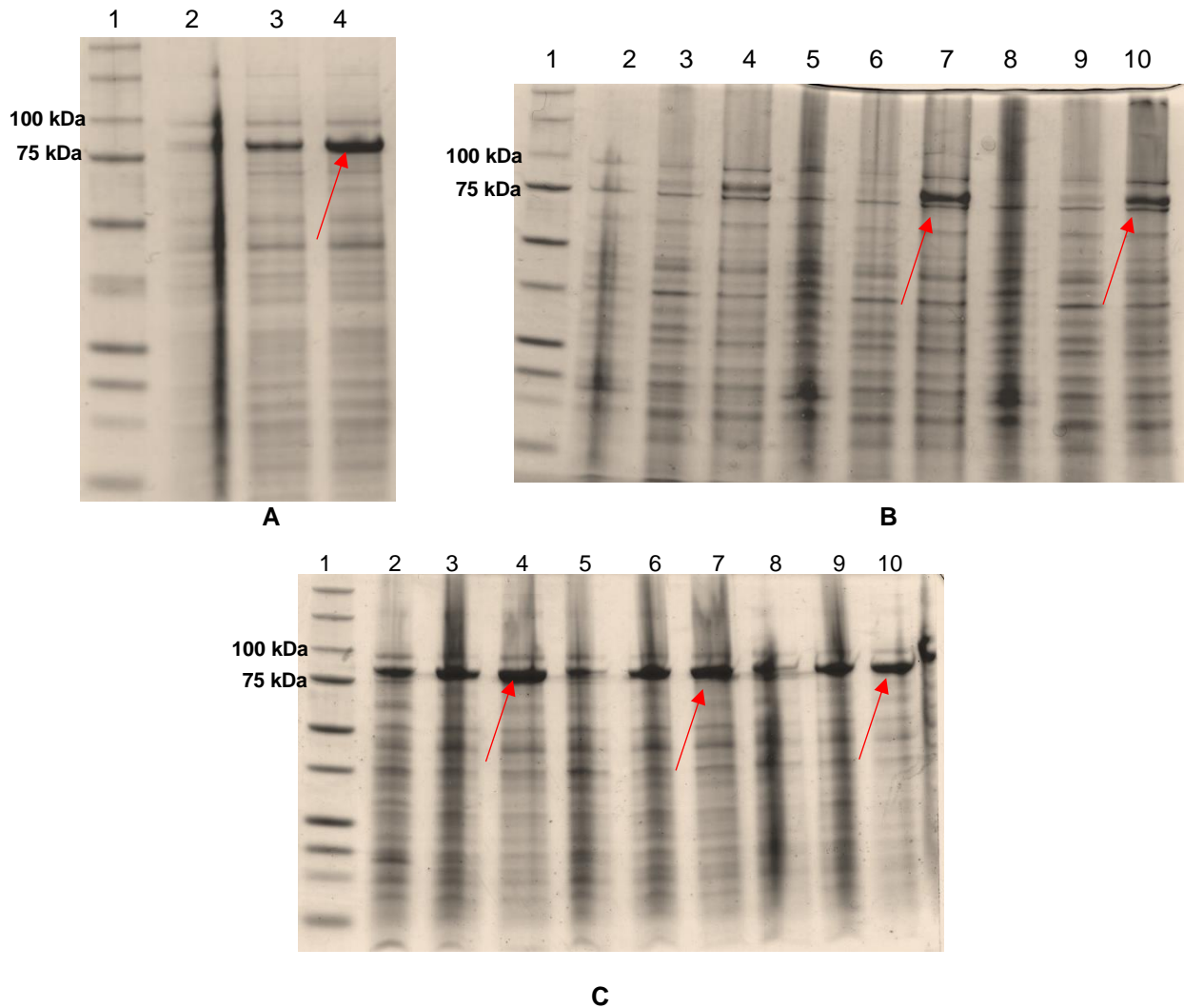
**Figura Supl. No. 3: Cromatograma de proteasa TEV.** Línea azul-, absorbancia 280 nm. Línea Roja, porcentaje Capacidad de la bomba B. Aguamarina-Flujo en ml/min. La enzima posee una bandera de histidinas.

### 10. 2. 2. SDS-PAGE característico de las fracciones eluidas de la proteasa TEV recombinante.

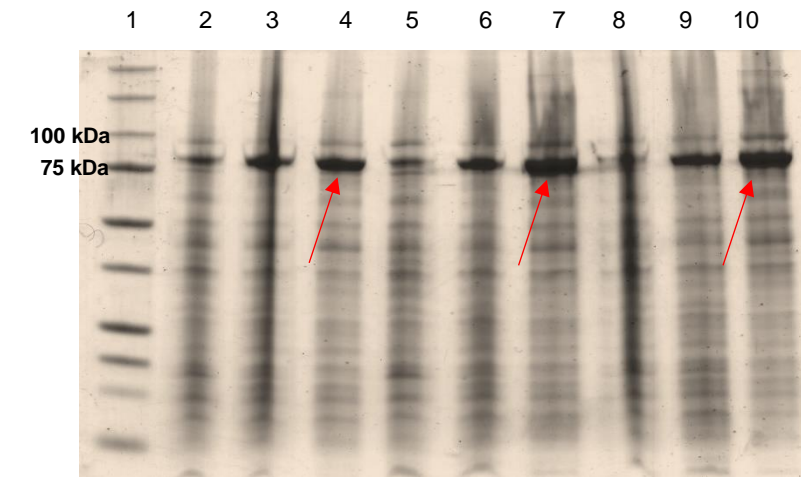


**Figura Supl. No. 4: Monitoreo de las fracciones colectadas por elución de TEV con un pulso de imidazol a 500 mM.** Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, clarificado celular; Carril 3, fracción diferencial; Carriles 4-15, Fracciones 1 a 15. El rectángulo en negro, son las fracciones seleccionadas. La flecha roja señala tanto el peso molecular como la banda.

