



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Evaluación de la actividad antioxidante de la proteína de  
supresión de daño (Dsup) del tardígrado *Ramazzottius  
varieornatus*.”**

**T E S I S**

Que presenta

**L.F. Mariel Alexis Quiven Feria**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

Directora de Tesis:

**Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz**

Ciudad de México

Agosto, 2024



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 16 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y con el financiamiento del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (No. de apoyo: 1227851)

Asesores:

**Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe**

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico

Nacional

**Dra. Ana Laura Torres Huerta**

Profesora - Investigadora

Escuela de Ingeniería y Ciencias

Tecnológico de Monterrey

### Dedicatoria:

Para mi madre, mi heroína, mi mejor amiga y mi fuente de inspiración, dedico esta tesis con profundo amor y aprecio. Tu fortaleza y perseverancia han sido un ejemplo inquebrantable de lo que significa luchar por nuestros sueños. Tu ayuda fue fundamental para mi desarrollo profesional y personal.

## Agradecimientos:

A mi directora de Tesis la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, expreso mi más sincera gratitud por su dedicación e inestimable guía que ha sido fundamentales en la dirección y enriquecimiento de esta investigación, así como mi desarrollo profesional.

Al Dr. Luis Yoshio Kameyama kawabe y a la Dra. Ana Laura Torres Huerta por el asesoramiento y sugerencias a este proyecto.

A la Dra. María Luisa Bazán Tejeda muchas gracias por su dedicación, cariño, ayuda e inestimable guía a lo largo de este proceso.

A Israel Vásquez, por sus recomendaciones, apoyo técnico y consejos.

A Gabriela Mora, por su eficiente trabajo como parte del área administrativa del departamento de Genética y Biología Molecular.

A mi hermano Aarón por ser mi fuente de inspiración para siempre querer esforzarme y dar lo mejor de mí.

A mi maravillosa familia, en especial a mis tíos Lilia y Miguel por su apoyo incondicional durante toda mi formación profesional y personal. Sin su amor, apoyo y cariño este logro no habría sido posible.

A mis amigos del laboratorio 16, Sofia, Sergio, Laura, Luis, Leonardo, Fabiola, Diego y Sara que me brindaron su tiempo, su paciencia y su sabiduría. Los quiero mucho y siempre los llevaré en mi corazón.

A Raúl quien ha sido mi mayor apoyo y compañero durante este proceso.

A mis amigos del Cinvestav; Angelica, Hiram, Fernando, Mario y Bruno por sus consejos, apoyo y compañía a lo largo de este proceso.

Por último, quiero expresar mi gratitud a todas las personas que, de una u otra manera, han contribuido a mi formación académica y personal.

## Resumen:

Los tardígrados son una especie extremófila capaz de soportar diversos ambientes extremos. Uno de los descubrimientos más importantes de estos microorganismos es la proteína de supresión de daños (Dsup) de *Ramazzottius varieornatus*. Esta proteína ha sido estudiada en células HEK293 donde el daño al ADN causado por la radiación gamma se redujo donde se expresaba *RvDsup* con respecto al control. En las células de *E. coli* que expresan *RvDsup*, la viabilidad ante la radiación ionizante se vio menos afectada en comparación con el plásmido control. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual esta proteína puede conferir esta protección a las bacterias. Se ha demostrado que el *RvDsup* se une al ADN nucleosomal, por lo que puede actuar como una barrera física y protegerlo del daño causado por la radiación. Para conocer más sobre el mecanismo por el cual esta proteína puede promover la viabilidad bacteriana, buscamos motivos conservados en la secuencia de aminoácidos de *RvDsup*, se realizó una predicción de la estructura terciaria e identificamos un sitio de unión nucleosomal HMNG y varias regiones desordenadas. Para los experimentos in vivo, para medir la viabilidad bacteriana tanto en bacterias que expresan *RvDsup*, como el control fueron sometidos a un ambiente oxidativo que se llevó a cabo mediante la cuantificación de colonias y una curva de crecimiento utilizando la densidad óptica del cultivo. Estos resultados revelaron que las bacterias que expresan la proteína *RvDsup* fueron capaces de hacer frente mejor a las condiciones de estrés oxidativo en comparación con las células control transformadas con el plásmido control. Por lo cual se determinaron los niveles de proteínas carboniladas. Las bacterias que expresaban *RvDsup* tenían una menor cantidad de proteínas carboniladas en comparación con el control después de 4 horas de inducción del daño. Además, de la actividad protectora que funciona como agente antioxidante, se probó su capacidad para unirse con ADN cadena doble y sencilla. Se purificó la proteína recombinante *RvDsup* para realizar un ensayo de cambio de movilidad electroforética utilizando una sonda fluorescente de cadena sencilla y doble de 22 nt o pb, *RvDsup* se une no solo al ADN bicatenario, sino también a la cadena sencilla. Nuestros resultados demuestran que la proteína *RvDsup* tiene una actividad antioxidante y una actividad de unión al ADN, protegiendo así directamente

del daño, así como las proteínas y posiblemente las demás moléculas que se oxidan para ayudar a las bacterias a sobrevivir en condiciones oxidativas.

## Abstract:

Tardigrades are an extremophile species capable of withstanding various extreme environments. One of the most important discoveries of these microorganisms is the damage suppression protein (Dsup) of *Ramazzottius varieornatus*. This protein has been studied in HEK293 cells where DNA damage caused by gamma radiation was reduced where *RvDsup* was expressed with respect to control. In *E. coli* cells expressing *RvDsup*, viability to ionizing radiation was less affected compared to the control plasmid. However, the mechanism by which this protein can confer this protection on bacteria is unknown. *RvDsup* has been shown to bind to nucleosomal DNA, so it can act as a physical barrier and protect it from radiation damage. To learn more about the mechanism by which this protein can promote bacterial viability, we looked for conserved motifs in the amino acid sequence of *RvDsup*, made a prediction of the tertiary structure, and identified a nucleosomal HMNG binding site and several disordered regions. For the in vivo experiments, to measure bacterial viability in both *RvDsup*-expressing bacteria and the control were subjected to an oxidative environment that was carried out by quantifying colonies and a growth curve using the optical density of the culture. These results revealed that bacteria expressing the *RvDsup* protein were able to cope better with oxidative stress conditions compared to control cells transformed with the control plasmid. Therefore, the levels of carbonylated proteins were determined. Bacteria expressing *RvDsup* had a lower amount of carbonylated proteins compared to the control after 4 hours of damage induction. In addition to the protective activity that functions as an antioxidant agent, its ability to bind with double and single stranded DNA was tested. The recombinant protein *RvDsup* was purified to perform an electrophoretic mobility change assay using a 22 nt or bp single-stranded and double-stranded fluorescent probe, *RvDsup* binds not only to double-stranded DNA, but also to single-stranded. Our results demonstrate that the *RvDsup* protein has antioxidant activity and DNA-binding activity, thus directly protecting from damage, as well as proteins and possibly other molecules that are oxidized to help bacteria survive in oxidative conditions.

# Índice

<b>1. Introducción:</b> .....	<b>10</b>
1.1 Daños ocasionados al DNA.....	10
1.2 Daños ocasionados por la radiación ionizante y los ROS (Radicales libres de oxígeno) ....	10
1.3 Vías de Reparación del DNA.....	11
1.4 Reparación por Recombinación Homologa.....	13
1.5 Reparación de extremos no homólogos .....	14
1.6 Tardígrados.....	16
1.7 Proteínas Intrínsecamente desordenadas de los Tardígrados. ....	18
<b>2. Antecedentes directos:</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Justificación:</b> .....	<b>24</b>
<b>4. Hipótesis:</b> .....	<b>24</b>
<b>5. Objetivos:</b> .....	<b>24</b>
5.1. Objetivo General: .....	24
5.2. Objetivos Específicos:.....	24
<b>6. Estrategia Experimental</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Metodología</b> .....	<b>25</b>
7.1 Material Biológico .....	25
7.1.1 Cepas Bacterianas .....	25
7.1.2 Construcciones.....	26
7.2 Preparación y transformación de células competentes.....	26
7.2.1 Células quimio competentes.....	26
7.2.2 Extracción de DNA.....	27
7.2.3 Transformación de células quimio competentes .....	28
7.3 Verificación de la Secuencia <i>RvDsup</i> de <i>R. varieornatus</i> .....	28
7.3.1 Verificación de la secuencia codificante de la proteína <i>RvDsup</i> mediante patrón de restricción.....	28
7.3.2 Verificación de la expresión de la proteína <i>RvDsup</i> (SDS-PAGE y Western Blot) .....	28
7.4 Construcción del Plásmido pET21b (plásmido control) .....	29
7.4.1 Liberación del fragmento <i>Dsup</i> del plásmido pET21b-His6- <i>Dsup</i> -FLAG .....	29
7.4.2 Purificación de los Fragmentos .....	29
7.4.3 Ligación del plásmido.....	29
7.4.4 Análisis de colonias candidatas .....	30
7.5 Evaluación de la viabilidad de <i>E.coli</i> inducidas con concentraciones crecientes de IPTG..	30

7.5.1 Goteo en placa con concentraciones crecientes de IPTG .....	30
7.5.2 Western Blot de la expresión de <i>RvDsup</i> inducida con concentraciones crecientes de IPTG .....	31
7.6 Evaluación de la viabilidad de <i>E. coli</i> BL21 con concentraciones crecientes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia y ausencia de <i>RvDsup</i> .....	31
7.6.1 Medición de la densidad óptica en concentraciones crecientes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia y ausencia de <i>RvDsup</i> .....	31
7.6.2 Viabilidad bacteriana mediante goteo en placa en concentraciones crecientes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia y ausencia de <i>RvDsup</i> .....	31
7.7 Determinación de niveles de carbonilación de proteínas en condiciones oxidativas en presencia y ausencia de <i>RvDsup</i> .....	32
7.7.1 Obtención de las Proteínas en condiciones oxidativas. ....	32
7.7.2 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para proteínas carboniladas. ..	32
7.8 Expresión y Purificación de la proteína <i>RvDsup</i> mediante método no desnaturalizante ..	33
7.8.1 Sobre expresión de la proteína <i>RvDsup</i> .....	33
7.8.2 Purificación de la proteína .....	33
7.8.3 Concentración de la proteína .....	34
7.9 Ensayos de movilidad electroforética .....	34
7.9.1 Generación de la Sonda de Doble cadena .....	34
7.9.2 Ensayo de unión de cadena doble (dsDNA) .....	35
7.9.3 Ensayo de unión de cadena sencilla (ssDNA) .....	35
<b>8. Resultados .....</b>	<b>35</b>
<b>9. Discusión .....</b>	<b>57</b>
<b>10. Conclusiones .....</b>	<b>61</b>
<b>11. Perspectivas .....</b>	<b>61</b>
<b>12. Bibliografía .....</b>	<b>62</b>

## 1. Introducción:

### 1.1 Daños ocasionados al DNA

Los organismos sufren diversos tipos de exposiciones a agentes que causan daños al DNA esto puede ser por factores endógenos o exógenos, lo que consecuentemente puede afectar la viabilidad celular. Por ello hay diversos mecanismos de reparación que corrigen el daño ocasionado al DNA (Chatterjee & Walker., 2018). Las inserciones/deleciones, aductos de bases, mal apareamientos, entrecruzamiento de hebras, ruptura de cadena sencilla y rupturas de doble cadena son algunos de los daños que puede sufrir el DNA, lo cual induce inestabilidad genómica y por ende comprometen la viabilidad celular (Liang et al., 2024).

### 1.2 Daños ocasionados por la radiación ionizante y los ROS (Radicales libres de oxígeno)

La radiación ionizante es un tipo de radiación que transporta la suficiente carga de energía y derivado a esto elimina electrones de los átomos, ionizándolos. Los tipos de radiaciones se clasifican según su efecto ya sea directo o indirecto (Tuieng et al., 2021). La radiación ionizante puede causar diversos daños como; daños al DNA, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas, este daño se da derivado de la radiólisis (Figura 1).

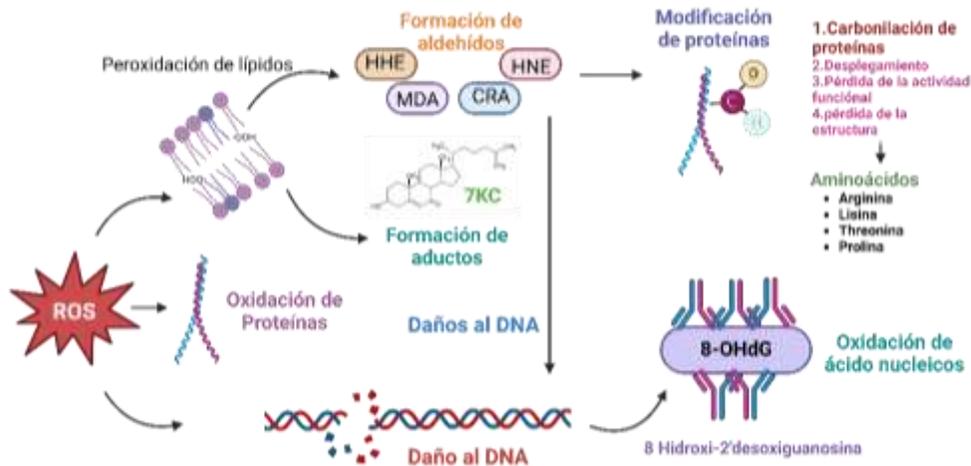


Figura 1. Principales daños ocasionados por los Radicales libres de oxígeno (ROS). Modificado de Sachdev (2021).

En la figura se muestran los diversos daños causados por los ROS, directamente en las proteínas causa una oxidación de esta mismas. A través de la peroxidación de lípidos, se forman aductos en el DNA, así como la formación de aldehídos como el 7-cetocolesterol (7KC), malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), crotonaldehído (CRA), 4-hidroxi-trans-2-hexenal (HHE) que causan modificaciones irreversibles de proteínas como el despliegamiento, pérdida de actividad, pérdida de función y carbonilación. Por último los ROS son responsables de la oxidación de ácidos nucleicos como la 8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina.

La radiólisis del agua es el proceso en el cual la radiación ionizante causa la ionización de las moléculas del agua, ocasionando que estas se rompan lo cual genera una transformación química que resulta en la formación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres (Jones et al., 2007). Estos radicales libres (ROS) contienen un exceso de energía lo que hace las moléculas muy inestables y reactivas, reaccionando químicamente con otras moléculas y así modificándolas. Un ambiente oxidativo en el organismo puede causar diversos daños, dentro de los cuales se encuentran las modificaciones de las proteínas como lo son la acetilación, glucosilación, oxidación y modificaciones funcionales, estructurales y la carbonilación de proteínas (Akagwa., 2021; Dayem et al., 2017). La carbonilación de proteínas es definida como un cambio irreversible que ocasiona un cambio en la cadena polipeptídica llevando a la pérdida funcional de la proteína. Las especies reactivas de oxígeno pueden causar oxidaciones en ciertos aminoácidos específicos como la lisina, treonina, prolina y arginina (Figura 1).

### 1.3 Vías de Reparación del DNA

Al presentarse algún tipo de daño al DNA, los organismos cuentan con mecanismos complejos cuyo objetivo es mantener la estabilidad genómica, ante errores que se dan en la replicación (Curtin et al 2023). Estos daños se califican de acuerdo con su origen: ya sean exógenos o endógenos (Chatterjje & Walker, 2017). Es debido a esto que para mantener la estabilidad genómica existen diversos mecanismos de reparación del DNA (figura 2): reparación por escisión de base- BER (Base Excision Repair); reparación por escisión de nucleótidos- NER (Nucleotide Excision Repair); reparación por apareamiento erróneo- MMR (Mismatch Repair); recombinación homóloga (Homologous Recombination) y unión de extremos no homólogos- NHEJ (Non homologous end-joining) (Tomasova et al., 2020; Chatterjje & Walker, 2017) (Figura 2).

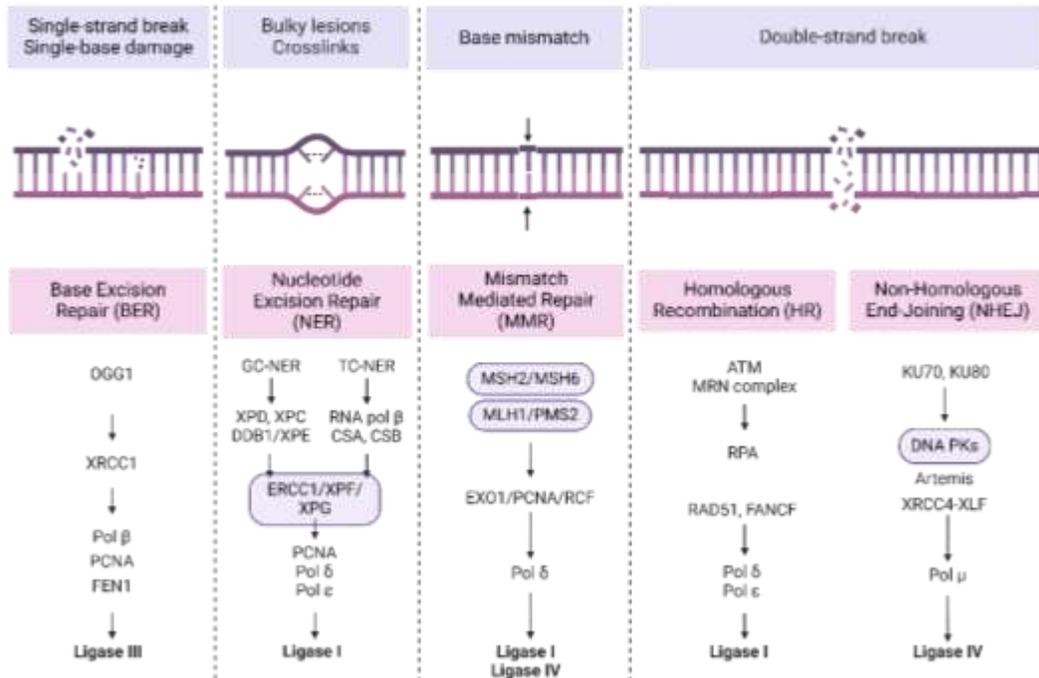


Figura 2 Vías de reparación del DNA. Modificado Curtin (2023).

Figura 2. Vías de reparación ampliamente caracterizadas del DNA. Las vías de reparación de cadena sencilla que incluyen; la vía de reparación por escisión de base (BER) donde participa la proteína XRCC1 y la ligasa 3, la vía de reparación de escisión de nucleótidos (NER) donde participan las enzimas XPF y XPG y la vía de reparación de mismatch (MMR) donde participan las proteínas MSH2 y MSH6. La reparación de doble cadena es mediada por dos vías la vía de recombinación homologa (HR) en donde participa el complejo MRN así como la ligasa 1 y la vía de reparación de unión de extremos no homologos (NHEJ) donde participa el dímero Ku70/Ku80.

La vía BER se caracteriza por corregir daños pequeños causados por oxidación, desaminación y alquilación, estos daños causan pequeñas distorsiones a la estructura alfa hélice del DNA. Esta vía reconoce y remueve bases dañadas, dejando un sitio abásico que posteriormente es procesado por la vía del parche corto o la vía de parche largo (Korkan & Bjoras., 2013).

La vía NER está dividida en dos, la NER genome global repair (GG-NER) y NER acoplado a la transcripción (TC-NER). Esta vía remueve lesiones que forman aductos y provoca grandes cambios conformacionales que desestabilizan el dúplex de DNA. GG-NER es un proceso activo en regiones que no transcriben, la vía TC-NER esta activa en zonas relacionadas con la RNA polimerasa II y de transcripción (Chatterjee & Walker, 2017., Karsikova et al., 2021).