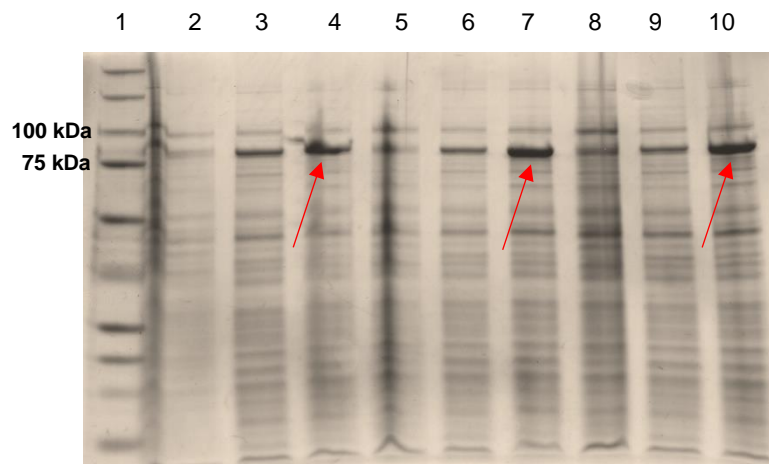
### 10. 3. PE de los productos de traducción, fragmentos truncados del segmento 1-561 aa del tallo de la HC.



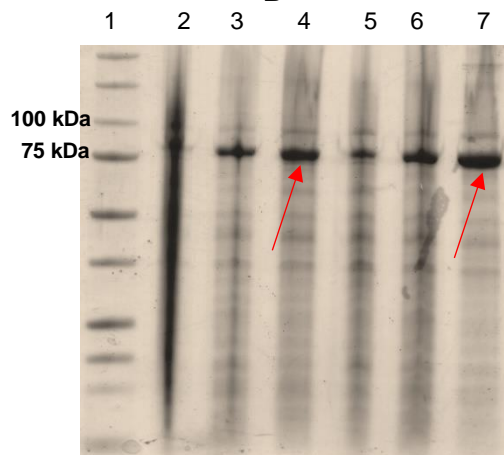
**Figura Supl. No. 5: Panel con PE de fragmentos recombinantes en SDS-PAGE al 8% en célula completa SoluBL21 del tallo de la HC, al extremo amino terminal. A) En los carriles 4, está localizado el fragmento 560 a 37°C con estímulo de 3 horas con IPTG 1 mM B) Carriles 4, 7 y 10 pertenecen a los fragmentos 560, 557 y 556 aa, a 37°C con estímulo de toda la noche con IPTG 1 mM C) En los carriles 4, 7 y 10, están localizados los fragmentos 559, 558 y 555 aa, a 37°C con estímulo toda la noche con IPTG 1 mM. La flecha roja señala la banda de cada proteína seleccionada. Ver tabla No. 19 para consultar pesos moleculares de cada fragmento.**



**A**

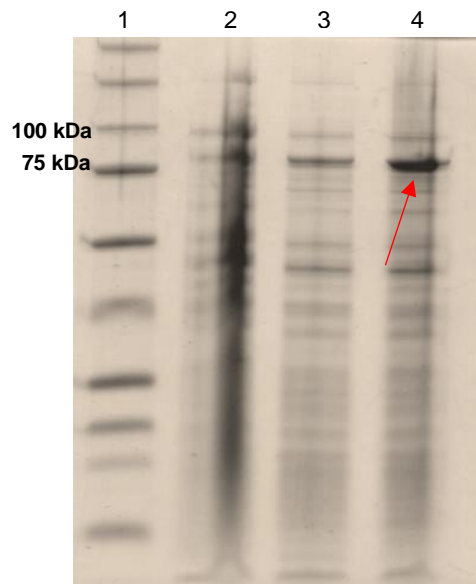


**B**



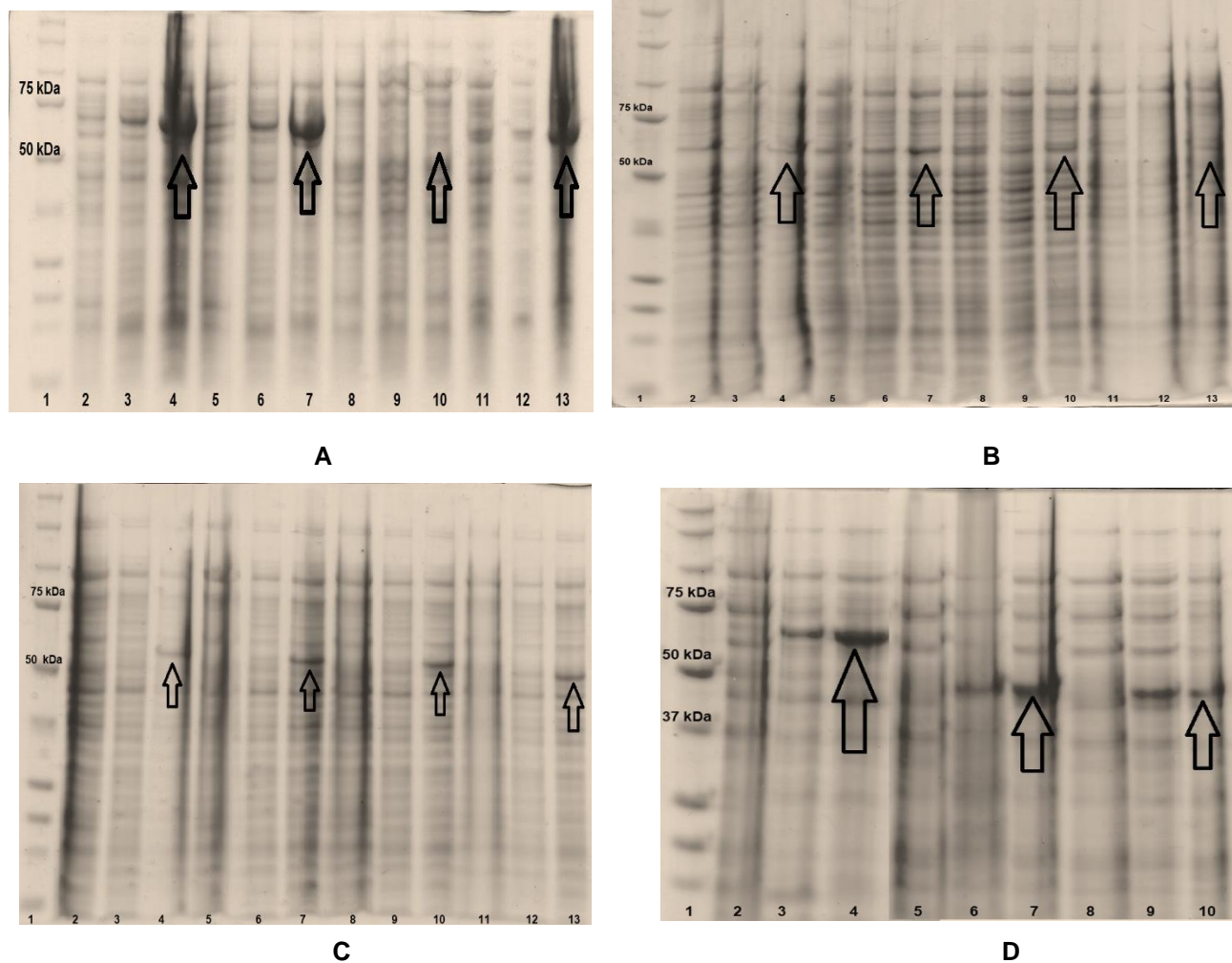
**C**

**Figura Supl. No. 6: Panel con PE de fragmentos recombinantes en SDS-PAGE al 8% en célula completa SoluBL21 del tallo de la HC, al extremo amino terminal. A) En los carriles 4, 7 y 10, están localizados los fragmentos 553, 551 y 549 aa, a 37°C con estímulo toda la noche con IPTG 1 mM. B) En los carriles 4, 7 y 10, están localizados los fragmentos 552, 550 y 554 aa, a 37°C a estímulo de 3 horas con IPTG 1 mM C) Carriles 4 y 7 pertenecen a los fragmentos 548 y 547 aa a 37°C a estímulo de toda la noche con IPTG 1 mM. La flecha roja señala la banda de cada proteína seleccionada. Ver tabla No. 19 para consultar pesos moleculares de cada fragmento.**