La vía MMR (Figura 2) corrige los apareamientos erróneos del DNA, así como inserciones y deleciones causadas por una replicación errónea o errores causados por la DNA polimerasa. La vía sirve para reparar errores en DNA recién sintetizado, y previene la recombinación entre hebras que están relacionadas, pero no son homologas (Marinus., 2012).

Las lesiones de cadena doble son más complejas, por lo cual solo pueden ser reparadas por dos vías: la vía de HR y NHEJ. La vía de recombinación homologa requiere de cierta homología en la secuencia donde se va a hacer el cambio y esta activa en la fase S y G2 del ciclo celular. En esta vía participan proteínas como el complejo MRN, ATM, CtIP, BRCA1, BRCA2, RAD51 y la ligasa 1 (Tomasova et al., 2020).

Por último, en la vía de NHEJ no es necesario una secuencia homologa para la reparación, en este proceso participa el heterodímero ku70/ku80 el cual se une al sitio de ruptura de doble cadena, así como la unión de proteínas importantes de esta vía como artemis, DNA PKs y XRCC4.

#### 1.4 Reparación por Recombinación Homologa

La vía de reparación homologa es de alta fidelidad, ya que es necesaria la presencia de una región homologa, a la que provee una reparación a daños complejos del DNA como lo son las rupturas de doble cadena (DSB). Esta vía juega un papel importante en la replicación y el mantenimiento de los telómeros (Chae et al., 2023). Cuando hay problemas con esta vía de reparación los resultados pueden ser perjudiciales para la célula ya que se pueden dar deleciones, translocaciones, duplicaciones o una aneuploidía. Diversas proteínas son activadas en esta vía como es el caso de la proteína de recombinación meiótica 11 (MRE11) (Tomasova et al., 2020) que pertenece al complejo MRN (Figura 3).

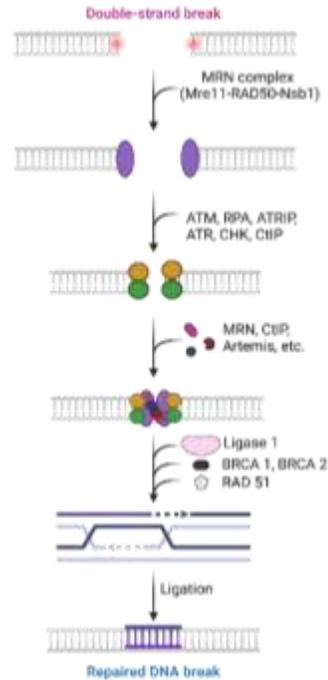


Figura 3. Vía de reparación de Recombinación Homóloga. Modificada de Tomasova y colaboradores (2020).

Esquema de la vía de reparación recombinação homóloga. En esta vía de HRR el complejo MRN reconoce el rompimiento del DSB (nucleasa Mre11 tiene polaridad 3'-5') los cuales activan a la proteína Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) y junto con la endonucleasa Artemis y CtIP (nucleasa con polaridad 5'-3') empieza la resección de los extremos. se reclutan a Exo1 y el complejo BLM/Dna2 para generar extremos 3' de cadena sencilla los cuales serán protegidos por la proteína RPA que recubre los extremos 3' y servirá para el reclutamiento de BRCA 1 y BRCA 2, así como RAD51 que reemplaza a RPA para formar un filamento previo a la búsqueda de secuencia homóloga. Finalmente, se forma una estructura llamada intermediario de Holliday cuya resolución termina el proceso de reparación.

### 1.5 Reparación de extremos no homólogos

La vía de reparación de extremos no homólogos repara las rupturas de doble cadena (DSB) en el DNA, a diferencia de la vía de recombinación homóloga, esta vía no requiere una cromátide hermana o región homóloga. Esta vía de reparación puede darse en cualquier etapa del ciclo celular (principalmente en la fase G1), sin embargo, este proceso involucra cierta pérdida de la secuencia, lo cual puede generar mutaciones (Tomasova et al., 2020). Durante una ruptura de doble cadena las proteínas de unión Ku70/ku80 llegan al sitio de la lesión, después se forma el complejo MRN que este compuesto por MRE11-Rad50-NBS1. Artemis que tiene la actividad endonucleasa se acopla y después se acopla la ligasa IV en conjunto con XLF y XRCC4 (Figura 4).

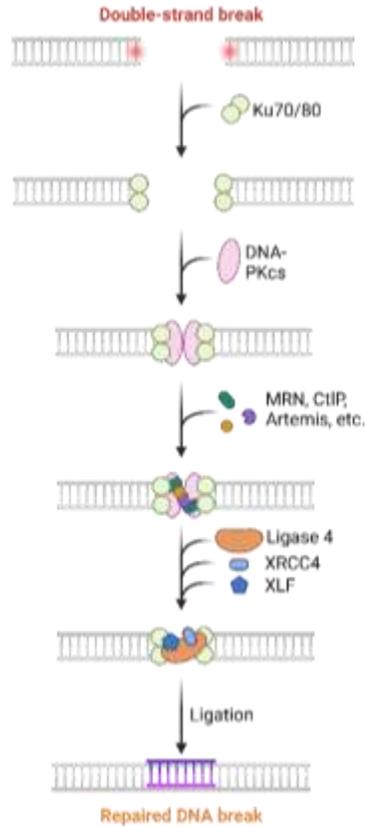


Figura 4. Vía de reparación de Extremos no homólogos. Modificada de Tomasova y colaboradores (2020).

Esquema simplificado de la vía de reparación de extremos no homólogos. En esta vía las proteínas Ku70/ku80 se unen a las hebras de DNA, para que después este DNA-PKcs que facilita la unión de otras proteínas al sitio del daño. XRCC4 está involucrado en la fase de ligación y en conjunto con la ligasa 4 y XLF realizan el proceso de ligación.

## 1.6 Tardígrados

Los tardígrados son extremófilos que han evolucionado para poder sobrevivir en ambientes extremos, son conocidos por su excepcional tolerancia extrema a diversos ambientes adversos, como la presión, la temperatura, la gravedad, e incluso la radiación ionizante. Esto se logra a través de una suspensión reversible del metabolismo desencadenada por la desecación, un fenómeno llamado anhidrobiosis. Los tardígrados son invertebrados que miden de 0.1 a 1.2 mm de largo (Figura 5) (Arakawa., 2022).



Figura 5. Imagen microscópica del tardígrado *Ramazzottius varieornatus* (McLendon., 2020)

Los tardígrados son invertebrados y están compuestos morfológicamente por cinco segmentos, un segmento que incluye la cabeza y cuatro segmentos del cuerpo que tienen un par de piernas con garras en cada uno, dando un total de 8.

Los tardígrados son invertebrados que pueden vivir hasta 2 meses y hay más de 1500 especies ya identificadas hasta el momento (Hashimoto et al., 2017; Ricci et al 2020). Hasta el momento una de las especies más extremo tolerantes es *Ramazzottius varieornatus*, ya que es considerado el genoma de referencia de los tardígrados por su alta tolerancia a la radiación UV que, como la radiación ionizante, provoca un ambiente oxidativo (Puig et al., 2021).

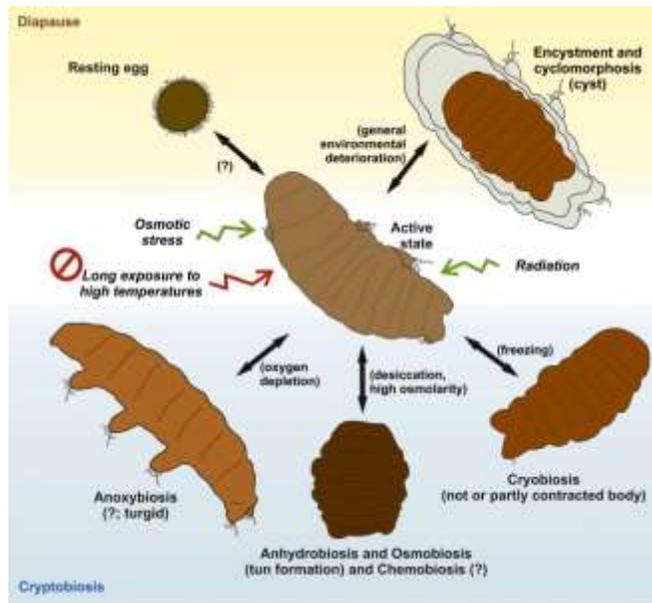


Figura 6. Mecanismos adaptados por los tardígrados en condiciones extremas.

Los tardígrados cuando están en condiciones ambientales óptimas están en un estado activo, sin embargo, al cambiar este ambiente debido a estrés osmótico, radiación o exposiciones prolongadas a temperaturas altas pueden tomar diversos mecanismos de protección. Cuando hay una disminución de oxígeno ellos entran en un estado catatónico en donde hay una suspensión metabólica (criptobiosis), cual hay una falta de agua (anhidrobiosis) los tardígrados toman una forma contraída conocida como tun. Al estar en bajas temperaturas (criobiosis) ellos contraen parcialmente su cuerpo y al haber un deterioro ambiental general el tardígrado se enquista y se vitrifica.

Cuando los tardígrados están en un ambiente de anhidrobiosis gracias a su estructura muscular que consiste en musculatura ventral y dorsal ellos pueden tomar la forma de tun, así como también pueden reducir su volumen de agua de un 85 a 90%. Cuando hay anoxobiosis (falta de oxígeno) y criobiosis (bajas temperaturas) los tardígrados entran en un estado inmóvil parcialmente contraídos, así como en criptobiosis que es una suspensión metabólica (Mínguez-Toral., 2020). Por último, al haber cualquier deterioro ambiental, las proteínas intrínsecamente desordenadas de los tardígrados (TDPs) protegen estructuras importantes como lo son el DNA y la mitocondria. Una de estas TDPs llamada RvLEAM en conjunto con la trehalosa que es un estabilizador molecular forman una capa protectora alrededor del tardígrado, este proceso es conocido como vitrificación (Nguyen et al., 2022).

### 1.7 Proteínas Intrínsecamente desordenadas de los Tardígrados.

Los tardígrados tienen distintos mecanismos para sobrevivir al estrés, por lo cual se descubrieron proteínas únicas de los tardígrados que los ayudan a resistir ambientes inhabitables para otras especies. Hay tres familias que colectivamente forman parte del grupo de proteínas desordenadas de los tardígrados (TDPs). En comparación con otras proteínas, cuya función es dictada por su estructura tridimensional, los TDPs no existen en conformación estática por lo cual son altamente desordenadas (Hesgrove., et al 2020).

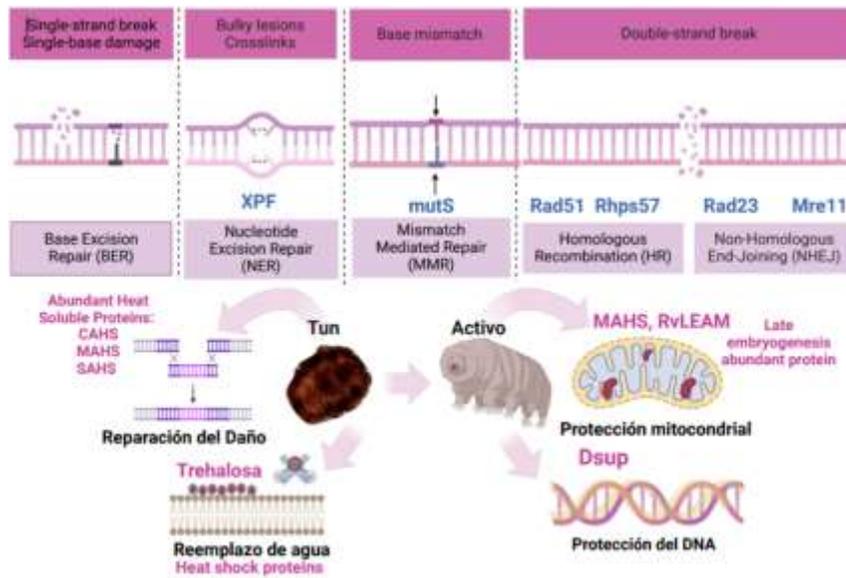


Figura 7. Vías de reparación de DNA encontradas en algunos tardígrados, así como proteínas intrínsecamente desordenadas de los tardígrados y sus funciones.

Vías de reparación encontradas a través de análisis ómicos en diversas especies de tardígrados. Los tardígrados poseen proteínas intrínsecamente desordenadas únicas (TDPs) de estos organismos los cuales incluyen a las proteínas solubles al calor; proteína soluble al calor mitocondrial (MAHS), proteína soluble al calor secretora (SAHS) y la proteína soluble al calor citoplasmática (CAHS), que participan en la protección de estructuras importantes cuando el tardígrado pasa de un estado activo a inactivo. Dentro de este grupo de TDPs está la proteína de supresión de daño Dsup que protege al DNA de daños ocasionados por la radiación, así como la proteína de embriogénesis tardía (RvLEAM) que una de sus funciones es proteger a la mitocondria de daños causados por deterioraciones ambientales.

Se han realizado estudios de Genómica y proteómica que han proporcionado información sobre la expresión de las vías de reparaciones del DNA en varios tardígrados. Se han encontrado ciertas proteínas involucradas en diversas vías de reparación como la Rad51 involucrada en la vía de recombinación homologa, sin embargo, hay algunas especies como *Echiniscoides sigismundi* que no presentan vías de reparación de doble cadena. Las proteínas solubles al calor ayudan en procesos de reparación de daños, así como protección de ciertos organelos como la mitocondria, actúan en conjunto la proteína

RvLEAM (Proteína de embriogénesis tardía) (Boothby., 2017). La proteína RvLEAM en conjunto con la Trehalosa ayudan en el proceso de vitrificación. Así como las proteínas pequeñas de choque térmico que son chaperonas que previenen la agregación de proteínas y mantienen la estabilidad proteica de los tardígrados durante su desecación (Miyazawa et al., 2022). La proteína más importante y de gran interés biomédico que se ha encontrado en el tardígrado *Ramazzotius Varieornatus* es la proteína de supresión de daño abreviada Dsup que protege al DNA como una barrera física contra los radicales libres de oxígeno (Chavez et al., 2020, Kirke et al., 2020).

Se han realizado estudios de Genómica y proteómica en donde se han documentado la expresión de una amplia variedad de proteínas antioxidantes (catalasa, Cu/Zn- superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa (GPx)) conocidos en tardígrados desecados en comparación con los hidratados (Mínguez-Toral et al., 2020).

## 2. Antecedentes directos:

La proteína de supresión de daño (Dsup) de *R. varieornatus* es de interés biomédico debido a su habilidad de proteger el DNA de daños ocasionados por la radiación. (Mínguez-Toral et al., 2020; Hashimoto et al., 2017). Esta proteína ha sido estudiada para ver si pudiera proteger a otras células de daños ocasionados por la radiación Hashimoto y colaboradores en el 2017 (Hashimoto et al., 2017) estudiaron la supresión del daño de cadena doble utilizando células HEK293. Cuando la histona H2Ax es irradiada al haber una ruptura de cadena doble esta se fosforila y se refiere como gama-H2AX o H2AX fosforilada. Ellos irradiaron estas células con una dosis de 1 grey de radiación y contaron las histonas fosforiladas 1 hora después del daño mediante inmunofluorescencia. Se puede observar una disminución significativa en los focos de histona fosforilada en las células que expresan la proteína *RvDsup* (figura 8) en comparación con el control que es el máximo de daño y con las células (knockdown de *RvDsup*) en donde hay un silenciamiento del 77%. Por lo cual ellos concluyen que la actividad de la proteína *RvDsup* es la responsable de suprimir este daño a las células.

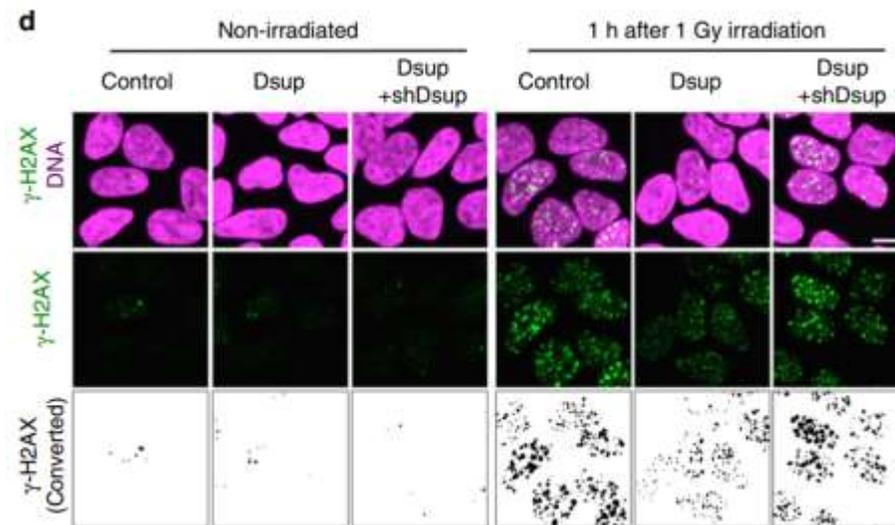


Figura 8. *RvDsup* protege a células HEK293 contra daños ocasionados por la radiación. (Hashimoto et al., 2017)

Comparación de focos de fosforilación de la histona H2AX (señal en verde) en células HEK293 en células no expuestas a radiación y expuestas después de 1 hora de radiación a 1 grey. En el cual se tienen células no transfectadas, células que expresan la proteína *RvDsup* y por último células que expresan la proteína, pero en donde hay un silenciamiento del 77%.

Puig y colaboradores en 2021 (Puig et al., 2021) decidieron evaluar la habilidad de reparación de esta proteína en bacterias, debido a que *RvDsup* es una proteína nuclear altamente cargada que se une a DNA nucleosomal protegiéndolo así de los radicales libres de oxígeno y las bacterias no presentan nucleosomas. Ellos clonaron la secuencia codificante de *RvDsup* en el vector pSB1AC3-pBAD/araC-Dsup, para posteriormente transformarlo en *E.coli* K-12. Expusieron a este cultivo transformado con el vector y a un control sin transformar para posteriormente medir la fracción sobreviviente de bacterias *E.coli* después de exponer dos veces a las bacterias con la dosis de rayos-x. Las *E.coli* que expresan la proteína *RvDsup* tienen una mayor fracción sobreviviente en comparación con las *E.coli* control (figura 9). Por lo cual ellos concluyen que *RvDsup* protege a las bacterias de la radiación.