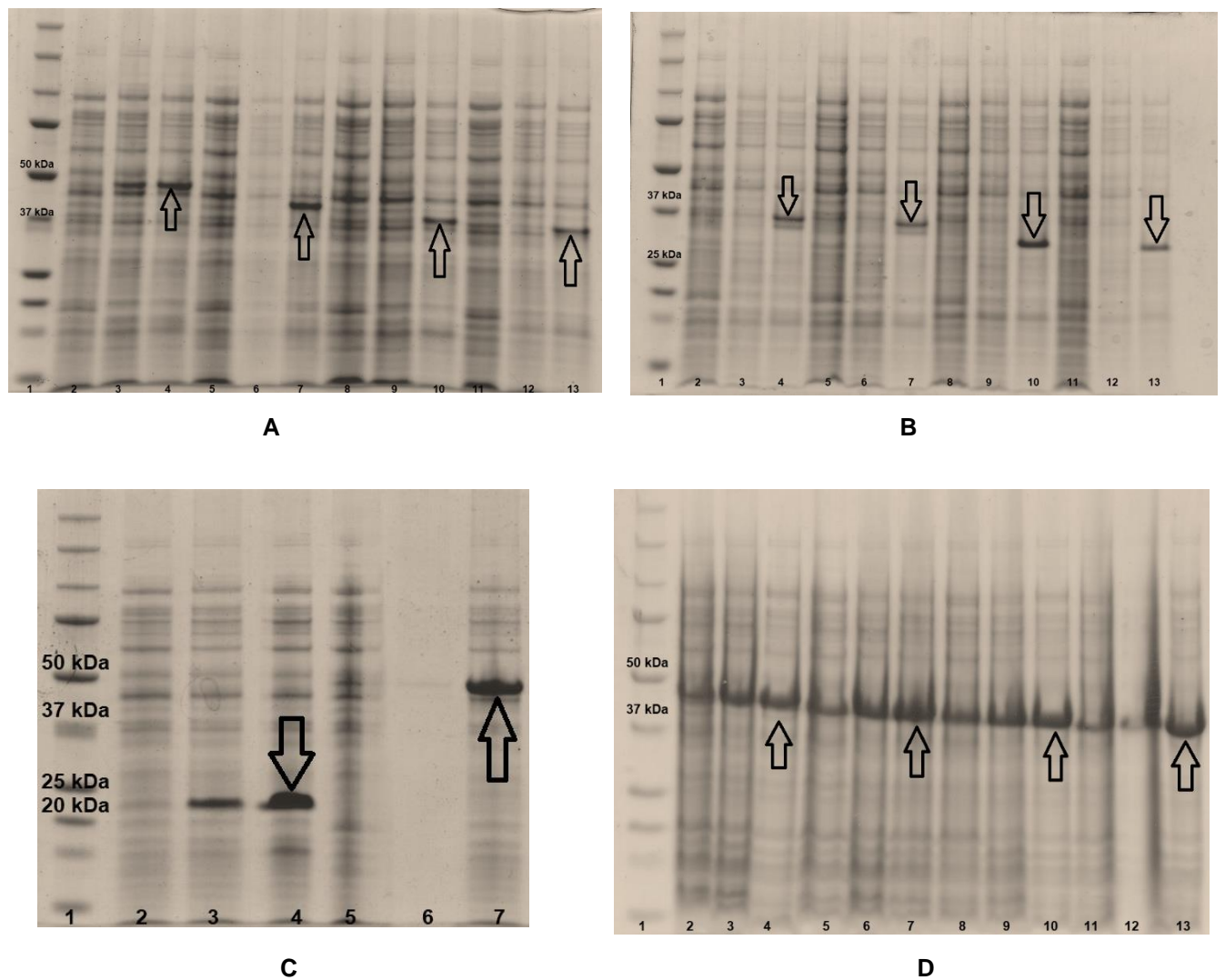


**Figura Supl. No. 7: PE de fragmento recombinante en SDS-PAGE al 8% en célula completa SoluBL21 del tallo de la HC, al extremo amino terminal. El carril 4, es el fragmento 546 aa, a 37°C a estímulo de 3 horas con IPTG 1 mM. La flecha roja señala la banda de proteína seleccionada. Ver tabla No. 19 para consultar pesos moleculares de cada fragmento.**

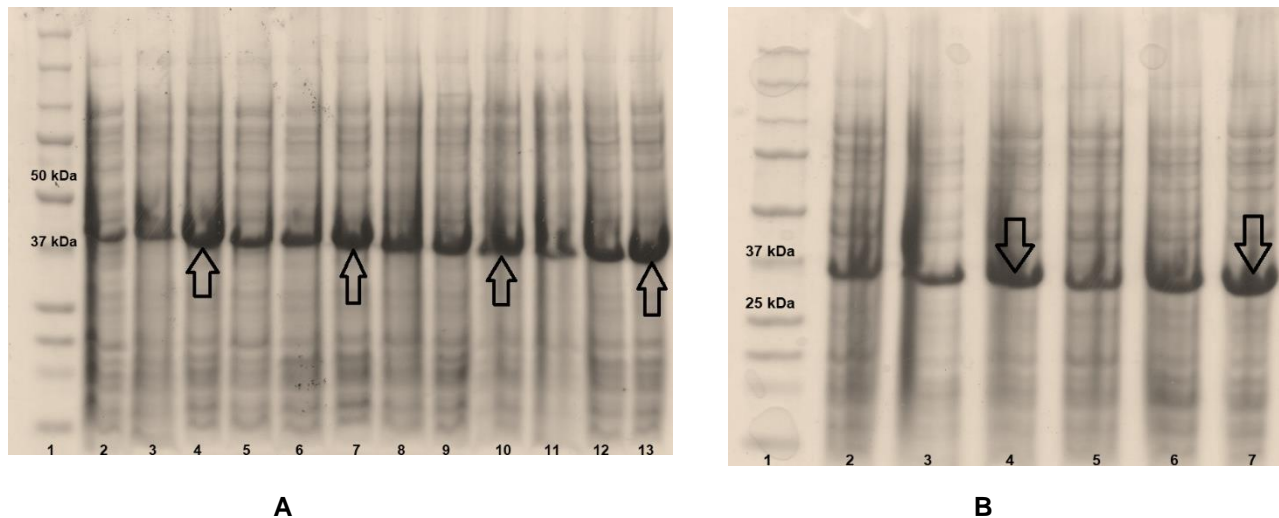
#### 10. 4. PE de los productos de traducción, fragmentos cercanos al linker de la HC del tallo de la dineína.