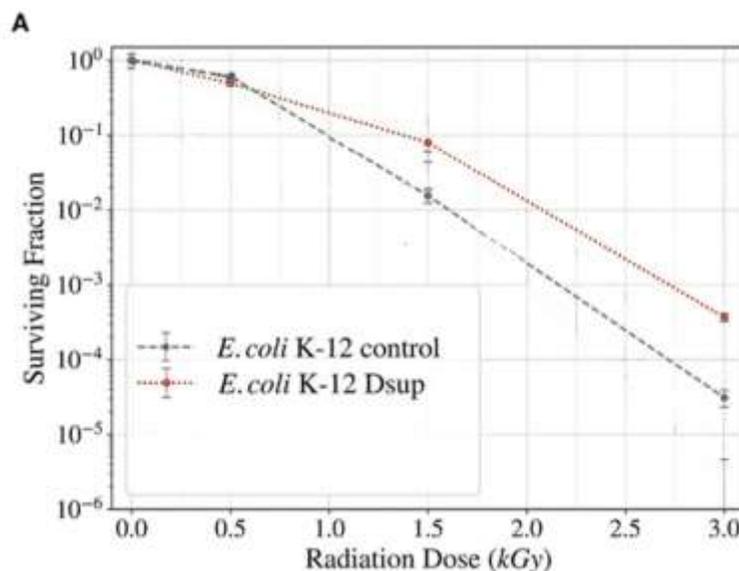


Figura 9 Curva de supervivencia de *E.coli* que sobre expresa *RvDsup* respecto al control que no la expresa (Imagen modificada Puig et al., 2021)

Curva de supervivencia de *E.coli* control (gris) y *E.coli* *RvDsup* (rojo). *E.coli* control es una bacteria sin previa exposición a la radiación, Las bacterias fueron expuestas dos veces a dosis de entre 0 a 3000 Gy en intervalos de 250 Gy a una dosis de exposición de 12.6 Gy por minuto. La  $OD_{600}$  fue tomada a cada 500 Gy en la segunda dosis de exposición.

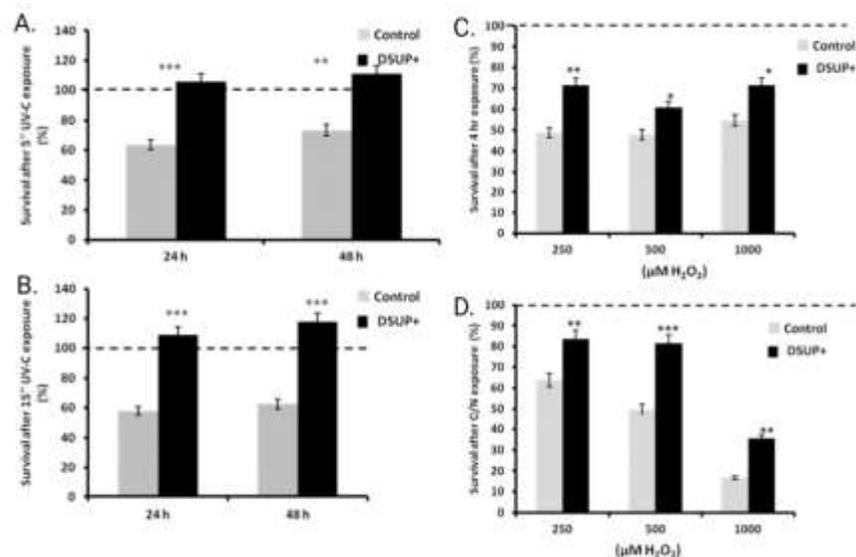


Figura 10 Supervivencia celular de HEK 293 después de radiación UV y ambiente oxidativo. (Ricci et al., 2021)

(A,B)Supervivencia celular después de 5 y 15 minutos de exposición UV-C, 24 y 48 horas después de la exposición. (C,D) Células sobrevivientes después de una exposición de 4 horas y overnight, tratadas con concentraciones crecientes de 250, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Ricci y colaboradores en 2021 (Ricci et al., 2021) quisieron indagar más sobre el mecanismo protector de la proteína *RvDsup* en el cual ellos midieron las células HEK 293 que sobrevivieron después de haber sido expuestos a radiación UV (Figura. 10), así como daños ocasionados por un ambiente oxidativo causado por el incremento en la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la figura A y B se pueden observar el crecimiento celular después 5 o 15 minutos de exposición con UV-C, en los cuales se midió su recuperación 24 horas y 48 horas posterior al daño. En ambas condiciones se puede observar que las células que expresan *RvDsup* tienen una mejor supervivencia en comparación con el control, incluso crecieron por encima de la condición basal. En las figuras C y D ellos miden la recuperación de las células a después de una exposición con concentraciones crecientes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , posterior al daño de 4 horas se puede observar que las células que expresan la proteína *RvDsup* tienen una mayor fracción sobreviviente en comparación con el control, este mismo comportamiento se puede observar después de una recuperación overnight. Por lo cual ellos concluyen que *RvDsup* protege a las células HEK293 contra un ambiente oxidativo.

C

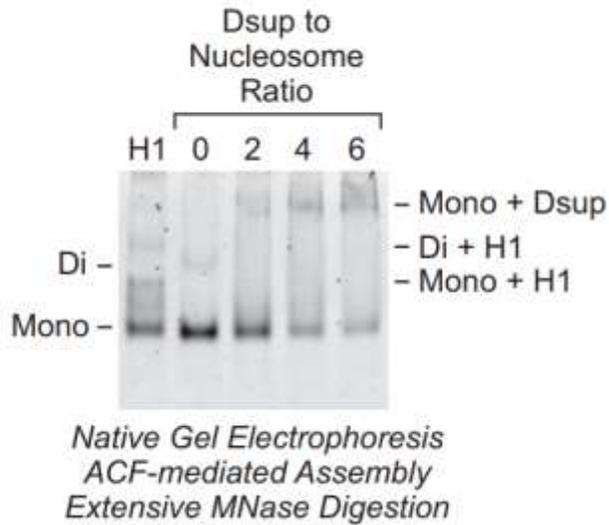


Figura 11. Ensayo de movilidad electroforética en ausencia y presencia de *RvDsup* (Chávez et al., 2019)

Gel nativo al 4.5 %, el plásmido pGIE-0 fue cromatinizado in vitro (3269 pb), junto con octámeros de histona H1 de *Drosophila melanogaster*. La proporción de *RvDsup* a nucleosoma incrementa de 0 a 6, la reacción con H1 es solo de referencia, una vez terminada la corrida el gel fue teñido con bromuro de etidio.

En 2019 Kadonaga y colaboradores (Chávez et al., 2019) decidieron analizar la unión de *RvDsup* y su capacidad de unión al nucleosoma, ellos digirieron la cromatina obtenida de *Drosophila melanogaster* con MNasa, los mono-nucleosomas resultantes fueron sujetos a una electroforesis en un gel no desnaturalizante. Ellos utilizaron a la histona H1 de *Drosophila* como referencia debido a que H1 se une al nucleosoma. Al ir aumentando la proporción de proteína *RvDsup* con el mono-nucleosoma se forma un complejo mayoritario que es la unión del mono nucleosoma con *RvDsup* (Figura 11), consecuentemente se ve la disminución de la banda del mono-nucleosoma al ir aumentando la proporción proteína mono-nucleosoma. En este reporte también mencionan la formación de otros dos complejos; mononucleosoma y H1 y di mono nucleosoma con H1, por lo cual *RvDsup* y la histona H1 pueden unirse simultáneamente a los nucleosomas. Por lo cual, ellos concluyen que *RvDsup* tiene afinidad de unión al nucleosoma, así como de que la actividad de *RvDsup* actúe sobre la H1.

### 3. Justificación:

La proteína de supresión de daño de *R. varieornatus* (Dsup) protege al DNA, funcionando como una barrera física contra los radicales libres de oxígeno (ROS) en DNA cromatinizado, sin embargo, se desconoce si hay un mecanismo adicional por el cual esta proteína le puede conferir esta protección a las bacterias. Conocer más sobre su mecanismo contribuirá a entender la resistencia de estos organismos extremo-tolerantes.

### 4. Hipótesis:

La proteína Dsup tiene actividad antioxidante lo cual le permite disminuir los niveles de carbonilación en proteínas en *E. coli* y por consecuencia se incrementa la tasa de supervivencia.

### 5. Objetivos:

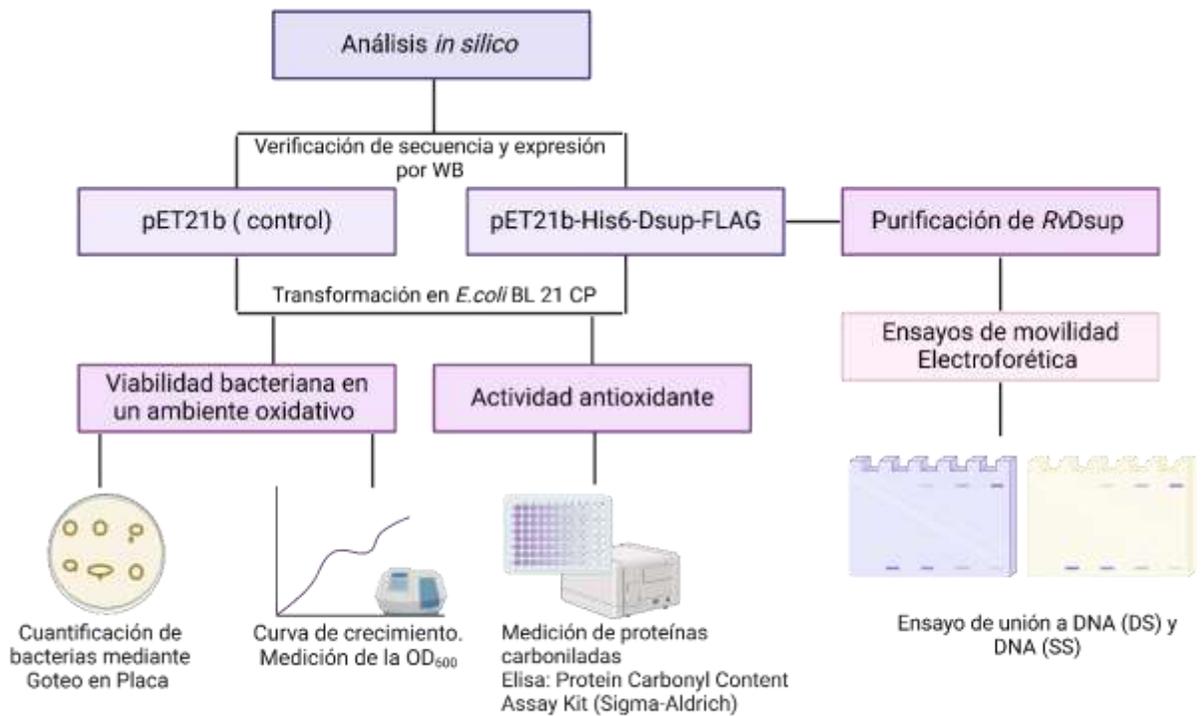
#### 5.1. Objetivo General:

Evaluar la actividad antioxidante de la proteína de supresión de daño (Dsup) de *R. varieornatus* en bacterias.

#### 5.2. Objetivos Específicos:

- I. Analizar *in silico* la proteína de supresión de daño *RvDsup*.
- II. Evaluar la viabilidad en *E. coli* BL21 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia y ausencia de *RvDsup*.
- III. Determinar los niveles de carbonilación de proteínas en condiciones oxidativas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en presencia y ausencia de *RvDsup*.
- IV. Realizar Ensayos de cambio de movilidad electroforética de *RvDsup* purificada con dsDNA y ssDNA.

## 6. Estrategia Experimental



## 7. Metodología

### 7.1 Material Biológico

#### 7.1.1 Cepas Bacterianas

Las cepas que se utilizaron en este trabajo se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de la cepa bacteriana

Cepa	Genotipo	Referencia u origen
<i>Escherichia coli</i> BL21 CP	B F <sup>-</sup> ompT hsdS(rB – mB – ) dcm <sup>+</sup> Tetr gal	Stock del laboratorio
<i>Escherichia coli</i> DH5-Alfa	recA1, endA1 lacZΔM15	Stock del laboratorio

### 7.1.2 Construcciones

Para este trabajo se utilizó las siguientes construcciones

Tabla 2. Características de las construcciones plasmídicas

Nombre	Características	Ensayos	Referencia
pET21b-His6-Dsup-FLAG	LacI, resistencia a ampicilina, terminador T7, FLAG, Tag His	Ensayo de ambiente oxidativo. Medición de carbonilación de proteínas	Kadonaga et al. 2021
pEt21b (plásmido control)	LacI, resistencia a ampicilina, terminador T7, FLAG, Tag His	Ensayo de ambiente oxidativo. Medición de carbonilación de proteínas	Este trabajo

## 7.2 Preparación y transformación de células competentes

### 7.2.1 Células quimio competentes

Para la obtención de células quimiocompetentes se realizó siguiendo el protocolo de Malke y colaboradores (Malke., et al 1984) la cepa de E. coli BL21 CP, la cual se creció en placas de medio Luria-Bertani (LB) sin antibiótico y se incubó a 37°C de 12 a 16 horas. Posteriormente, se inoculó una colonia en 5 mL de medio LB líquido sin antibiótico (cultivo semilla), el cual se incubó a 37° C en agitación de 12 a 16 horas. De este cultivo se tomó 1 mL y se diluyó en 50 mL de medio LB (1:50). Se incubó en agitación a 37° C hasta que se alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0.5. El cultivo se enfrió en hielo por 5 min, para ser centrifugado a 6000 rpm durante 10 min a 4° C y se desechó el sobrenadante. Al paquete celular se le añadió 8 mL de solución TFbI (30 mM Acetato de potasio, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glicerol), y se incubó en hielo por 5 minutos. Se realizó una segunda centrifugación, bajo las mismas condiciones y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de solución TFbII (10 mM MOPS, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glicerol). Se dejó reposar en hielo por 15 minutos y posteriormente se formaron alícuotas de 50 µL en tubos eppendorf, los cuales se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C.

### 7.2.2 Extracción de DNA

Para la obtención del DNA del plásmido, siguiendo el protocolo de Berghammer y colaboradores (Berghammer et al., 1993), se tomó una asada del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG que se encontraba almacenado en la cepa Sure2 de *E. coli* y se estrió en una placa de LB con ampicilina. Posteriormente se tomó una colonia y se inoculó en un tubo con 5 mL de LB líquido con ampicilina, dicho tubo se incubó de 12 a 16 hrs a 37°C en agitación. El cultivo de bacterias se centrifugó 30 s a 13,000 rpm, y el sobrenadante se retiró por decantación. Se añadió 60 µL de buffer de lisis Easyprep (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 0.2 mg/ml RNasa A, 15% m/v sacarosa, 2 mg/ml lisozima), y se resuspendió el paquete celular con ayuda de la pipeta evitando hacer burbujas. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, 1 min en agua en ebullición y 1 min en hielo. Se centrifugó 15 min a 14,000 rpm, y se recuperó el sobrenadante, el cual fue almacenado a -20°C. Para la verificación de la extracción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### Miniprep

Se siguió el protocolo establecido por Birnboim y colaboradores (Birnboim et al., 1979). Se inocularon células de *E. coli* en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron alrededor de 12 a 16 horas a 37 °C en agitación constante. Se centrifugo a 13000 rpm por 2 minutos para generar un paquete celular. Se decanto el sobrenadante y se resuspendio el paquete celular con 500 µL de buffer P1 (50 mM Tris Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A). Después se homogenizo y se añadió 500µL de buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS). Se mezclo por inversión y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se de agregó 500 µL de Buffer P3 (3.0 M acetato de potasio pH 5.5). Se homogenizaron y se incubaron 5 minutos en hielo. Se recupero el sobrenadante y se precipito el DNA con 750µL de isopropanol frío por 1 hora a -20°C. Después se centrifugo 15 min a 13000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con 500 µL de etanol 70% cada uno una vez terminado los tres lavados se retiró el sobrenadante, se dejó secar el paquete celular aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente y se re-suspendió en 100 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada.

### 7.2.3 Transformación de células quimio competentes

Se realizó la transformación de la cepa *E. coli* BL-21 CP siguiendo el protocolo de Malke y colaboradores (Malke., et al 1984) mediante choque térmico con el plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG. El tubo eppendorf que contiene las bacterias competentes se colocó en un recipiente con hielo y se le adicionó 2  $\mu$ L del DNA plasmídico que se extrajo previamente. Posteriormente, el tubo se incubó en hielo durante 30 minutos, y después se transfirió al thermoblock previamente ajustado a una temperatura de 42°C, donde se realizó una incubación de 60 segundos. Pasado el tiempo, el tubo se incubó en hielo durante 2 minutos. Se adicionó 1 ml de medio LB, y se incubó a 37°C en agitación durante una hora. Se tomaron 100  $\mu$ L para realizar un tapiz en placas de medio LB (suplementado con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina), las cuales se incubaron durante toda la noche a 37°C.

### 7.3 Verificación de la Secuencia *RvDsup* de *R. varieornatus*

Se verifico la secuencia del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG que fue donado por Kadonaga y colaboradores (Chavez et al., 2021)

#### 7.3.1 Verificación de la secuencia codificante de la proteína *RvDsup* mediante patrón de restricción

Se utilizo el DNA previamente extraído por miniprep y cuantificado. Las restricciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ L (5  $\mu$ L DNA, 3  $\mu$ L cutsmart, 2  $\mu$ L enzima y 10  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada). Se utilizaron las enzimas BamHI-HF, EcoRV-HF, XhoI y XbaI, la reacción fue incubada a 37 °C en el thermoblock por 2 horas. Posteriormente se corrieron las reacciones en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### 7.3.2 Verificación de la expresión de la proteína *RvDsup* (SDS-PAGE y Western Blot)

Se aisló una colonia del paso 7.2.3. para realizar un cultivo semilla de 1 ml con medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) el cual se dejó en agitación a 37°C por 12 a 16 hrs. Después se realizó una dilución 1:10 con medio LB con ampicilina y se dejó que alcanzara una OD<sub>600</sub>=0.5 para posteriormente ser inducido con 0.4 mM de IPTG por 2 horas. Se tomo 1 ml del cultivo el cual se centrifugo a 12000 rpm por 2 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió con la solución tampón de carga (Laemmli). La mezcla se llevó a temperatura de ebullición por 5 minutos y se mantuvo a temperatura ambiente para ser

cargada en un gel de SDS-PAGE al 10% de acrilamida. La electroforesis se corrió a 100V por 90 minutos. Al termino de esta se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente bloquearla durante una hora con leche descremada al 5% preparada con TBS-T. Terminada la hora de incubo de 12 a 16 horas con el anticuerpo primario anti-histidinas dilución 1:7000 (A7058, SIGMA-Aldrich) durante toda la noche a 4°C en agitación. Las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-T y se incubaron una hora con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con peroxidasa de rábano dilución 1:30,000 (W4021, Promega). Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-T (TBS 10X 100 mL, Tween 20 0.1% (p/v) 1mL) y se revelaron mediante quimioluminiscencia usando placas autos radiográficas en un cuarto oscuro.

#### 7.4 Construcción del Plásmido pET21b (plásmido control)

7.4.1 Liberación del fragmento Dsup del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG  
Se realizaron dobles digestiones utilizando el plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG. Las restricciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ L (10  $\mu$ L DNA, 3  $\mu$ L cutsmart, 2  $\mu$ L de cada enzima y 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada). Se utilizaron las enzimas XhoI rio arriba de la secuencia y BamHI-HF, XbaI y NdeI rio abajo. La reacción fue se incubo a 37 °C en el thermoblock por 2 horas. Posteriormente se corrieron las reacciones en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

7.4.2 Purificación de los Fragmentos  
Se cortaron los fragmentos obtenidos en el paso 7.4.1 para posteriormente colocarlos en una membrana de diálisis (Spectra/Pormolecularporous membrane tubing2, MWCO: 12-14 kDa) con 400  $\mu$ L de TBE 0.5X dentro. Se orientaron para realizar una electrocución utilizando buffer TBE 0.5 X, a 100V por 90 minutos. Después se extrajo el buffer del paquete dentro de la membrana.