**Figura Supl. No. 8: Panel con PE de fragmentos recombinantes en SDS-PAGE al 8% en célula completa SoluBL21 del tallo de la HC, al extremo carboxilo terminal, zona cercana al linker.** A) En los carriles 4, 7 y 13, están localizados los fragmentos p1697, p1698 y p1700, el carril 10 es p1699 hubo que repetirse. B) Carriles 4, 7, 10 y 13, pertenecen a los fragmentos p1701, p1702, p1703 y p1704. C) Carriles 4, 7, 10 y 13, corresponde a los fragmentos p1705, p1706, p1707 y p1708. D) Carriles 4, 7, y 10, ubica a los fragmentos p1699, p1709 y p1710. Los carriles 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12 de todos los geles fueron puestos control y condición de TA toda la noche respectivamente de cada segmento de proteína. La flecha negra señala la banda de cada proteína seleccionada a estímulo toda la noche 37 °C. Ver tabla No. 20 para consultar tamaño del fragmento.



**Figura Supl. No. 9: Panel con PE de fragmentos recombinantes en SDS-PAGE al 8% en célula completa SoluBL21 del tallo de la HC, al extremo carboxilo terminal, zona cercana al linker.** A) En los carriles 4, 7 y 13, están localizados los fragmentos p1711, p1712, p1713 y p1714. B) Carriles 4, 7, 10 y 13, pertenecen a los fragmentos p1715, p1716, p1717 y p1718. C) Carriles 4 y 7, corresponde a los fragmentos p1720 y p1721. D) Carriles 3, 4, 7, y 10, ubica a los fragmentos p1722, p1723, p1724 y 1725. Los carriles 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12 de todos los geles fueron puestos control y condición de TA toda la noche respectivamente de cada segmento de proteína. La flecha negra señala la banda de cada proteína seleccionada (o manera de comparación con la condición elegida) a estímulo toda la noche 37 °C. Ver tabla No. 20 para consultar tamaño del fragmento.



**A** **B**

**Figura Supl. No. 10: Panel con PE de fragmentos recombinantes en SDS-PAGE al 8% en célula completa SoluBL21 del tallo de la HC, al extremo carboxilo terminal, zona cercana al linker.** A) En los carriles 4, 7 y 13, están localizados los fragmentos p1726, p1727, p1728 y p1729. B) Carriles 4, y 7, pertenecen a los fragmentos p1730 y p1731. Los carriles 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12 de todos los geles fueron puestos control y condición de TA toda noche respectivamente de cada segmento de proteína. La flecha negra señala la banda de cada proteína seleccionada a estímulo toda la noche 37 °C. Ver tabla No. 20 para consultar tamaño del fragmento.

## 10. 5. Optimización de los fragmentos de tallo amino terminal.

### Caja #6 para optimización de cristales del fragmento 1-561 aa

PEG 11-14.78%

Divalentes  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  1-20 mM

0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.42 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.84 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.26 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.68 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.10 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.52 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.94 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.36 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.78 % PEG 4K 0.0010 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.42 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.84 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.26 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.68 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.10 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.52 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.94 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.36 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.78 % PEG 4K 0.0048 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.42 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.84 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.26 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.68 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.10 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.52 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.94 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.36 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.78 % PEG 4K 0.0086 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.42 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.84 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.26 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.68 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.10 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.52 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.94 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.36 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.78 % PEG 4K 0.0124 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.42 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.84 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.26 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.68 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.10 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.52 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.94 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.36 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.78 % PEG 4K 0.0162 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.42 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.84 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.26 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.68 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.10 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.52 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.94 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.36 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.78 % PEG 4K 0.0200 M Divalentes Ca/Mg

**Figura Supl. No. 11: Parámetros de optimización para el fragmento 561 aa.** En la parte superior, mostramos el rango de PEG en forma creciente. En el lado izquierdo, se describe el rango de iones divalente de manera creciente. El cuadro en rojo es la condición donde se obtuvieron los cristales óptimos y posteriormente optimizados por gota colgante.



# Caja #12 de optimización de cristales del fragmento 1-560 aa

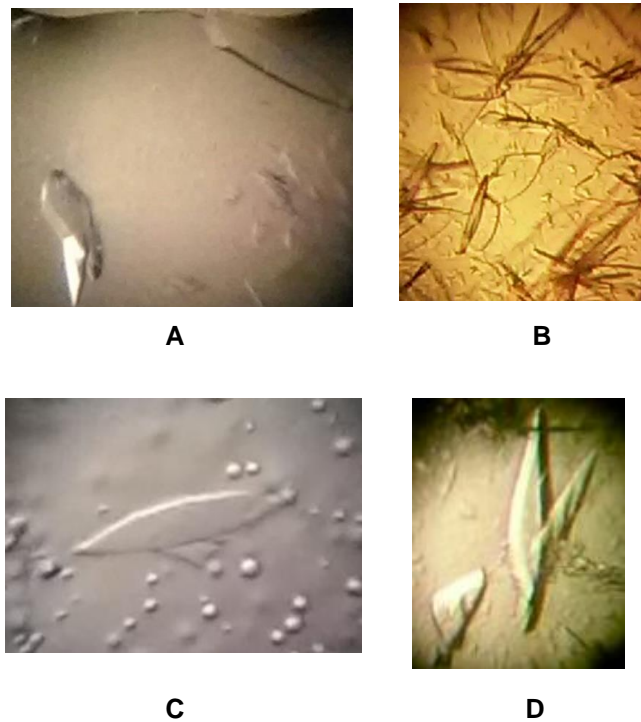
PEG 11-14.96%

Divalentes  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  10-50 mM

0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.44 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.88 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.32 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.76 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.20 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.64 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.08 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.52 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.96 % PEG 4K 0.010 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.44 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.88 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.32 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.76 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.20 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.64 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.08 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.52 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.96 % PEG 4K 0.018 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.44 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.88 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.32 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.76 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.20 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.64 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.08 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.52 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.96 % PEG 4K 0.026 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.44 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.88 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.32 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.76 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.20 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.64 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.08 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.52 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.96 % PEG 4K 0.034 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.44 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.88 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.32 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.76 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.20 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.64 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.08 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.52 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.96 % PEG 4K 0.042 M Divalentes Ca/Mg
0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.00 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.44 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 11.88 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.32 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 12.76 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.20 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 13.64 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.08 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.52 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg	0.1 M HEPES pH 7.4 20 % Glicerol 14.96 % PEG 4K 0.050 M Divalentes Ca/Mg

**Figura Supl. No. 12: Parámetros de optimización para el fragmento 560 aa.** En la parte superior, mostramos el rango de PEG en forma creciente. En el lado izquierdo, se describe el rango de iones divalente de manera creciente. El cuadro en rojo es la condición donde se obtuvieron los cristales óptimos y posteriormente optimizados por gota colgante.

**Productos de la inducción de cristales por microbatch y gota colgante de los fragmentos 561 y 560 aa.**



**Figura Supl. No. 13: Panel de los optimizaciones por microbatch y gota colgante de los fragmentos 561 y 560 aa.** A) Cristal inducido por el método de microbatch del fragmento 561 aa y B) Llevado a un segundo nivel de optimización (1:0.5 en proporción por volumen de proteína y LM). C) Cristal inducido por el método de microbatch del fragmento 560 aa y D) Llevado a un segundo nivel de optimización (1:0.8 en proporción por volumen de proteína y LM). La concentración inicial en ambos fue de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . El aumento es en 80X. Los recuadros enmarcados en rojo de las figuras suplementarias 10 y 11, corresponden a las concentraciones finales de cada componente.

## 11. LITERATURA CITADA

1. Addison, C. J., Chu, S. H., & Reusch, R. N. (2004). Polyhydroxybutyrate-enhanced transformation of log-phase *Escherichia coli*. *BioTechniques*, 37, 376-382.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Wilson, J. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (Sixth ed.). New York, USA: Garland Science.
3. Allan, V. J. (2011). Cytoplasmic dynein. *Biochemical Society Transactions*, 39, 1169-1178.
4. Ausbel, F. M., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, USA: John Wiley & Sons Inc.
5. Baynes, J. W., & Dominiczak, M. H. (2011). *Bioquímica Médica* (Tercera ed.). Barcelona, España: Elsevier.
6. Belyy, V., Schlager, M. A., Foster, H., Reimer, A. E., Carter, A. P., & Yildiz, A. (2016). The mammalian dynein-dynactin complex is a strong opponent to kinesin in a tug-of-war competition. *Nature Cell Biology*, 18(9), 1018-1024.
7. Berfords, T. M. (2009). *Protein crystallization* (Second ed.). La Jolla, California, USA: IUL biotechnologies series.
8. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2015). *Biochemistry* (Vol. 8th). New York, USA: W. H. Freeman & Company.
9. Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7(6), 1513-1523.
10. Boistelle, R., & Astier, J. P. (1988). Crystallization mechanisms in solution. *Journal of Crystal Growth*, 90(1-3), 14-30.
11. Broide, M. L., Tominc, T. M., & Saxowsky, M. D. (1996). Using phase transitions to investigate the effect of salts on protein interactions. *Physical Review E*, 53(6), 6325-6335.
12. Carlsson, A. E. (2010). Actin dynamics: from nanoscale to microscale. *The annual Reviews of Biophysics*, 9, 91-110.
13. Carter, A. P., Diamant, A. G., & Urnavicius, L. (2016). How dynein and dynactin transport cargos: a structural perspective. *Current Opinion in Structural Biology*, 37, 62-70.
14. Chayen, N. E. (1997). A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. *Applied Crystallography*, 30, 198-202.