7.4.3 Ligación del plásmido  
Se utilizo uno de los fragmentos obtenidos en el paso 7.4.2 el cual fue precipitado con 2 volúmenes de etanol al 100%, 10 mM de Cloruro de magnesio, 2 M de cloruro de sodio y se incubo a -20 °C por 12 horas. Se centrifugo a 13500 rpm por 1 hora, se hicieron 3 lavados al paquete celular con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Para

la reacción de ligación realizo una reacción utilizando el fragmento precipitado, dnTps, buffer cutsmart y Klenow para un volumen de reacción total de 15  $\mu$ L. La reacción se incubo a 37 °C por 1 hora y posteriormente de desnaturalizo por 20 minutos a 75 °C. Para la reacción de ligación se le añadió 1  $\mu$ L de ligasa T4 y 3  $\mu$ L de buffer de ligasa T4, la reacción se quedó a temperatura ambiente de 12 a 16 horas. Por último, se transformaron bacterias quimio competentes DH5-alfa.

#### 7.4.4 Análisis de colonias candidatas

Se extrajo DNA de las colonias obtenidas como es descrito en el paso 7.2.2 y se realizaron restricciones en un volumen de 20  $\mu$ L (10  $\mu$ L DNA, 3  $\mu$ L cutsmart, 2  $\mu$ L de cada enzima y 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada). Se utilizaron las enzimas BamHI-HF y EcoRV. Posteriormente se corrieron las reacciones en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### 7.5 Evaluación de la viabilidad de E.coli inducidas con concentraciones crecientes de IPTG

#### 7.5.1 Goteo en placa con concentraciones crecientes de IPTG

Este ensayo, se realizó utilizando el protocolo descrito por Gnanasekar y colaboradores (Gnanasekar et al., 2007). Se cultivaron bacterias BL21-CP transformadas con *RvDsup* hasta alcanzar un OD<sub>600</sub>=0.5 en medio LB con ampicilina. A continuación, el contenido del matraz se dividió en 25 alícuotas, a los cuales se les adicionó IPTG hasta obtener las siguientes concentraciones 0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mM. Dichos tubos de ensayo se incubaron a 37°C en agitación durante 4 h. Cada hora se tomó un tubo de cada condición para medir la OD<sub>600</sub> de cada una de las muestras. Se tomo una porción de cada una de las muestras para realizar las siguientes diluciones en serie 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup>, de las cuales se tomó 10  $\mu$ l de cada una y se gotearon en las cajas Petri de agar LB con ampicilina. Finalmente, las cajas se incubaron a 37°C durante la noche. Como control se usaron células bacterianas transformadas con el plásmido vacío (pET21b), las cuales se sometieron al mismo tratamiento. Se comparó el crecimiento de células bacterianas mediante espectrofotometría, realizando lecturas de absorbancias a OD<sub>600</sub> después de la incubación.

### 7.5.2 Western Blot de la expresión de *RvDsup* inducida con concentraciones crecientes de IPTG

Se tomaron 100 µl de cada muestra del paso 7.5.1 y se les adicionó la solución de carga (Laemmli). La mezcla se llevó a temperatura de ebullición por 5 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente, para ser cargadas en un gel de SDS-PAGE al 10%. La electroforesis se corrió a 100 V, al término de esta, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, en solución tampón de transferencia. La membrana se bloqueó con 5% de leche descremada durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario anti-histidinas dilución 1:7000 (SIGMA-Aldrich) durante toda la noche a 4°C en agitación. Las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-T y se incubaron una hora con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con peroxidasa de rábano dilución 1:30,000 (Promega). Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-T y se revelaron mediante quimioluminiscencia usando placas auto radiográficas.

## 7.6 Evaluación de la viabilidad de *E. coli* BL21 con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia y ausencia de *RvDsup*

### 7.6.1 Medición de la densidad óptica en concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia y ausencia de *RvDsup*

Este ensayo, se realizó utilizando el protocolo descrito por Gnanasekar y colaboradores (Gnanasekar et al., 2017). Se cultivaron bacterias BL21 CP transformadas con *RvDsup* hasta alcanzar un OD<sub>600</sub>=0.5 en medio LB con ampicilina. A continuación, el contenido del matraz se dividió en 25 alícuotas, a los cuales se les adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta obtener las siguientes concentraciones 0, 0.5, 1, 2 y 3 mM. Dichos tubos de ensayo se incubaron a 37°C en agitación durante 4 h. Cada hora se tomó un tubo de cada condición para medir la OD<sub>600</sub> de cada una de las muestras.

### 7.6.2 Viabilidad bacteriana mediante goteo en placa en concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia y ausencia de *RvDsup*

Se tomo una porción de cada una de las muestras del paso 7.6.1 para realizar las siguientes diluciones en serie 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup>, de las cuales se tomó 10 µl de cada una y se gotearon en las cajas Petri de agar LB con ampicilina. Finalmente, las cajas se incubaron a 37°C durante la noche. Como control se usaron células bacterianas transformadas con el plásmido vacío (pET21b), las cuales se sometieron al mismo tratamiento. Se comparó

el crecimiento de células bacterianas mediante espectrofotometría, realizando lecturas de absorbancias a OD<sub>600</sub> después de la incubación.

### 7.7 Determinación de niveles de carbonilación de proteínas en condiciones oxidativas en presencia y ausencia de *RvDsup*.

Este ensayo, se realizó utilizando el protocolo con modificaciones del kit Sigma-Aldrich (MAK094).

#### 7.7.1 Obtención de las Proteínas en condiciones oxidativas.

Se cultivaron bacterias BL21-CP transformadas con *RvDsup* hasta alcanzar un OD<sub>600</sub>=0.5 en medio LB con ampicilina. A continuación, el contenido del matraz se dividió en 4 alícuotas, a los cuales se les adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta obtener las siguientes concentraciones 0, 1, 2 y 3 mM. Dichos matraces se incubaron a 37°C en agitación durante 4 h. Este procedimiento se repitió utilizando el plásmido pET21b (plásmido control). Una vez pasadas las 4 horas, se centrifugaron los cultivos a 7000 rpm a 4°C por 10 minutos. Se resuspendieron las muestras con 500 µl de Agua miliQ estéril y las muestras fueron sonicadas a 100% de amplitud, 13 segundos y 35 segundos de descanso por 10 ciclos. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm a 4°C por 10 minutos y se cuantificaron las proteínas.

#### 7.7.2 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para proteínas carboniladas.

Las muestras fueron llevadas a una concentración de 0.5 a 2 mg en 20 µl y fueron tratadas con 10% de streptozocin y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos para después ser centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y a este se le agregó 20 µl de DNPH (2,4-Dinitrofenilhidracina) a cada muestra, se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se le añadió 6 µl de TCA 87% y las muestras fueron incubadas en hielo 5 minutos, se centrifugaron a 15000 rpm a 4°C por 2 minutos y se removió el sobrenadante. Al paquete celular se le realizaron lavados con acetona al 100% para retirar el exceso del DNPH. Por último, el paquete celular lavado se resuspendió en 40 µl de solución de Guanidina. Las muestras fueron cargadas en una placa de 96 pozos y acopladas con BCA (Ácido bicinconínico) y la placa fue leída en un equipo Epoch3 (Grado Labs) a 375 nm y 562 nm.

## 7.8 Expresión y Purificación de la proteína RvDsup mediante método no desnaturalizante

### 7.8.1 Sobre expresión de la proteína RvDsup

Para la sobreexpresión de la proteína se aisló una colonia de BL21-CP quimio competentes transformadas con el plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG, y se inoculó en 10 ml de medio LB con ampicilina, el cual se dejó 12 horas a 37°C en agitación. Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 en medio LB con ampicilina (volumen final 1 L), y se creció hasta alcanzar un  $OD_{600}=0.8$ . Alcanzada la densidad óptica del cultivo celular, se le añadió 0.5 mM de IPTG y se dejó en inducción por 2 horas en agitación a 37°C. El cultivo se enfrió por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos. a 4°C, el sobrenadante se descartó y con el paquete celular se procedió a realizar la purificación de la proteína.

### 7.8.2 Purificación de la proteína

Este ensayo, se realizó utilizando el protocolo descrito por Kadonaga y colaboradores (Chavez et al., 2021) con algunas modificaciones. Para purificar la proteína se utilizó la etiqueta de histidina presente en el vector pET21b-His6-Dsup-FLAG, mediante la columna con perlas de Agarosa-Níquel (QIAGEN). Para ello las células obtenidas del paso 7.8.1 se re suspendieron en la solución de lisis (40mM fosfato de potasio pH 7.6, 0.01% (v/v) NP-40, 0.1 mM EDTA, 580 mM cloruro de sodio, 10% glicerol, 10 mM 2-mercaptoetanol, 0.5 mM PMSF, 1x complete). La suspensión celular se sonicó, durante 13 segundos por 10 veces al 100% de potencia con un periodo de descanso de 35 segundos entre cada uno. Para la eliminación de los restos celulares se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante el cual fue filtrado. Previamente, la columna cromatográfica fue empacada con 1 mL de la suspensión de His Pur Ni-NTA Superflow Agarose (ThermoScientific), y se eluyó con solución de lisis hasta eliminar por completo la solución de almacenaje. Posteriormente se realizó un lavado con 8 mL de solución E1 (40 mM fosfato de potasio, pH 7.6, 20 mM imidazol, 500 mM cloruro de sodio, 10% (v/v) glicerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF) y se eluyó por completo. Se añadió el extracto total de bacterias a la columna y la fracción no unida fue recuperada en un tubo cónico etiquetado como extracto no unido. Dicho extracto fue eluído por la columna 3 veces y se recuperó una muestra de 100  $\mu$ L para su posterior

análisis por WB. Se añadió 3 mL de la solución E1 (20 mM Imidazol) y se eluyó por completo, recuperando la fracción no unida, y etiquetándola como pre-elución. Del cual, se tomó una muestra de 100 µL para su análisis por WB. Para la elución, se añadió 1 mL de la solución tampón E2 (200 mM Imidazol), se recuperó la fracción no unida y se tomó una muestra para WB. Se realizaron un total de 5 eluciones de las cuales se tomaron muestras para posteriormente ser corridas.

### 7.8.3 Concentración de la proteína

Para obtener la proteína concentrada y retirarle el imidazol, se concentraron colocando las muestras obtenidas de la elución en el paso 7.8.2 una por una en un filtro de proteínas de 30 kDa y centrifugando a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se re-suspendió la muestra con 1 ml de buffer buffer A<sub>2</sub> (20mM Tris-HCl, 150mM Cloruro de Sodio, 2mM de Cloruro de magnesio. 0.2 mM EDTA, Glicerol v/v 15%, 1mM 2-mercaptoetanol y Agua MiliQ estéril) realizando este procedimiento 3 veces para retirar el imidazol. Por último, se re-suspendió la muestra en 500 µL de buffer A<sub>2</sub>, se hicieron alícuotas de 50 µL que fueron almacenadas a -80 °C.

## 7.9 Ensayos de movilidad electroforética

### 7.9.1 Generación de la Sonda de Doble cadena

Para la generación de la sonda de 22 pb se utilizaron los siguientes primers:

Nombre de Secuencia	Modificación	Secuencia
CRE.Sst.Fw.FAM	5' (FAM)	GATTGCCTGACGTCAGAGAGCT
CRE.Sst.Fw.		GATTGCCTGACGTCAGAGAGCT
CRE.Sst.Rv		AGCTCTCTGACGTCAGGCAATC

Se cuantificaron los primers, para posteriormente hibridarlos a 90 °C por 5 minutos. Se retiraron y se dejaron enfriar en el cuarto frío (4°C). Se corrió la sonda en un gel de poliacrilamida al 10%, así como la sonda de cadena sencilla.

### 7.9.2 Ensayo de unión de cadena doble (dsDNA)

Para el ensayo de unión se utiliza un gel desnaturizante al 4% con 2.5% (v/v) de glicerol, el gel se pre corre a 40V por 1 hora. La reacción de unión se prepara en un volumen de 15  $\mu$ L y con 5 pmol/ $\mu$ L de sonda. Se prepara la reacción de unión incrementando la concentración de proteína añadida, la sonda, NP-40 0.01% (v/v) y buffer HEG 1x (25mM HEPES (K<sup>+</sup>), 0.1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 100 mM KCl, 100 ng de BSA), se incuban las reacciones a 30 °C por 30 minutos. Por ultimo las muestras se corren a 65V por 2 horas a 4°C y una vez terminada la corrida se visualiza en un transiluminador.

### 7.9.3 Ensayo de unión de cadena sencilla (ssDNA)

Para el ensayo de unión se utiliza un gel desnaturizante al 4% con 2.5% (v/v) de glicerol, el gel se pre corre a 40V por 1 hora. La reacción de unión se prepara en un volumen de 15  $\mu$ L y con 5 pmol/ $\mu$ L de sonda. Se prepara la reacción de unión incrementando la concentración de proteína añadida, la sonda de cadena sencilla CRE.Sst.Fw.FAM, NP-40 y buffer HEG 1x, se incuban las reacciones a 30 °C por 30 minutos. Por ultimo las muestras se corren a 65V por 2 horas a 4°C y una vez terminada la corrida se visualiza en un transiluminador.

## 8. Resultados

Al realizar el análisis bioinformático de la proteína *RvDsup* primero se decidió realizar un blast para la obtención de proteínas homologas, sin embargo, no se encontró ninguna proteína homóloga. Debido a esto, se decidió utilizar una proteína reportada como “Dsup-like” del tardígrado *Hypsibius exemplaris* es importante mencionar que ambas proteínas solo comparten un 24.5% de identidad de secuencia. La proteína “Dsup-like” a la cual nos referiremos como *HeDsup* es una proteína más pequeña con 328 aa en comparación con *RvDsup* que tiene 445 aa.

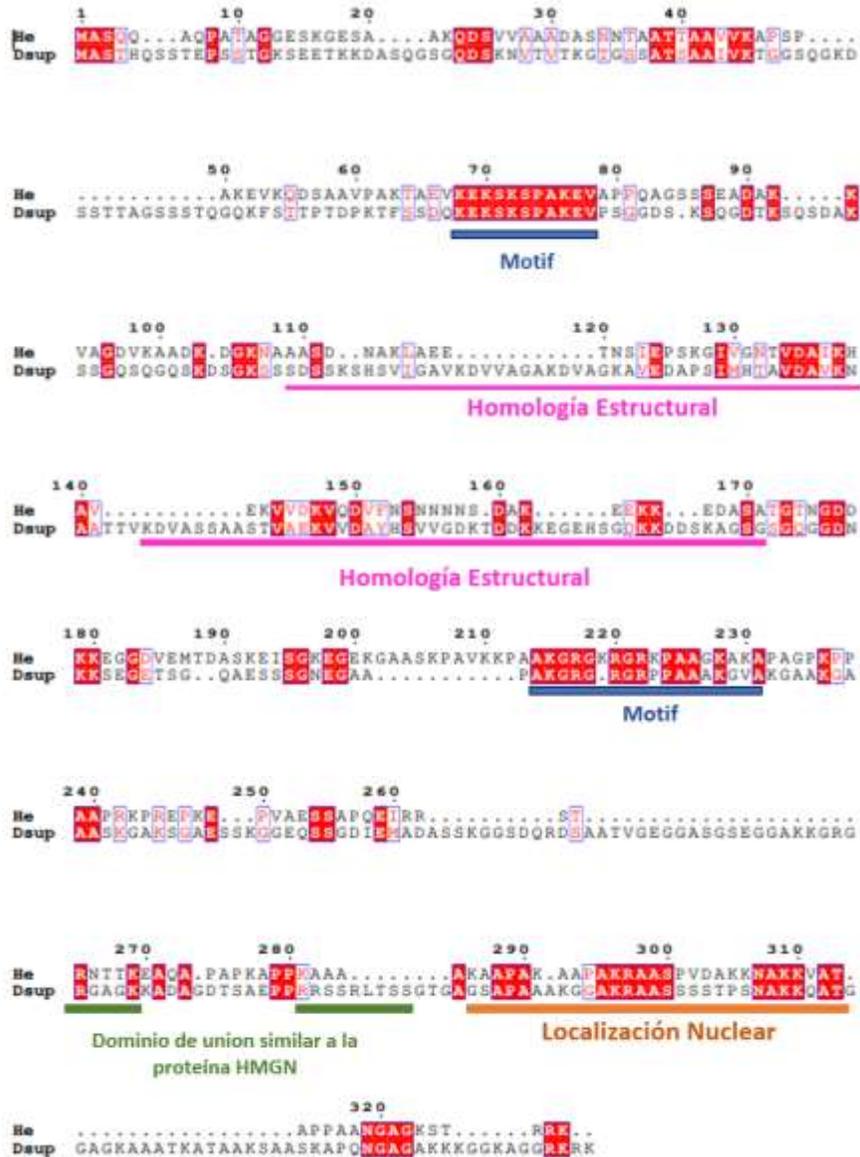


Figura 12. Alineamiento de la secuencia aminoácida de *RvDsup* (P0DOW4) y *HeDsup* (BV898\_01301) utilizando el programa ESPrift 3.0.

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína *RvDsup* y *HeDsup* para la identificación de motivos. Los recuadros rojos con letras blancas muestran los residuos altamente conservados (mismo aminoácido), las letras en rojo son aminoácidos ligeramente conservados (aminoácidos con características químicas similares) y los recuadros en azul son zonas conservadas. Se identificaron dominios de homología estructural (en rosa), dos motivos con función desconocida (en azul), un sitio de localización nuclear (en naranja) y un sitio de unión similar a la proteína HMGN (en verde).

Se hizo un alineamiento de ambas proteínas (figura 12). Los resultados revelan que: se encontraron dos motivos que no se ha encontrado su función hasta ahora, un dominio de homología estructural entre ambas proteínas, uno de unión similar a la proteína HMGN y uno de localización nuclear.

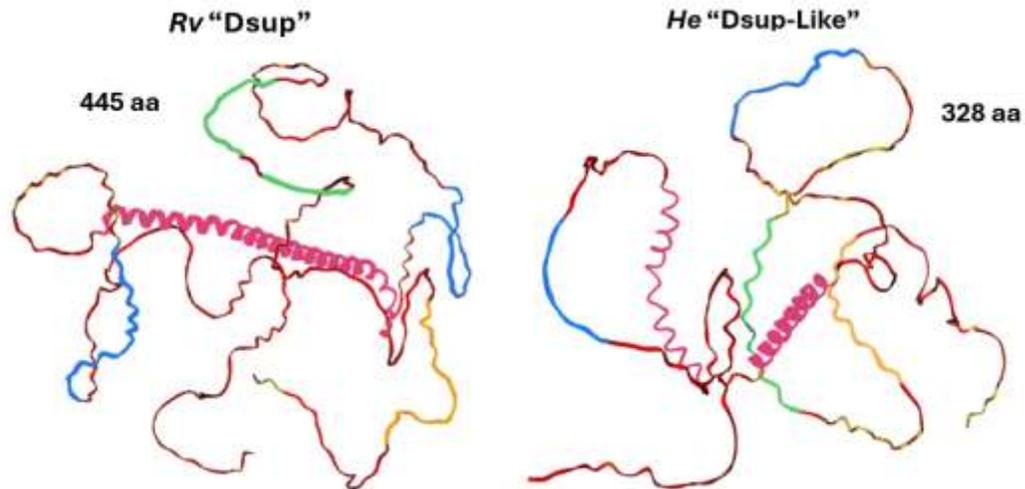


Figura 13. Predicción de las estructuras terciarias de *RvDsup* y *HeDsup* utilizando el programa AlphaFold.

Predicción de las estructuras terciarias de la proteína *RvDsup* y *HeDsup*, que son proteínas altamente desordenadas. Se identificaron los dominios de homología estructural (en rosa), dos motivos con función desconocida (en azul), un sitio de localización nuclear (en naranja) y un sitio de unión similar a la proteína HMGN (en verde).

Se realizaron las predicciones de la estructura terciaria (figura 13) en donde se puede observar que ambas proteínas son altamente desordenadas, sin embargo, se puede observar una zona de orden que corresponde al sitio antes mencionado de homología estructural (zona en rosa) que comparten ambas proteínas, así como un dominio similar a la proteína HMGN el cual es importante ya que esta proteína en eucariotas son proteínas con unión al nucleosoma independiente de secuencia y ayudan en diversos procesos como la transcripción, replicación, recombinación y vías de reparación del DNA (Naduri et al., 2020). Esta similitud de secuencia se encuentra en la región c-terminal. Por lo que se considera que este sitio es vital para la unión de la proteína de supresión de daño y si actividad protectora.

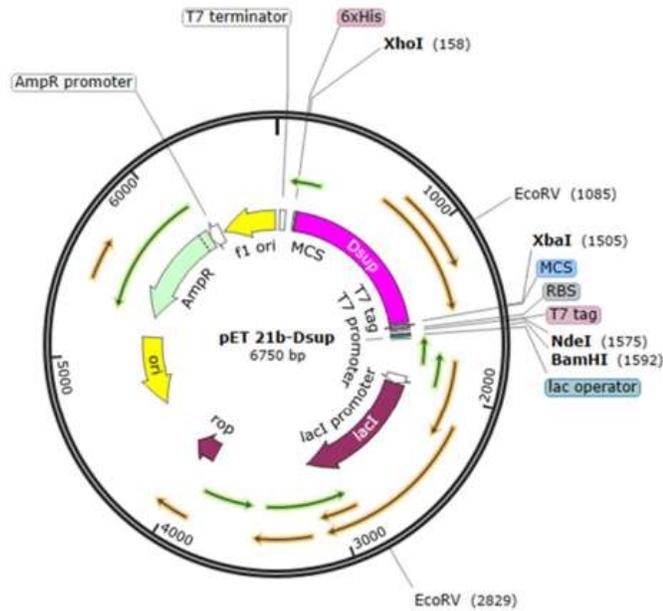


Figura 14. Construcción *in silico* del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG realizado utilizando el programa snapgene.

El vector pET21b-His6-Dsup-FLAG es un vector inducible. Tiene una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, así como un FLAG en el extremo C-terminal. Tiene clonada la secuencia codificante de la proteína *RvDsup* en el sitio de clonación múltiple, tiene un promotor *LacI*, resistencia a ampicilina y la secuencia está numerada por la convención pBR322, por lo que la región de expresión T7 está invertida en el mapa vectorial.

Se realizó la construcción *in silico* (figura 14), debido a que la secuencia de la construcción no fue otorgada. Tomando en consideración lo reportado por Kadonaga et al. 2021, en donde se utilizaron los sitios de restricción *XhoI* río arriba y *NcoI* río abajo de la secuencia codificante de la proteína *Dsup* para clonarlo en el vector pET-21b(+). Esta construcción *in silico* se utilizó como base para el siguiente paso que fue la construcción del plásmido pET21b (plásmido control).

Primero se realizó la caracterización del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG donado por Kadonaga et al. 2021 (Chavez et al., 2021). Se realizaron 3 restricciones, para verificar la presencia del inserto correspondiente a la proteína de interés. En la figura 15, se puede observar un gel de agarosa al 1%, la primera restricción con *BamHI* linealiza el plásmido y el fragmento migra al peso esperado de 6750 pb. La segunda restricción con *EcoRV* produce dos cortes, un corte dentro del plásmido dentro de la secuencia a la altura del promotor *LacI* y el otro corte lo realiza dentro de la secuencia codificante de la proteína *RvDsup*. Por último, la digestión con *XhoI* y *XbaI* libera un fragmento que pertenece a la secuencia codificante de la proteína y migro al tamaño esperado de 1365-pb. Este dato

corroboró la presencia de la secuencia codificante de la proteína de interés en el vector correspondiente.

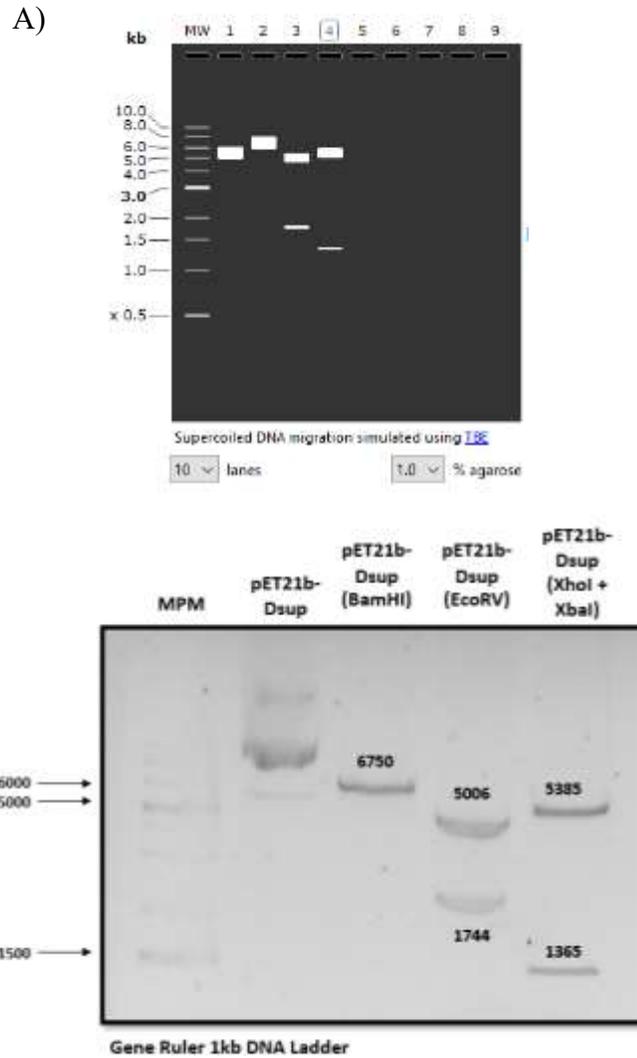


Figura 15. Verificación de identidad mediante digestiones del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG

Predicción de las digestiones *in silico* del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG utilizando el programa snapgene (A). Digestiones del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG. C1: marcador de peso molecular, C2: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG, C3: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG digerido con la enzima de restricción BamHI, C4: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG digerido con la enzima EcoRV, C5: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG digerido con las enzimas XhoI y XbaI. Gel de agarosa con TBE al 0.5x (B).

Posteriormente, se decidió corroborar mediante western blot la expresión de la proteína siguiendo el procedimiento ya descrito por Kadonaga et al 2021 (Chávez et al., 2021), en el cual se transformó en bacterias quimio competentes BL21-CP y se realizó una inducción de 2 horas con 0.4 mM de IPTG. Se puede observar que la proteína migra al peso ya reportado anteriormente, que es entre 50 kDa y 75 kDa, a pesar de que la proteína *RvDsup* tiene un peso molecular de 42kDa.

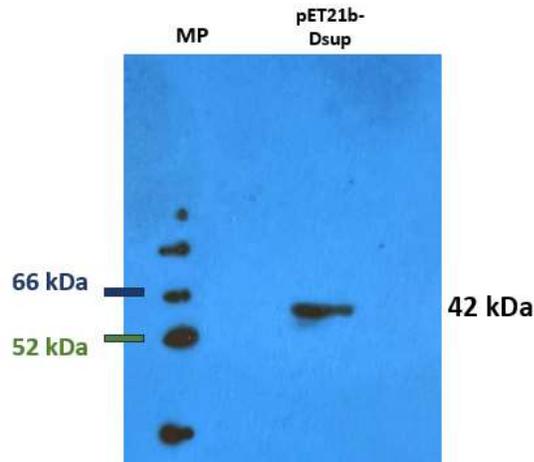


Figura 16. Expresión de la proteína *RvDsup* con 0.4 mM IPTG

Western Blot SDS-PAGE al 10% usando anti-His de anticuerpo primario y anti-mouse de anticuerpo secundario, en un cultivo inducido con 0.4 mM IPTG por 2 horas.

Con el objetivo de construir el plásmido pET21b (plásmido control) a partir de la predicción *in silico* se realizaron dobles digestiones con el fin de liberar la secuencia codificante de la proteína *RvDsup*.

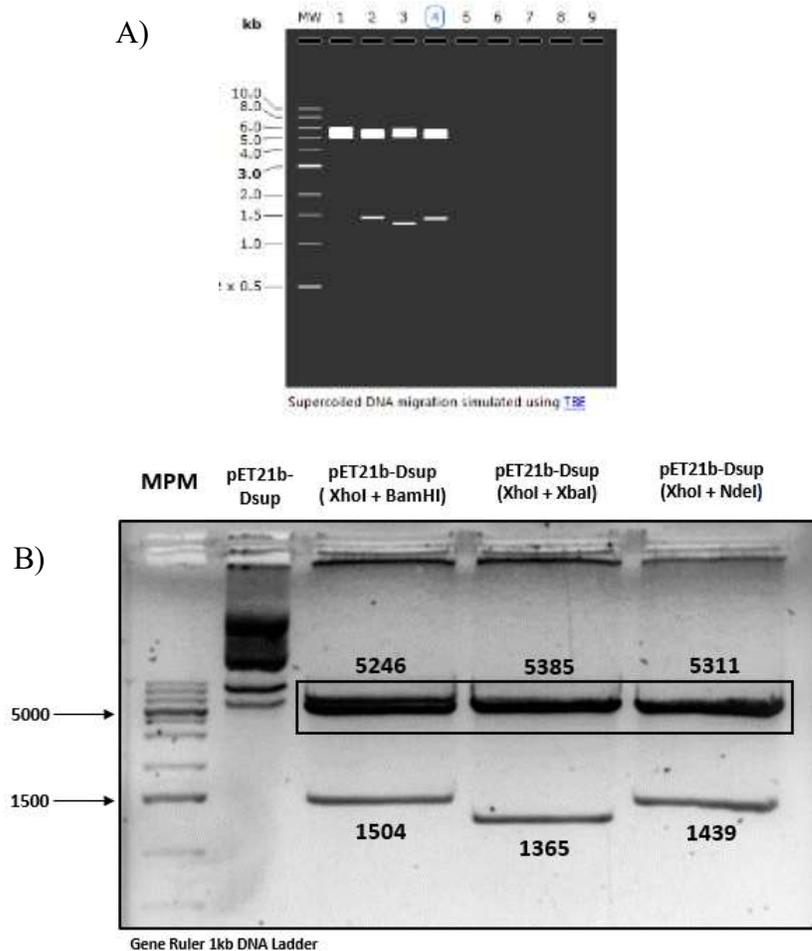


Figura 17. Liberación de la secuencia codificante de la proteína *RvDsup*.

Predicción de las digestiones realizadas para liberación de la secuencia codificante de *RvDsup* *in silico* del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG utilizando el programa snapgene (A). Digestiones del plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG. C1: marcador de peso molecular, C2: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG, C3: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG digerido con las enzimas de restricción XhoI y BamHI, C4: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG digerido con las enzimas XhoI y XbaI, C5: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG digerido con las enzimas XhoI y NdeI. Gel de agarosa con TBE al 0.5x.(B).

Se utilizó la enzima XhoI para realizar el corte río arriba de la secuencia y para el corte río abajo se utilizaron 3 enzimas; BamHI, XbaI y NdeI. Las tres digestiones liberaron el fragmento de interés de aproximadamente 5200 pb que sería el plásmido pET21b sin la secuencia codificante de la proteína *RvDsup* (figura 17). Al final se decidió solo cortar el fragmento liberado por la doble digestión de XhoI y XbaI que realizaban los cortes más cercanos a la secuencia de *RvDsup* debido a que río abajo de la secuencia se encontraba un sitio de unión ribosomal (RBS) correspondiente a un sitio necesario para la traducción de la proteína, secuencia que decidimos conservar en el plásmido control.

El fragmento de obtenido de 5385-pb fue purificado mediante electro-elución y se precipitaron. Para la ligación primero se realizó una reacción utilizando el fragmento precipitado, dnTps, buffer cutsmart y Klenow para un volumen de reacción total de 15  $\mu$ L. La reacción se incubo a 37  $^{\circ}$ C por 1 hora y posteriormente de desnaturalizo por 20 minutos a 75  $^{\circ}$ C. Para la reacción de ligación se le añadió 1  $\mu$ L de ligasa T4 y 3  $\mu$ L de buffer de ligasa T4, la reacción se quedó a temperatura ambiente de 12 a 16 horas. El producto de la ligación fue transformado en células quimio competentes DH5-alfa. Se obtuvieron colonias candidatas, y también se dejó un control de ligación para descartar que el producto pudiera religarse, el cual salió negativo, no se obtuvieron colonias.

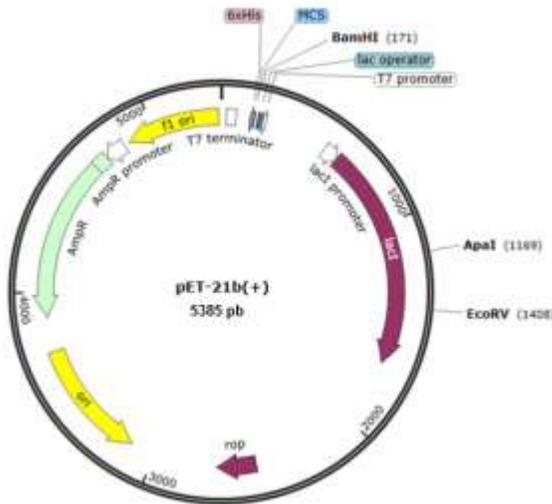


Figura 18. Construcción *in silico* del plásmido pET21b (plásmido control).

El vector pET21b es un vector inducible para la expresión N-terminal de proteína, así como un tag en el extremo C-terminal. Lleva una secuencia de T-7, tiene un promotor LacI, resistencia a ampicilina y la secuencia está numerada por la convención pBR322, por lo que la región de expresión T7 está invertida en el mapa vectorial.

Se construyó la predicción *in silico* del plásmido esperado pET21b (plásmido control), realizando una doble digestión con las enzimas XhoI y XbaI. El cual se obtiene un producto de aproximadamente 5385-pb (figura 18).

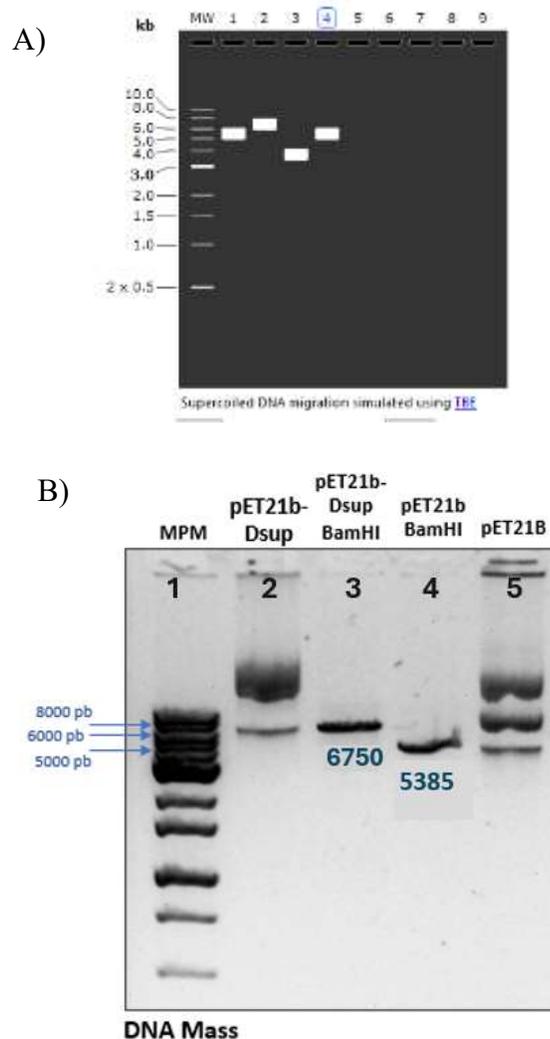
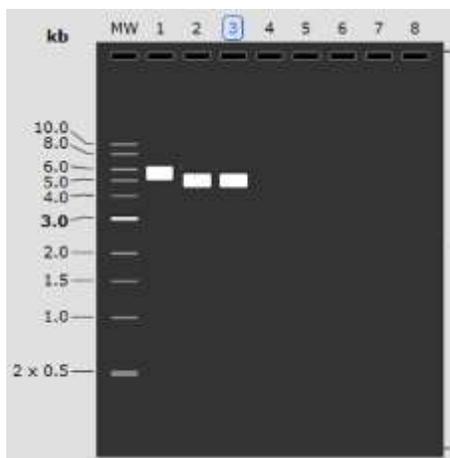


Figura 19. Análisis mediante digestiones del plásmido pET21b.

Predicción *in silico* de las digestiones con la enzima BamHI con el DNA de los plásmidos pET21b-His6-Dsup-FLAG y pET21b utilizando el programa snapgene (A). Análisis de pET21b C: Marcador de peso molecular, C:2 DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG, C3: DNA pET21b-His6-Dsup-FLAG digerido con BamHI, C:4 DNA pET21b digerido con BamHI, C:5 DNA pET21b. Gel de agarosa con TBE al 0.5x. (B).

Se analizaron las colonias obtenidas mediante restricciones, se utilizó la enzima BamHI que realiza un corte río debajo de la zona de ligación. Al analizar las colonias una de ellas migro al peso esperado de aproximadamente 5385 pb. En el gel de agarosa al 1% se puede observar que hay una diferencia de más de 1000 pb entre el producto de la restricción generado por el plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG en comparación con una colonia con plásmido linealizada (figura 19). Por lo cual se concluyó que mediante restricciones concuerda con lo esperado del plásmido pET21b (plásmido control).

A)



B)

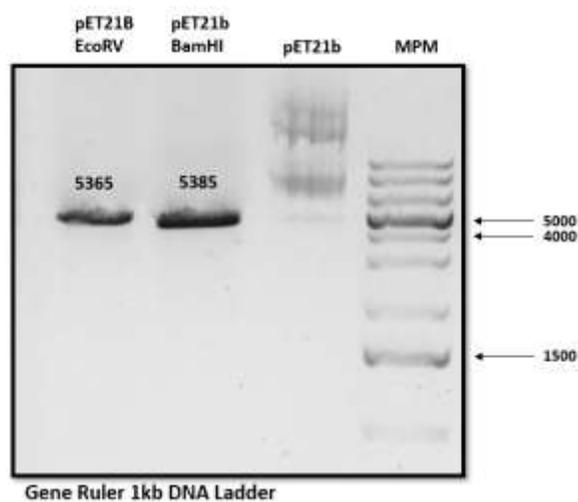


Figura 20. Verificación de identidad mediante digestiones del plásmido pET21b

Predicción de las digestiones *in silico* del plásmido pET21b utilizando el programa snapgene (A). Digestiones del plásmido pET21b. C1: DNA pET21b digerido con EcoRV, C2: DNA pET21b digerido con BamHI, C3: DNA pET21b, C4: marcador de peso molecular. Gel de agarosa con TBE al 0.5x (B).