15. Chowdhury, S., Ketcham, S. A., Schroer, T. A., & Lander, G. C. (2015). Structural organization of the dynein-dynactin complex bound to microtubules. *Nature Structural Molecular Biology*, 22(4), 345-347.
16. Cleveland, D. W., & Fuchs, E. (1998). A Structural Scaffolding of. *Science*, 279, 514-519.
17. CSIC. (10 de July de 2018). <http://www.csic.es/>. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Consultado el 30 de Agosto de 2018, de <http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/index-en.html>.
18. D'Arcy, A., Sweeney, A. M., & Haber, A. (2004). Practical aspects of using the microbatch method in screening conditions for protein crystallization. *Methods*, 34(3), 323-328.
19. Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *The Annual Review of Biophysics*, 40, 169-186.
20. Drenth, J. (1999). *Principles of protein crystallography* (First ed.). New York, USA: Springer.
21. Drubin, D., & Hirokawa, N. (1998). Cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 13-15.
22. Durbin, S. D., & Feher, G. (1996). Protein crystallization. *Annual Review Physical Chemistry*, 47, 171-204.
23. EBI. (9 de Enero de 2017). *European Bioinformatics Institute*. Consultado el 12 de Agosto de 2018, de MEROPS: The peptisase database: <https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>
24. Fletcher, D. A., & Mullins, D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463, 485-492.
25. Fletcher, D. A., & Theriot, J. A. (2004). An introduction to cell motility for the physical scientist. *Physical Biology*, 1, T1-T10.
26. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gatitker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. En W. J. M., *The Proteomics Protocols Handbook* (págs. 571-607). New Jersey, Totowa, USA: Humana Press Inc.
27. Gill, S. R., Schroer, T. A., Szilak, I., Steuer, E. R., Sheetz, M. P., & Cleveland, D. w. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of

- vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *Journal Cell Biology*, 115(6), 1639-1650.
28. Glick, B. R., & Pasternak, J. J. (2010). *Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA* (Fourth ed.). Canada: ASM Press.
29. GSL-Biotech. (2018). SnapGen Viewer. (Versión 4.2.3). USA.
30. Hammond, C. (2009). *the basics of crystallography and diffraction* (Third ed.). New York: Oxford University.
31. Hampton Research. (10 de January de 2017). Microbatch crystallization. *Protein crystallization*. Aliso Viejo, California, USA: Hampton Research Corporation.
32. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
33. Healthcare. (2014). Life Sciences. *Affinity Chromatography: Tagged Proteins, 2*. UK.
34. Healthcare, GE. (2014). Life sciences. *Size exclusion chromatography: Principles and methods*. UK.
35. Hemmat, M., Castle, B. T., & Odde, D. J. (2018). Microtubule dynamics: moving toward a multi-scale approach. *Current Opinion in Cell Biology*, 50, 8-13.
36. Henrici, R. C., Pecen, T. J., Johnston, J. L., & Tan, S. (2017). The pPSU Plasmids for Generating DNA Molecular Weight Markers. *Scientific Reports*, 7(2438), 1-9.
37. Hickman, A. B., & Davies, D. R. (1997). Principles of macromolecular X-ray crystallography. *Current Protocols in the protein Science*, 10, 17.3.1-17.3.15.
38. Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(10), 682-696.
39. Hoang, H. T., Schlager, M. A., Carter, A. P., & Bullock, S. L. (2017). DYNC1H1 mutations associated with neurological diseases compromise processivity of dynein–dynactin–cargo adaptor complexes. *PNAS*, E1597-E1606.
40. Hodge, T., & Coper, J. T. (2000). A myosin family tree. *Journal of Cell Science*, 19, 3353-3354.
41. Hook, B., & Truman, A. (Noviembre de 2013). *A TEV Protease Compatible with Inhibitory Compounds from Protein Purification*. Consultado el 12 de Agosto de 2018, de Promega Corporation: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/a-tev-protease-compatible-with-inhibitory-compounds-from-protein-purification/?activeTab=0>

42. Höök, P., & Vallee, R. B. (2006). The dynein family at a glance. *Journal of Cell Science*, 119, 4369-4371.
43. Howard, J. (1997). Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature*, 389(6651), 561-567.
44. Invitrogen. (18 de Junio de 2010). pRSET A, B, and C for high-level expression of recombinant proteins in E. coli. *Users Manual*. Carlsbad, California, USA.
45. Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(4), 222-234.
46. Ishikawa, T. (2012). Structural biology of cytoplasmic and axonemal dyneins. *Journal of structural biology*, 179(2), 229-234.
47. Jeppesen, G. M., & Heinrich-Hoerber, J. K. (2012). The mechanical properties of kinesin-1: A holistic approach. *Biochemical Society Transactions*, 40(2), 438-443.
48. Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 194-204.
49. Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Shima, T., Sutoh, K., & Kurisi, G. (2012). The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature*, 484(7394), 345-350.
50. Léoinoux-Chambaud, C., & Eyer, J. (2013). Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations. *Histochemical Cell Biology*, 140, 13-22.
51. Llinas, P., Pylypenko, O., Isabet, T., Mukherjea, M., Sweeney, H. L., & Houdusse, A. M. (2012). How myosin motors power cellular functions : an exciting journey from structure to function. *FEBS Journal*, 279(4), 551-562.
52. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Martin, K. C. (2016). *Molecular Cell Biology* (Eighth ed.). New York, USA: W. H. Freeman Macmillan Learning.
53. McPherson, A. (2003). *Introduction to macromolecular crystallography* (First ed.). Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc.
54. McPherson, A. (2009). *Introduction to macromolecular crystallography* (Segunda ed.). Hoboken, New Jersey, USA: Wiley-Blackwell.
55. McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 70(Pt 1), 2-20.
56. Moss, G. P. (28 de Junio de 2018). *School of Biological and Chemical Sciences*. (M. G. P., Editor, Q. M. London, Productor, & Nomenclature Committee of the International Union