Se realizó la caracterización del plásmido pET21b obtenido del producto de ligación en el cual se le realizaron digestiones para verificar la ausencia del inserto de la proteína RvDsup. En la figura 20, se puede observar un gel de agarosa al 1% en la primera restricción, BamHI linealiza el plásmido, el fragmento corre al peso esperado de 5365 pb. La segunda restricción con EcoRV solo produce un corte dentro del plásmido a la altura del promotor LacI. Estas restricciones nos confirman el tamaño esperado del plásmido pET21b, así como la ausencia de la secuencia codificante de la proteína de interés.

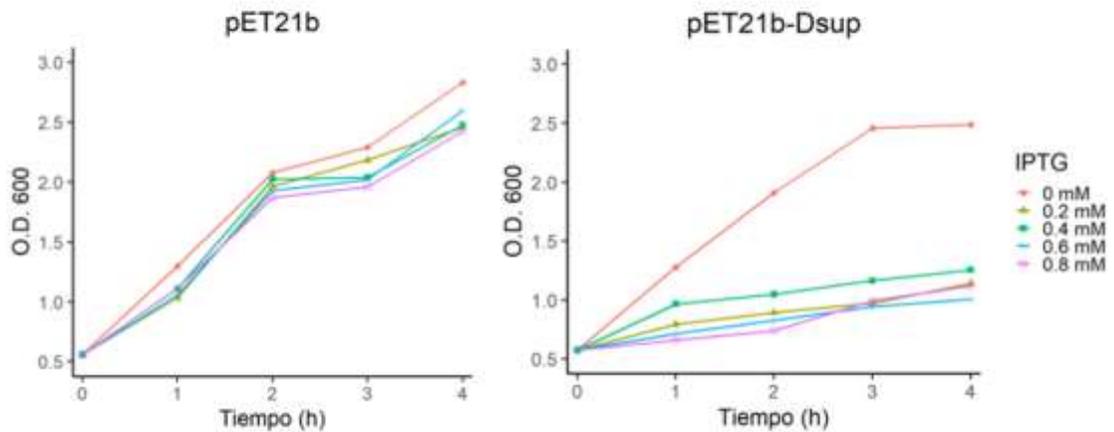


Figura 21. Efecto de la sobre expresión de *RvDsup* en la OD<sub>600</sub> vs tiempo.

Medición de OD<sub>600</sub> a cada hora de *E. coli* BL21-CP transformadas con pET21b-His6-Dsup-FLAG y pET21b como control, sometidos a concentraciones crecientes de IPTG durante 4 horas.

En las lecturas de la OD<sub>600</sub>, el plásmido control pET21b en BL21-CP tiene el mismo comportamiento de crecimiento aun con las concentraciones crecientes de inducción con IPTG. En cuanto a las BL21-CP que expresan la proteína *RvDsup* con la mínima cantidad de IPTG, vemos una disminución significativa del crecimiento, y este comportamiento se repite en todas las condiciones donde se aumentó la inducción con IPTG. Por lo cual, la sobreexpresión de la proteína *RvDsup* es toxica para la bacteria. Debido a esto se decidió no utilizar IPTG y solo contar con la expresión basal de la proteína debido a la fuga transcripcional.

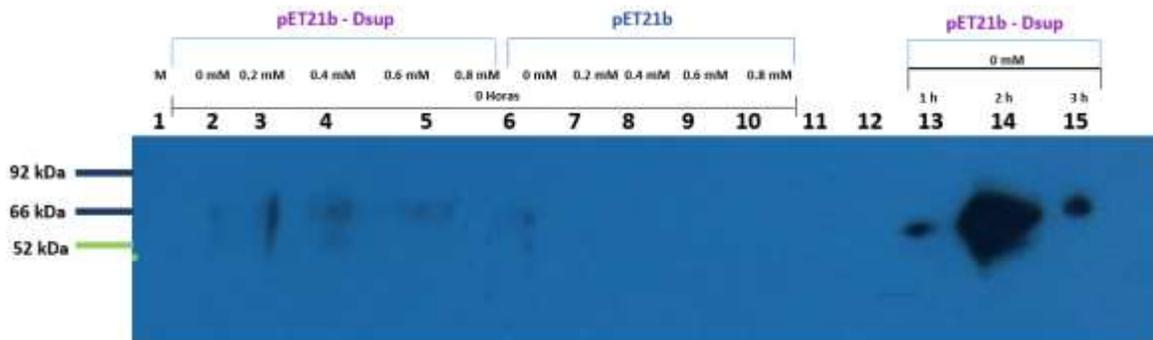
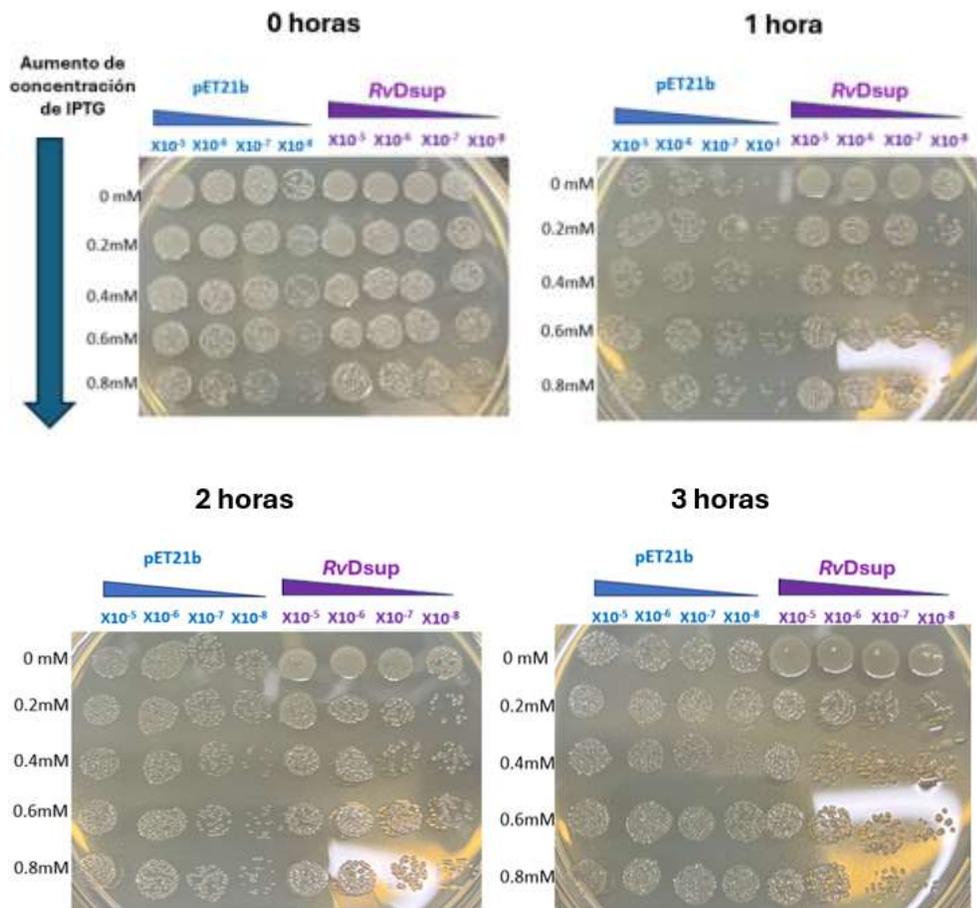


Figura 22 Western Blot de la expresión de *RvDsup* con y sin IPTG.

Western Blot SDS-PAGE al 10% usando anti-His, en cultivos inducidos con IPTG y sin inducir. Las 0 horas corresponde al tiempo en el cual se ajustó la OD<sub>600</sub>=0.5 y se añadió el IPTG en los cultivos correspondientes.

Por otro lado, se corroboró la fuga transcripcional de la proteína *RvDsup* mediante un western blot en SDS-PAGE al 10%, utilizando un anticuerpo dirigido contra el tag de histidinas en el amino terminal de la proteína de interés, en ambas condiciones (con y sin IPTG). Se observó que hay una expresión de *RvDsup* que migra a la altura esperada de entre 52 kDa y 66 kDa desde la hora cero, en todas las condiciones tanto no inducido como inducido con IPTG, así como un incremento de la expresión de la proteína a cada hora. Se observa una mayor expresión a las 2 horas en el western blot, sin embargo, esto es debido a que para poder tener una cantidad suficiente de proteína se debe de concentrar aproximadamente 5 ml de cultivo bacteriano, lo cual vuelve la muestra muy viscosa y difícil de manejar por lo cual en el carril 14 en la figura 22, se pudieron haber juntado parte de las muestras del carril 13 y 15.



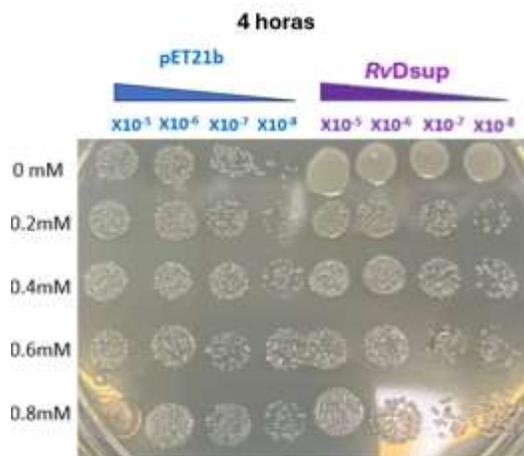


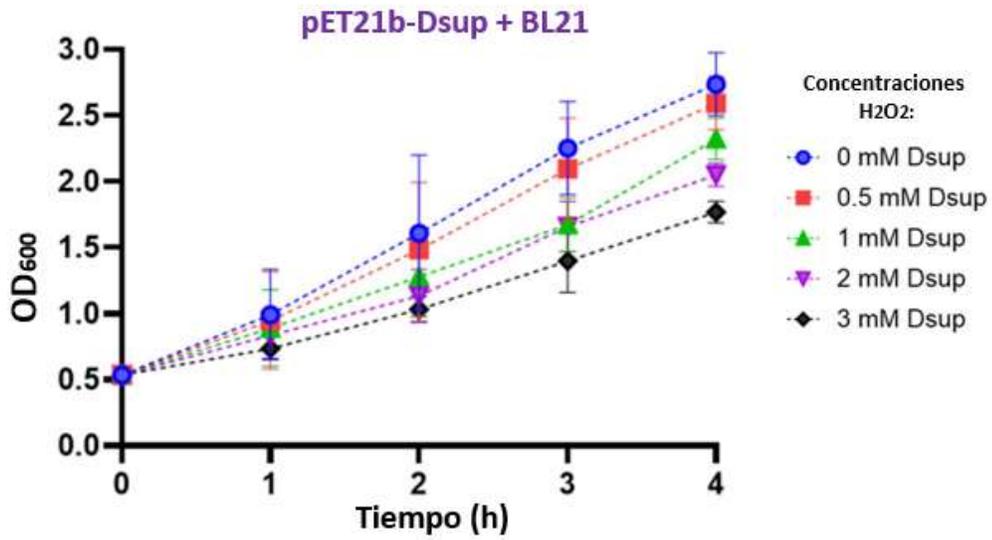
Figura 23. Toxicidad de *RvDsup* en *E. coli* BL21-CP en concentraciones crecientes de IPTG.

Goteo de cultivos *E. coli* BL21-CP transformadas con pET21b-His6-Dsup-FLAG y pET21b como control, sometidos a concentraciones crecientes de IPTG durante 4 horas. De lado izquierdo de la figura se muestra el aumento de IPTG desde 0 mM hasta 0.8 mM. Se gotearon las diluciones desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-8}$  para ambas bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes.

Para complementar el comportamiento ya visto en la figura 21, en donde hay una gran diferencia en cuanto al crecimiento bacteriano, al analizar viabilidad mediante crecimiento bacteriano de diluciones de estas muestras (colocando 10  $\mu$ l) y ver su recuperación 16 horas post inducción no se observan cambios significativos respecto al resultado obtenido la figura 21. Las colonias en ambas condiciones crecen de manera similar.

Para identificar si *RvDsup* contrarresta el estrés oxidativo, se hicieron cultivos de *E. coli* BL21-CP transformadas con pET21b-His6-Dsup-FLAG y pET21b como control, los cuales fueron sometidos a tratamientos con concentraciones crecientes de peróxido de hidrogeno (0, 0.5, 1, 2 y 3 mM). Los resultados de las lecturas de OD<sub>600</sub> fueron graficados cada hora por 4 horas de estudio (figura 24), a los cuales se le realizó una t de student por hora entre el grupo control y el grupo de interés de acuerdo con la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada. Los datos mostraron que a dosis crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> existe una menor lectura de OD<sub>600</sub>, tanto para el control como para el grupo de interés lo cual indica que dicho compuesto afecta el crecimiento bacteriano. Las bacterias transformadas con pET21b-His6-Dsup-FLAG muestran mayor sobrevivencia respecto al control en todas las concentraciones.

A)



B)

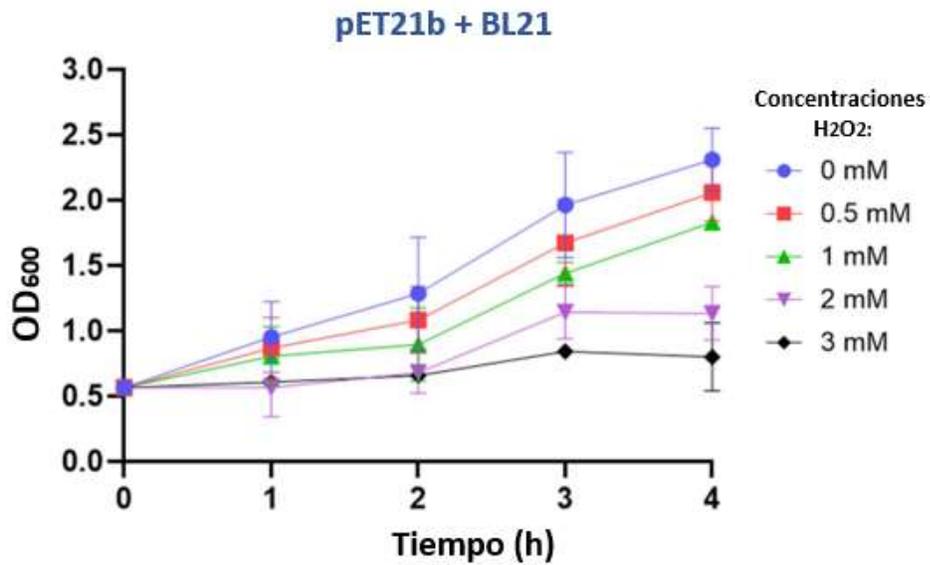


Figura 24. Efecto de un ambiente oxidativo en *E.coli* BL21 CP en presencia y ausencia de RvDsup (OD<sub>600</sub> vs tiempo).

Curva de tolerancia bacterias *E.coli* BL21 CP transformadas con el plásmido pET21b (control) con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A). Curva de tolerancia bacterias *E.coli* BL 21 CP transformadas con el plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B).

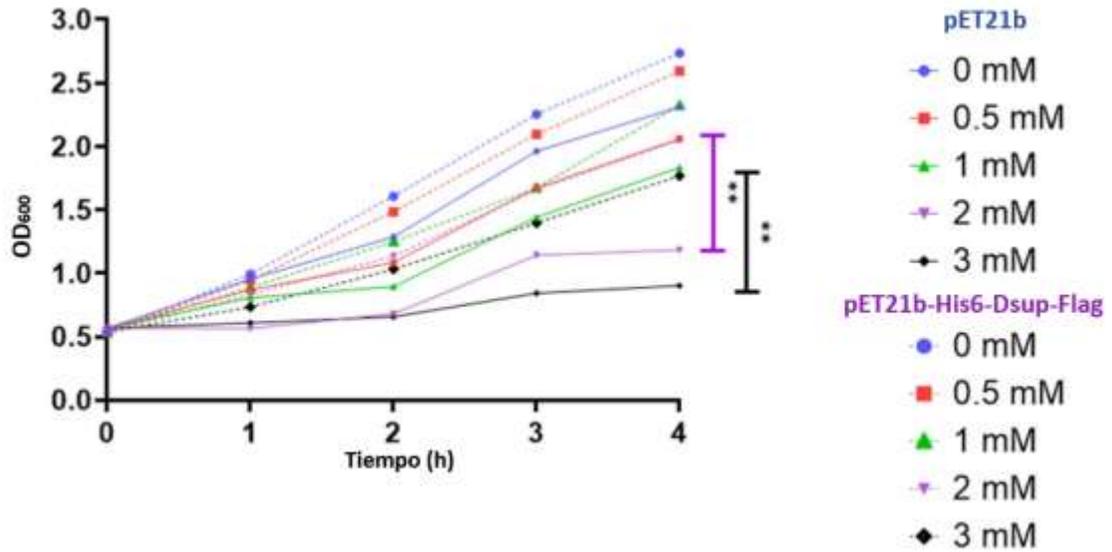


Figura 25. Curva de tolerancia bacteriana vs el tiempo en presencia de la proteína *RvDsup* ante un ambiente oxidativo generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

n=3, \*\*P>0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos indicados por la prueba t de student

Este comportamiento es más evidente al unir ambas graficas en donde se observa lo antes ya mencionado que las bacterias BL2-CP tienen una mayor fracción sobreviviente en todas las condiciones en comparación con el control. Sin embargo, la mayor diferencia estadísticamente significativa se encuentra en las concentraciones 2 y 3 mM a las 4 horas con respecto al control como se muestra en la figura 25. Sin embargo, para las concentraciones de 0, 0.5 y 1 mM no se observó diferencia significativa entre el grupo control y el que expresa la proteína *RvDsup*.

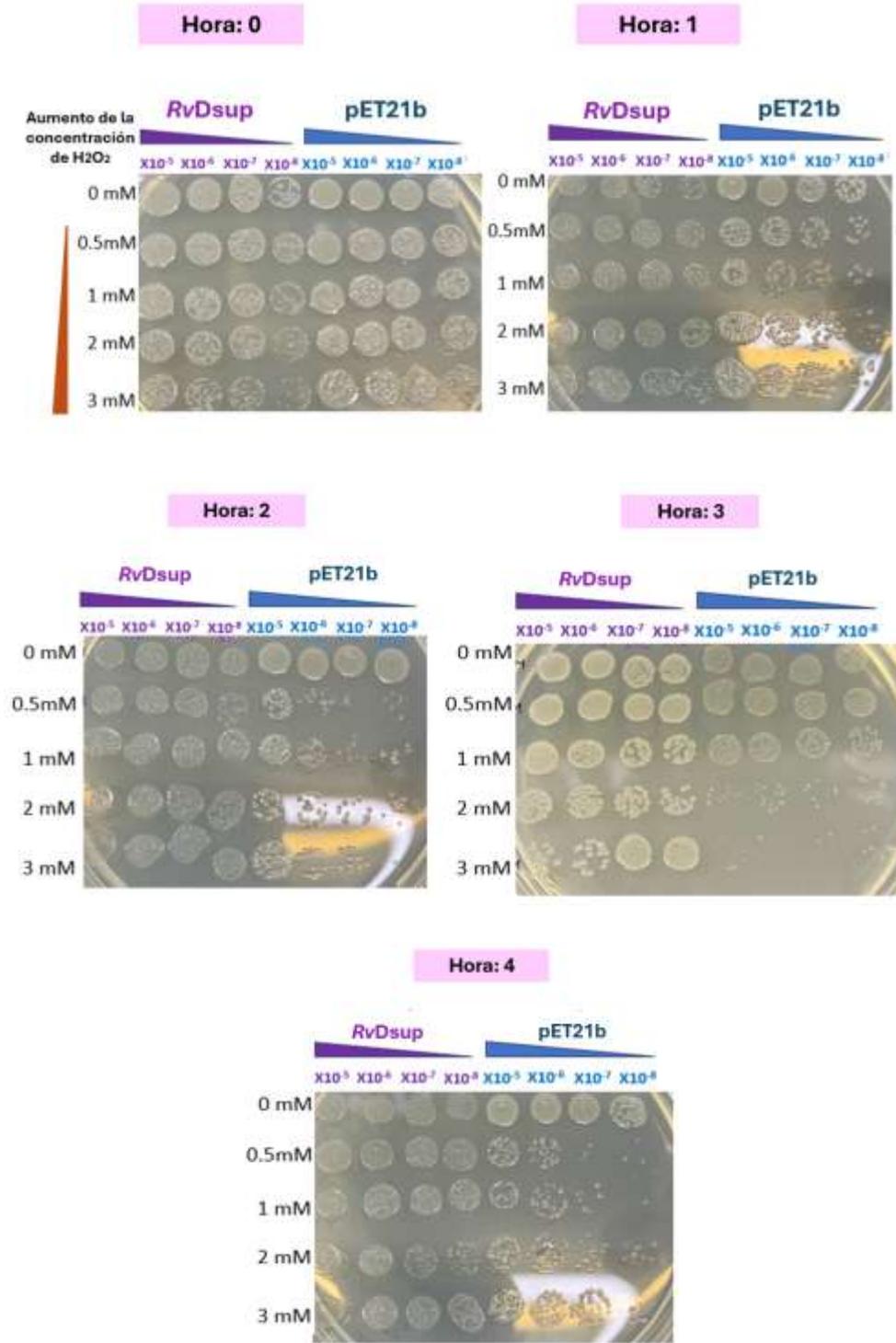


Figura 26. Tolerancia de *E. coli* transformadas con pET21b-His6-Dsup-FLAG y pET21b (control) ante un ambiente oxidativo.

Goteo de diluciones de cultivos de *E. coli* BL21-CP transformadas con pET21b-His6-Dsup-FLAG y pET21b como control, sometidas a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 4 horas.

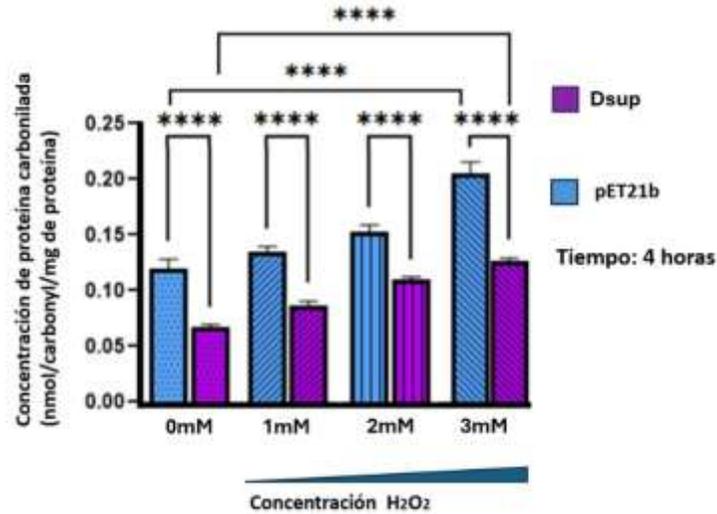


Figura 27. Niveles de carbonilación de proteínas en presencia y ausencia de *RvDsup*.

Los niveles de proteínas carboniladas de cultivos de *E.coli* BL21-CP transformadas con pET21b-His6-Dsup-FLAG y pET21b como control, sometidas a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 4 horas.

n=3, \*\*\*\*P>0.05 indica una diferencia significativa entre los grupos indicados por la prueba t de Student

Se midieron las concentraciones de carbonilación de proteínas utilizando un kit de Sigma-aldrich (MAK094). La carbonilación de proteínas fue medida a las 4 horas posteriores al daño con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En donde se puede observar una menor concentración de proteínas carboniladas en presencia de *RvDsup* en todas las condiciones posterior al daño inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con el control pET21b.

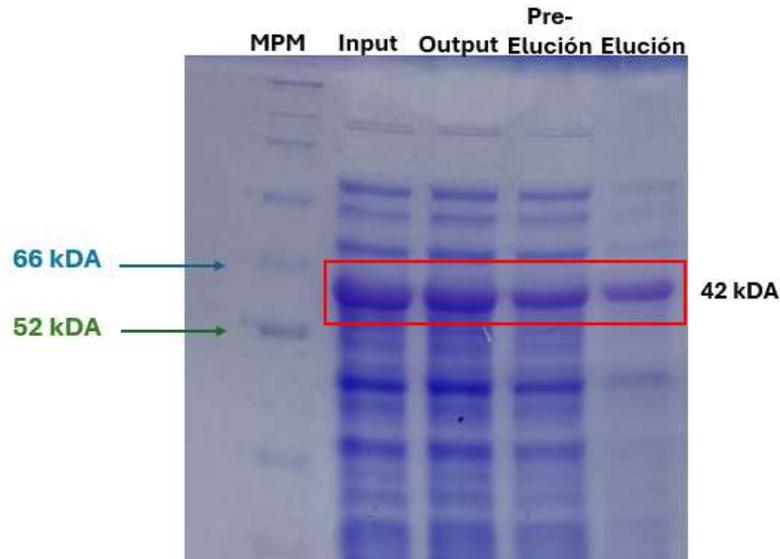


Figura 28. Purificación y enriquecimiento de la proteína recombinante *RvDsup* utilizando una columna de agarosa níquel.

SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie, donde se señala el enriquecimiento de *RvDsup* (recuadro en rojo). C1: Marcador molecular de proteínas. C2: Proteína total previo al paso por la columna de agarosa Ni-NTA (Input). C3: Proteína total no unida después del paso por la columna de agarosa Ni-NTA (Output). C4: Proteínas recuperadas después de la pre-elución. C5: Proteínas recuperadas después de la elución.

Se purifico la proteína utilizando un método modificado de purificación no desnaturalizante ya reportado por Kadonaga y colaboradores (Chavez et al. 2021). Se logro obtener una buena extracción, purificación y concentración de la proteína, de la proteína *RvDsup* utilizando las perlas de His Pur Ni-NTA Superflow Agarose (ThermoScientific). Así, la proteína con el tag de histidinas se adhiere a la perla de agarosa, lo que permitió eliminar mediante lavados aquellas proteínas que no se unieron de forma específica. Finalmente, la proteína unida a las perlas fue eluida mediante condiciones no desnaturalizantes y se analizó por electroforesis SDS-PAGE al 10%, donde fue posible identificar la presencia de una banda que migra aproximadamente entre 52 kDa y 66 kDa (carril referido como elución), la cual corresponde a *RvDsup* en la figura 28.

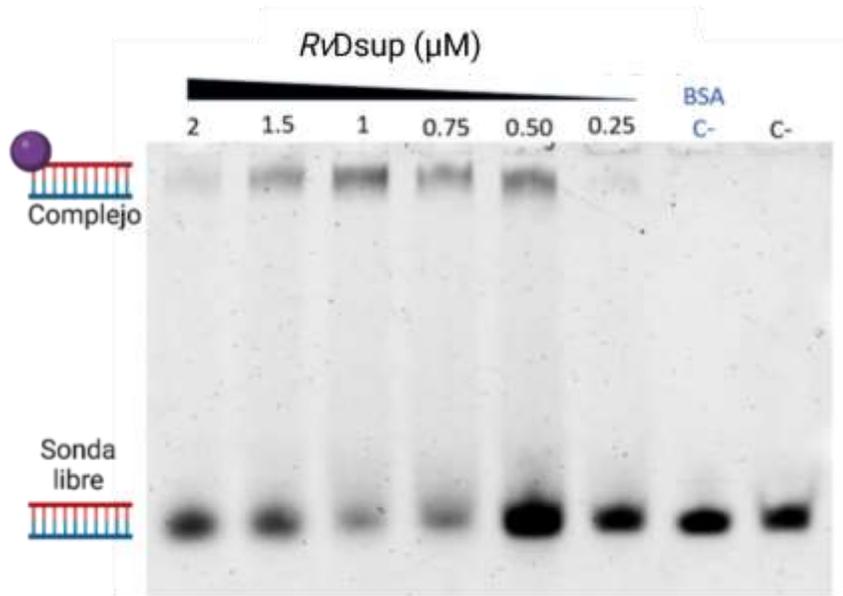


Figura 29. Ensayo de cambio de movilidad electroforética con dsDNA

Ensayo de cambio de movilidad electroforética aumentando la concentración de la proteína *RvDsup*, utilizando 5 pmol de sonda de cadena doble marcada en el extremo 5' con fluoresceína en un gel no desnaturante al 4%. Carriles de C: 1 a C:6 concentraciones descendentes de proteína *RvDsup* 0.25 a 2  $\mu\text{M}$ . C:7 control negativo, sonda con proteína BSA, C:8 control negativo sonda sin proteína.

Se realizó una curva de concentración de proteína con la sonda de DNA de doble cadena (dsDNA), en el cual se obtuvo que había unión entre el DNA no cromatinizado (22-pb) y la proteína *RvDsup* en concentraciones bajas de esta misma por lo cual se utilizaron concentraciones crecientes entre 0.25 a 2  $\mu\text{M}$ . En los controles se observa la sonda de 22-pb marcadas con amidita de fluoresceína en el extremo 5', al ir incrementando la concentración de proteína disminuye la sonda libre y se ve la formación del complejo cerca del pozo. Sin embargo, al llegar a la concentración de 2  $\mu\text{M}$  empieza a desaparecer el complejo, lo cual indicaría que la proteína *RvDsup* se puede agregar y ya no entra al pozo, aunque se una a DNA.

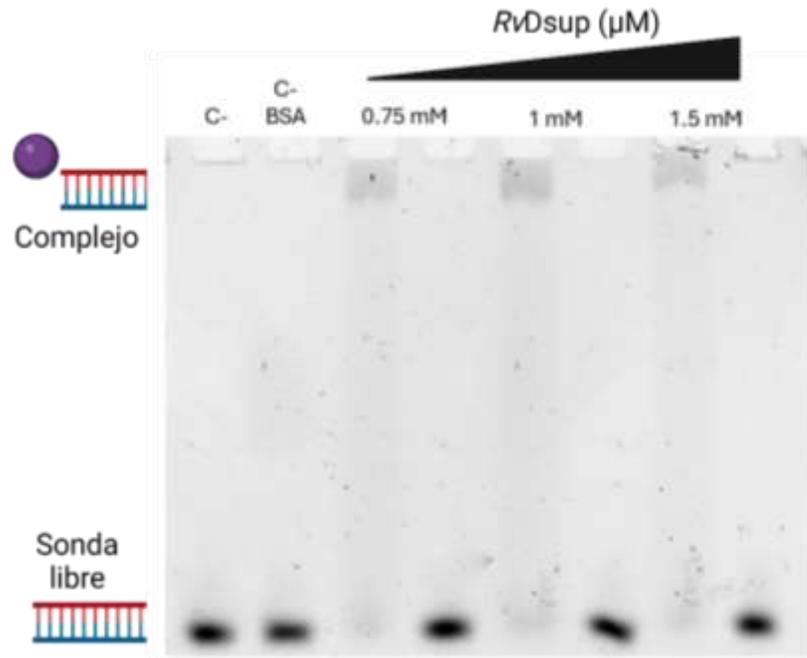


Figura 30. Ensayo de cambio de movilidad electroforética con dsDNA.

Ensayo de cambio de movilidad electroforética utilizando 5 pmol de sonda de cadena doble marcada en el extremo 5' con fluoresceína, así como 500 pmol de la misma sonda sin marca de fluoresceína en un gel no desnaturizante al 4%. Carriles de C1: control negativo solo sonda, C2: control negativo sonda con proteína BSA. C3, C5 y C7 concentraciones crecientes de proteína con 5 pmol de sonda marcada. C4, C6 y C8 concentraciones crecientes de proteína, con 5 pmol de sonda marcada, así como 500 pmol de sonda no marcada (competencia).

Para descartar o corroborar la especificidad, se realizó un ensayo de competencia, en el cual se utilizó la misma sonda sin la marca de fluoresceína en el extremo 5' incrementada 100 veces su concentración respecto de la sonda marcada. En los carriles 3, 5 y 7 se observa la disminución de la sonda libre marcada y la formación del complejo cercano a los pozos al incrementar la concentración de la proteína. Al utilizar la sonda fría en los carriles 4, 6 y 8 observamos las bandas de la sonda libre iguales a los controles y no se observa la formación del complejo, por lo cual *RvDsup* se une al dsDNA de manera específica.

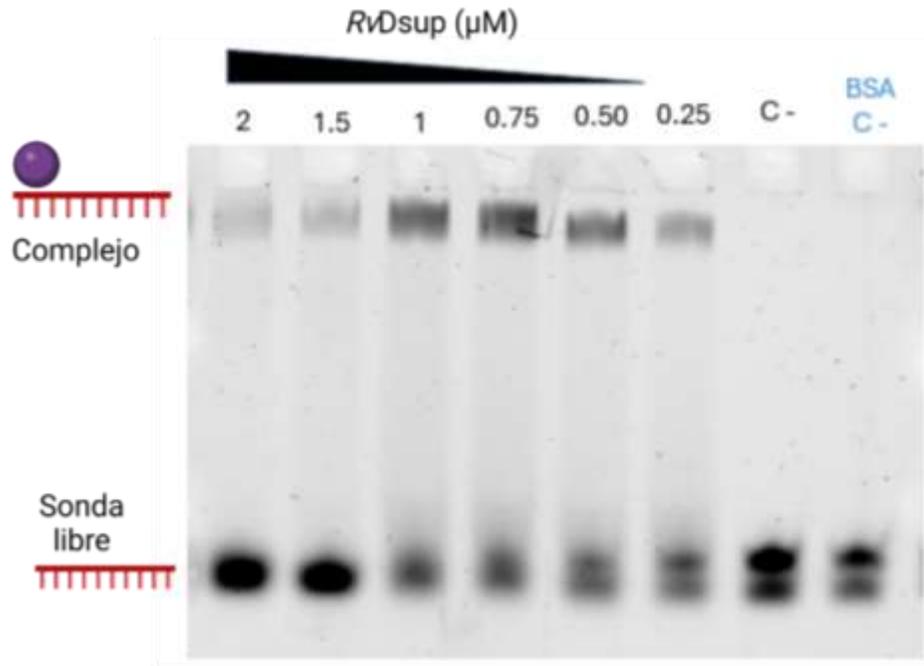


Figura 31. Ensayo de cambio de movilidad electroforética con ssDNA

Ensayo de movilidad electroforética aumentando la concentración de la proteína *RvDsup*, utilizando 5 pmol de sonda Fw de cadena sencilla marcada en el extremo 5' con fluoresceína en un gel no desnaturizante al 4%. Carriles de C: 1 a C:6 concentraciones descendentes de proteína *RvDsup* 0.25 a 2  $\mu$ M. C:7 control negativo sonda sin proteína, C:8 control negativo sonda con proteína BSA.

Se pre corrió la sonda sencilla en el cual se observó la formación de dos estructuras de cadena sencilla. Se realizó una curva de concentración de proteína con la sonda fluoresceína, en el cual se obtuvo que había unión entre el ssDNA y la proteína *RvDsup* en concentraciones bajas de esta misma por lo cual se utilizaron concentraciones crecientes entre 0.25 a 2  $\mu$ M. En los controles se observa la sonda de 22-pb marcadas con fluoresceína en el extremo 5', al ir incrementando la concentración de disminuye la cantidad de sonda libre y se ve la formación del complejo cercana al pozo, indicando que la proteína *RvDsup* se une también a DNA de cadena sencilla. Sin embargo, al llegar a la concentración de 1  $\mu$ M empieza a desaparecer el complejo, lo cual indica que *RvDsup* se agrega y ya no entra al pozo.

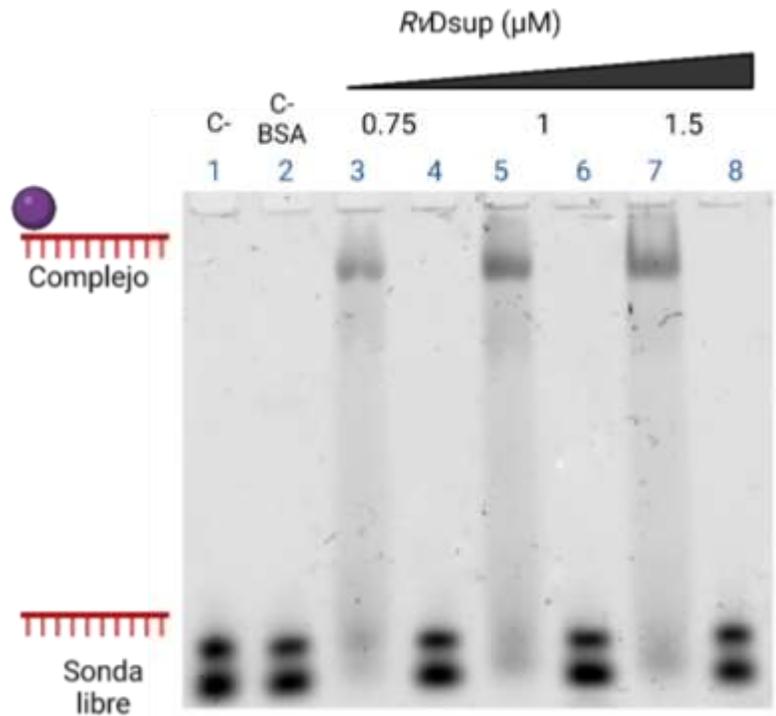


Figura 32. Ensayo de competencia de la proteína *RvDsup* con ssDNA

Ensayo de cambio movilidad electroforética utilizando 5 pmol de sonda Fw de cadena sencilla marcada en el extremo 5' con fluoresceína, así como 500 pmol de sonda fw sin marca de fluoresceína en un gel no desnaturizante al 4%. Carriles de C1: control negativo solo sonda, C2: control negativo sonda con proteína BSA. C3, C5 y C7 concentraciones crecientes de proteína con 5 pmol de sonda marcada. C4, C6 y C8 concentraciones crecientes de proteína, con 5 pmol de sonda marcada, así como 500 pmol de sonda no marcada (competencia).

Se realizó un ensayo de competencia, en el cual se utilizó el mismo oligo Fw utilizado en la figura 29 sin la marca de fluoresceína en el extremo 5' en una proporción 100 veces mayor que la concentración de la sonda marcada. En los carriles 3, 5 y 7 se observa la disminución de la sonda libre marcada y la formación del complejo cercano a los pozos al incrementar la concentración de la proteína, por lo cual *RvDsup* también se une a cadena sencilla. Al utilizar la sonda fría en los carriles 4, 6 y 8 observamos las bandas de la sonda libre iguales a los controles y no se observa la formación del complejo, por lo cual *RvDsup* se está uniendo al DNA de cadena sencilla de manera específica.