- of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Consultado el 12 de Agosto de 2018, de Enzyme Nomenclature: <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
57. Nunn, C. M., Jeeves, M., Cliff, M. J., Urquhart, G. T., Chao, L. H., Tsuchia, Y., & Djordjevic, S. (2005). Crystal Structure of Tobacco Etch Virus Protease Shows the protein C Terminus Bound within the Active Site. *Journal Molecular Biology*, 350(1), 145-155.
58. Open Stax-Rice University. (15 de July de 2016). *Chemistry*. Consultado el 2 de Agosto de 2018, de Atom First: <https://openstax.org/details/books/chemistry-atoms-first>
59. Promega. (2010). Genetics markers in E. coli EndA+ versus EndA- Strains . *Technical reference*.
60. Reck-Peterson, S., Redwine, W. B., Vale, R. D., & Carter, A. P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 382-398.
61. Rhodes, G. (2006). *Crystallography Made Crystal Clear* (Third ed.). Burlington, USA: Elsevier Inc.
62. RIGAKU Corporation. (2018). *RIGAKU Leading with Innovation*. Consultado el 12 de Agosto de 2018, de RIGAKU Structural Biology: <https://www.rigaku.com/en>
63. Ross, J. L., Ali, M. Y., & Warshaw, D. M. (2008). Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 20, 41-47.
64. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Third ed., Vol. 1). New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
65. Schlager, M. A., Hoang, H. T., Urnavicius, L., Bullock, S. L., & Carter, A. P. (2014). In vitro reconstitution of highly processive recombinant human dynein complex. *The EMBO Journal*, 33(17), 1855-1868.
66. Schlager, M. A., Marques-Serra, A., Grigoriev, I., Gumy, L. F., Esteves Da Silva, M., Wulf, P. S., . . . Hoogenraad, C. C. (2014). Bicaudal D Family Adaptor Proteins Control the Velocity of Dynein-Based Movements. *Cell Reports*, 8(15), 1248-1256.
67. Schliwa, M., & Woehlke, G. (2003). Molecular Motors. *Nature*, 422(6933), 759-765.
68. Schmidt, H., Gleave, E. S., & Carter, A. P. (2012). Insights into dynein motor domain function from 3.3-A crystal structure. *Nature Structural Molecular Biology*, 19(5), 492-497.
69. Schindt, H., Zalyte, R., Urnavicius, L., & Carter, A. P. (2015). Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke. *Nature*, 518(7539), 435-438.

70. Schroeder, C. M., & Vale, R. D. (2016). Assembly and activation of dynein–dynactin by the cargo adaptor protein Hook3. *Journal Cell Biology*, *214*(3), 309-318.
71. Schroeder, C. M., Ostrem, J. M., Hertz, N. T., & Vale, R. D. (2016). A Ras-like domain in the light intermediate chain bridges the dynein motor to cargo-binding region. *eLife*, *1*(3), 1-22.
72. Schroer, T. A. (2004). Dynactin. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, *20*, 759-779.
73. Schroer, T. A., & Sheetz, M. P. (1991). Two activators of microtubule-based vesicle transport. *Journal of Cell Biology*, *115*(5), 1309-1318.
74. Taylor, H. C., & Holwill, M. E. (1999). Axonemal dynein- a natural molecular motor. *IOPscience*, *10*(3), 237-243.
75. Trokter, M., Mücke, N., & Surrey, T. (2012). Reconstitution of the human cytoplasmic dynein complex. *PNAS*, *109*(51), 20895-20900.
76. Trybus, K. M. (2008). Myosin V from to tail. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(9), 1378-1389.
77. Untergasser, A. (2006). "Maxiprep-Alkaline Lysis" Untergasser's Lab. Obtenido de [http://www.untergasser.de/lab/protocols/maxiprep\\_alkaline\\_lysis\\_v1\\_0.htm](http://www.untergasser.de/lab/protocols/maxiprep_alkaline_lysis_v1_0.htm)
78. Urnavicius, L., Lau, C. K., Elshenawy, M. M., Morales-Rios, E., Motz, C., Yildiz, A., & Carter, A. P. (2018). Cryo-EM shows how dynactin recruits two dyneins for faster movement. *Nature*, *554*(7691), 202-206.
79. Urnavicius, L., Zhang, K., Diamant, A. G., Motz, C., Schlager, M. A., Yu, M., Carter, A. P. (2015). The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science*, *347*(6229), 1441-1446.
80. Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, *112*(4), 467-480.
81. Van Driessche, A. E., Van Gerven, N., Bomans, P. H., Joosten, R. R., Friederich, H., Gil-Carton, D., Sleutel, M. (2018). Molecular nucleation mechanisms and control strategies for crystal polymorph selection. *Nature*, *556*(7699), 89-84.
82. Vee-Aune, T. E., & Aachamann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be increase be transformed. *Applied Microbiology Biotechnology*, *85*(5), 1301-1313.
83. Wood, W. I. (1976). Tables for the preparation of ammonium sulfate solutions. *Analytical Biochemistry*, *73*(1), 250-257.



84. Zhang, K., E., F. H., Rondelet, A., Lacey, S. E., Bahi-Buisson, N., Bird, A. W., & Carter, A. P. (2017). Cryo-EM Reveals How Human Cytoplasmic Dynein Is Auto-inhibited and Activated. *Cell*, 169(7), 1303-1314.