## 9. Discusión

La proteína Dsup del tardígrado *Ramazzottius Varieornatus* es un gen que consta de 1350-pb, y cuya proteína apenas está siendo estudiada tanto en *Ramazzottius* como en células eucariotas, por lo tanto, en nuestro grupo de investigación se decidió estudiar la actividad antioxidante de proteína en un modelo procariota porque su DNA no cuenta con nucleosomas. Se realizó un análisis bioinformático de la proteína *RvDsup*, así como un alineamiento con una proteína con homología estructural *HeDsup* (Mínguez-Toral, 2020). Las proteínas de los organismos extremófilos son altamente desordenadas, sin embargo, ambas proteínas al realizar el alineamiento de estas mismas muestran un sitio de homología estructural. En la figura 13 se observa una zona en rosa en donde en esta región el super enrollamiento es muy similar entre ambas proteínas, en *RvDsup* es continuo y en la *HeDsup* esta zona esta discontinua. Las estructuras terciarias no son tan similares, pero en ambas se encontró un dominio de unión similar a la proteína HMGN, esta proteína es muy importante en eucariotas son proteínas con unión al nucleosoma y ayudan en diversos procesos como la transcripción, replicación, recombinación y vías de reparación del DNA (Greigner, 2016) Para verificar la correcta expresión de la proteína *RvDsup* mediante western blot se utilizaron las condiciones ya establecidas Kadonaga y colaboradores, en el cual podemos observar en la figura 16, que mientras la proteína es de un tamaño de aproximadamente 42kDa, migra a una altura de entre 52 y 66 kDa. Esta diferencia de tamaño que se observa en un gel no desnaturalizante es debido a que muchas proteínas de tardígradas son desordenadas, así como también son solubles en calor, lo que significa que pueden permanecer en solución incluso cuando se hierven, mientras que la mayoría de las otras proteínas se desnaturalizan, se agregan y precipitan fuera de la solución, esto les ayuda a soportar cambios de temperatura y necesarias y suficientes para mediar tolerancia natural e inducida varias formas de estrés ambiental (Hesgrove, 2020) (Hibshman, 2017). Las proteínas intrínsecamente desordenadas exhiben una estructura compleja y en parte esto se debe a que están enriquecidas en residuos cargados y que alteran la estructura como lo son prolina, alanina y glicina. Por otro lado, estas proteínas desordenadas se agotan en residuos hidrófobos y aromáticos y también poseen menos residuos de cisteína y aspargina, que son denominados colectivamente como "aminoácidos promotores del orden" por lo cual esta característica de proteínas

desordenadas pudiera causar una disminución de la movilidad a través del gel no desnaturalizante (Habchi, 2014). La proteína *RvDsup* está compuesta principalmente por alanina (16.2%), Glicina (15.5%) y Serina (17.8%), mientras que no tiene ninguna cisteína en su secuencia aminoacídica y solo un 6.5% de asparragina. Por lo cual, si se utilizara un gel desnaturalizante, la proteína migraría a la altura esperada de 42 kDa. Para alcanzar los objetivos planteados acerca de la viabilidad y crecimiento bacteriano, se decidió utilizar la cepa *E. coli* BL21 CP, debido a que es deficiente de proteasas Lon, que producen la degradación de proteínas ajenas al organismo, así como de proteasas OmpT, cuya función es degradar proteínas extracelulares (Rosano & Ceccarelli, 2014), y a su vez tienen una elevada capacidad de sobre expresión de proteínas recombinantes, debido a que limitan la traducción de las proteínas recombinantes de interés, favoreciendo la sobre expresión (Kaur, 2018). Se llevo a cabo el ensayo para poder descartar que la sobreexpresión de *RvDsup* fuera toxica para la bacteria ya que esto no había sido determinado antes (James, 2021). En la figura 21 podemos observar que al realizar una medición del crecimiento bacteriano cuando *RvDsup* está siendo sobre expresado hay un menor crecimiento bacteriano en comparación tanto con la curva de crecimiento del vector control (pET21b), cuál indicó que esta proteína sobre expresada es tóxica para la bacteria, lo cual se ha observado previamente para otras proteínas. Al sobre expresar una proteína recombinante en *E.coli* se pueden formar cuerpos de inclusión (IB) que son paquetes compuestos de proteína desnaturalizada inactiva e insoluble, resistentes a proteasas lo cual causa una disminución en el crecimiento bacteriano normal (Pouresmaeil., 2023). Resultó interesante observar que obtuvimos una buena cantidad de proteína expresada en condiciones sin IPTG (figura 22). Estas observaciones nos permitieron confirmar no solo que *RvDsup* sobre expresada es tóxica para la bacteria, si no que, contrariamente a lo esperado con el uso del sistema pET21b, había una gran cantidad de fuga transcripcional, por lo cual se tomó la decisión de prescindir del uso del inductor IPTG. Es importante mencionar que el termino de proteína tóxica se le es otorgado a las proteínas que sobre expresadas en alguna cepa de *E.coli* causan la muerte del cultivo durante la inducción por lo cual seri considerada como moderadamente toxica (Saïda, 2007). Así como *RvDsup* al ser sobre expresado en *E.coli* puede estar afectando procesos vitales como la replicación por lo cual vemos una disminución en el crecimiento

bacteriano (Riber et al, 2016). El plásmido pET21b favorece la fuga transcripcional, a su vez también promueve los altos niveles de transcripción y traducción (Kaur et al., 2018), lo cual presenta un reto al sobre expresar proteínas que son tóxicas para las bacterias. Al expresar una proteína tóxica, esta causa una disminución en la tasa de crecimiento generando inestabilidad lo cual causa una disminución en el nivel metabólico de la bacteria (Rosano & Cecarelli, 2014). Debido a esto en la figura 21, se puede observar una disminución significativa en todas las condiciones en donde se usó el plásmido pET21b-His6-Dsup-FLAG y se indujo con IPTG. Las bacterias que expresan la proteína RvDsup tienen una disminución en la cantidad de proteínas carboniladas en comparación con el control. Al haber una disminución de estas proteínas significa que las proteínas siguen activas y no están perdiendo su actividad funcional, por lo cual esto se puede observar en una mejora en la viabilidad y crecimiento bacteriano (Akagua., 2021). Una característica de las proteínas con actividad antioxidante es que tienen un gran porcentaje de cisteínas, el grupo tiol de las cisteínas este asociado con la actividad antioxidante. En una menor escala los residuos de tirosina, triptófano, histidina y arginina también contribuyen a la actividad antioxidante de las proteínas (Kut., 2023). La proteína RvDsup no tiene cisteínas ni triptófano, pero este compuesto aproximadamente en un 4% por histidinas y argininas. La proteína TCTP de *Brugia malayi* que ya fue reportada con actividad antioxidante tiene una composición es de aproximadamente 10% de histidinas, argininas y tirosina, ya que solo tiene una cisteína y carece de triptófano (Ricci., 2021). Por lo cual a pesar de que RvDsup tenga muy poca composición de estos aminoácidos tiene una actividad antioxidante ya que disminuye los niveles de carbonilación y no solo protege al DNA como barrera física. Previamente ya se reportó que RvDsup tiene afinidad hacia el nucleosoma, y debido a que este está compuesto por DNA e histonas, se decidió realizar ensayos de cambio de movilidad electroforética. Estos ensayos son un método de detectar interacciones de DNA desnudo con proteína (Hellman et al., 2007). Las células procariotas no tienen nucleosomas, pero tienen proteínas H-NS que son denominadas proteínas similares a las histonas, en las bacterias estas proteínas se encargan de estructurar el DNA, así como de la regulación y transcripción (Grainger., et al 2016). Al realizar estos ensayos en DNA obtuvimos que la proteína RvDsup forma un complejo con la sonda de 22-pb a bajas concentraciones de proteína en un gel no desnaturante al 4% de acrilamida, y

como este DNA esta ausente de cualquier tipo de histonas, esto indica que *RvDsup* se une a DNA desnudo. Para determinar si esta unión es específica, se realizó una competencia con una sonda con la misma secuencia (100X) pero sin etiqueta, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, interesantemente los resultados reportan que la interacción es específica lo cual puede abrir lugar para especular que esta proteína puede tener interacción con algún factor de reparación del ADN. Interesantemente, para los ensayos de DNA se observa que en la sonda hay dos bandas, las cuales se las atribuimos a que el DNA de cadena sencilla está formando dos estructuras terciarias, y que *RvDsup* tiene afinidad por alguna de ellas por eso al incrementar la concentración de la proteína solo una de las bandas de la sonda desaparece. Por consiguiente, la proteína *RvDsup* tiene funciones como agente antioxidante, así como afinidad al DNA y DNA(SS), no solo funciona como un protector físico sino protege en ambientes oxidativos a la célula.

## 10. Conclusiones

- I. La sobre expresión de la proteína *RvDsup* es toxica en bacterias, por lo cual la expresión basal derivada de la fuga transcripcional es suficiente para contrarrestar el efecto oxidante.
- II. La proteína *RvDsup* protege del estrés oxidativo a *E. coli* BL21-CP a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- III. *RvDsup* posee una actividad antioxidante en bacterias mostrado en una reducción en los niveles de carbonilación de proteínas.
- IV. La proteína *RvDsup* se une a DNA(DS) y DNA(SS).

## 11. Perspectivas

- I. Etiquetar la proteína *RvDsup* y ver si está involucrada en alguna vía de reparación del DNA.
- II. Determinar el posible mecanismo de acción de *RvDsup* como agente antioxidante.
- III. Identificar la interacción con otras proteínas en el tardígrado o modelos eucariotas.
- IV. Elucidar la función de la unión con DNA (DS) y DNA (SS).

## 12. Bibliografia

1. Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang GM, Choi HY, Cho SG. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 10;18(1):120. doi: 10.3390/ijms18010120. PMID: 28075405; PMCID: PMC5297754.
2. Arakawa K. Examples of Extreme Survival: Tardigrade Genomics and Molecular Anhydrobiology. *Annu Rev Anim Biosci.* 2022 Feb 15;10:17-37. doi: 10.1146/annurev-animal-021419-083711. PMID: 35167318.
3. Akagawa M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radic Res.* 2021 Apr;55(4):307-320. doi: 10.1080/10715762.2020.1851027. Epub 2021 Sep 1. PMID: 33183115.
4. Baitin, D. M., Bakhlanova, I. V., Kil, Y. V., Cox, M. M., and Lanzov, V. A. (2006). Distinguishing characteristics of hyperrecombinogenic RecA protein from *Pseudomonas aeruginosa* acting in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 5812–5820. doi: 10.1128/JB.00358-06.
5. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23. doi: 10.1093/nar/7.6.1513. PMID: 388356; PMCID: PMC342324.
6. Berghammer H, Auer B. "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques.* 1993 Apr;14(4):524, 528. PMID: 8476586.
7. Boothby TC, Tapia H, Brozena AH, Piszkiwicz S, Smith AE, Giovannini I, Rebecchi L, Pielak GJ, Koshland D, Goldstein B. Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Mol Cell.* 2017 Mar 16;65(6):975-984.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.018. PMID: 28306513; PMCID: PMC5987194.
8. Chavez, C., Cruz-Becerra, G., Fei, J., Kassavetis, G. A., & Kadonaga, J. T. (2019). The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects dna from hydroxyl radicals. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47682>.
9. Chen J, Potlapalli R, Quan H, Chen L, Xie Y, Pouriyeh S, Sakib N, Liu L, Xie Y. Exploring DNA Damage and Repair Mechanisms: A Review with Computational Insights. *BioTech (Basel).* 2024 Jan 16;13(1):3. doi: 10.3390/biotech13010003. PMID: 38247733; PMCID: PMC10801582.
10. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Apr 15;1019:178-90. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.11.052. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26706659.

11. Curtin NJ. Targeting the DNA damage response for cancer therapy. *Biochem Soc Trans.* 2023 Feb 27;51(1):207-221. doi: 10.1042/BST20220681. PMID: 36606678; PMCID: PMC9988002.
12. Flieger J, Flieger W, Baj J, Maciejewski R. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials (Basel).* 2021 Jul 25;14(15):4135. doi: 10.3390/ma14154135. PMID: 34361329; PMCID: PMC8347950.
13. Grainger DC. Structure and function of bacterial H-NS protein. *Biochem Soc Trans.* 2016 Dec 15;44(6):1561-1569. doi: 10.1042/BST20160190. PMID: 27913665.
14. Habchi J, Tompa P, Longhi S, Uversky VN. Introducing protein intrinsic disorder. *Chem Rev.* 2014 Jul 9;114(13):6561-88. doi: 10.1021/cr400514h. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24739139.
15. Hashimoto, T., & Kunieda, T. (2017, June 15). DNA protection protein, a novel mechanism of radiation tolerance: Lessons from tardigrades. *Life.* MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life7020026>
16. Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc.* 2007;2(8):1849-61. doi: 10.1038/nprot.2007.249. PMID: 17703195; PMCID: PMC2757439.
17. Hesgrove C, Boothby TC. The biology of tardigrade disordered proteins in extreme stress tolerance. *Cell Commun Signal.* 2020 Nov 4;18(1):178. doi: 10.1186/s12964-020-00670-2. PMID: 33148259; PMCID: PMC7640644.
18. Hibshman JD, Goldstein B. LEA motifs promote desiccation tolerance in vivo. *BMC Biol.* 2021 Dec 14;19(1):263. doi: 10.1186/s12915-021-01176-0. PMID: 34903234; PMCID: PMC8670023.
19. James, J., Yarnall, B., Koranteng, A. et al. Protein over-expression in *Escherichia coli* triggers adaptation analogous to antimicrobial resistance. *Microb Cell Fact* **20**, 13 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01462-6>
20. Jones P, Benghuzzi H, Tucci M, Richards L, Harrison G, Patel R. Pathophysiological changes associated with multiple exposure of ionizing radiation on MRC-5 cells in culture. *Biomed Sci Instrum.* 2007;43:254-9. PMID: 17487090.
21. Keun Chae, Justin M. Overcash, Chanell Dawson, Collin Valentin, Hitoshi Tsujimoto, Kevin M. Myles, Zach N. Adelman, CRISPR-based gene editing of non-homologous end joining factors biases DNA repair pathway choice toward single-strand annealing in *Aedes aegypti*, (2023) 100133, <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100133>.
22. Kirke, J., Jin, XL. & Zhang, XH. Expression of a Tardigrade Dsup Gene Enhances Genome Protection in Plants. *Mol Biotechnol* **62**, 563–571 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00273-9>

23. Krasikova Y, Rechkunova N, Lavrik O. Nucleotide Excision Repair: From Molecular Defects to Neurological Abnormalities. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 9;22(12):6220. doi: 10.3390/ijms22126220. PMID: 34207557; PMCID: PMC8228863.
24. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Apr 1;5(4):a012583. doi: 10.1101/cshperspect.a012583. PMID: 23545420; PMCID: PMC3683898.
25. Kut K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Denaturation and Digestion Increase the Antioxidant Capacity of Proteins. *Processes.* 2023; 11(5):1362. <https://doi.org/10.3390/pr11051362>
26. Liang Y, Yuan Q, Zheng Q, Mei Z, Song Y, Yan H, Yang J, Wu S, Yuan J, Wu W. DNA Damage Atlas: an atlas of DNA damage and repair. *Nucleic Acids Res.* 2024 Jan 5;52(D1):D1218-D1226. doi: 10.1093/nar/gkad845. PMID: 37831087; PMCID: PMC10767978.
27. Malke, H. T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, X + 545 s., 61 abb., 28 tab. Cold Spring Harbor, N. Y. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie* **1984**, 24 (1), 32. <https://doi.org/10.1002/jobm.19840240107>.
28. Marinus MG. DNA Mismatch Repair. *EcoSal Plus.* 2012 Nov;5(1):10.1128/ecosalplus.7.2.5. doi: 10.1128/ecosalplus.7.2.5. PMID: 26442827; PMCID: PMC4231543.
29. Mínguez-Toral M, Cuevas-Zuviría B, Garrido-Arandia M, Pacios LF. A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-unique Dsup protein. *Sci Rep.* 2020 Aug 7;10(1):13424. doi: 10.1038/s41598-020-70431-1. PMID: 32770133; PMCID: PMC7414916.
30. Miyazawa K, Itoh SG, Yoshida Y, Arakawa K, Okumura H. Tardigrade Secretory-Abundant Heat-Soluble Protein Varies Entrance Propensity Depending on the Amino-Acid Sequence. *J Phys Chem B.* 2022 Mar 31;126(12):2361-2368. doi: 10.1021/acs.jpcc.1c10788. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35316056.
31. Nanduri R, Furusawa T, Bustin M. Biological Functions of HMGN Chromosomal Proteins. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 10;21(2):449. doi: 10.3390/ijms21020449. PMID: 31936777; PMCID: PMC7013550.
32. Neale RE, Lucas RM, Byrne SN, Hollestein L, Rhodes LE, Yazar S, Young AR, Berwick M, Ireland RA, Olsen CM. The effects of exposure to solar radiation on human health. *Photochem Photobiol Sci.* 2023 May;22(5):1011-1047. doi: 10.1007/s43630-023-00375-8. Epub 2023 Mar 1. PMID: 36856971; PMCID: PMC9976694.
33. Nguyen K, Kc S, Gonzalez T, Tapia H, Boothby TC. Trehalose and tardigrade CAHS proteins work synergistically to promote desiccation tolerance. *Commun*

Biol. 2022 Oct 1;5(1):1046. doi: 10.1038/s42003-022-04015-2. PMID: 36182981; PMCID: PMC9526748.

34. Pouresmaeil M, Azizi-Dargahlou S. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. *Arch Microbiol.* 2023 Apr 29;205(5):212. doi: 10.1007/s00203-023-03541-9. PMID: 37120438; PMCID: PMC10148705.
35. Puig, J., Knödlseeder, N., Quera, J., Algara, M., & Güell, M. (2021). DNA Damage Protection for Enhanced Bacterial Survival Under Simulated Low Earth Orbit Environmental Conditions in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.789668>.
36. Riber L, Frimodt-Møller J, Charbon G, Løbner-Olesen A. Multiple DNA Binding Proteins Contribute to Timing of Chromosome Replication in *E. coli*. *Front Mol Biosci.* 2016 Jun 28;3:29. doi: 10.3389/fmolb.2016.00029. PMID: 27446932; PMCID: PMC4924351.
37. Ricci, C.; Riolo, G.; Marzocchi, C.; Brunetti, J.; Pini, A.; Cantara, S. The Tardigrade Damage Suppressor Protein Modulates Transcription Factor and DNA Repair Genes in Human Cells Treated with Hydroxyl Radicals and UV-C. *Biology* 2021, 10, 970. <https://doi.org/10.3390/biology10100970>
38. Ricci C, Riolo G, Marzocchi C, Brunetti J, Pini A, Cantara S. The Tardigrade Damage Suppressor Protein Modulates Transcription Factor and DNA Repair Genes in Human Cells Treated with Hydroxyl Radicals and UV-C. *Biology (Basel)*. 2021 Sep 27;10(10):970. doi: 10.3390/biology10100970. PMID: 34681069; PMCID: PMC8533384.
39. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014 Apr 17;5:172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172. PMID: 24860555; PMCID: PMC4029002.
40. Sachdev S, Ansari SA, Ansari MI, Fujita M, Hasanuzzaman M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 11;10(2):277. doi: 10.3390/antiox10020277. PMID: 33670123; PMCID: PMC7916865.
41. Tomasova K, Cumova A, Seborova K, Horak J, Koucka K, Vodickova L, Vaclavikova R, Vodicka P. DNA Repair and Ovarian Carcinogenesis: Impact on Risk, Prognosis and Therapy Outcome. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 28;12(7):1713. doi: 10.3390/cancers12071713. PMID: 32605254; PMCID: PMC7408288.
42. Tuieng RJ, Cartmell SH, Kirwan CC, Sherratt MJ. The Effects of Ionising and Non-Ionising Electromagnetic Radiation on Extracellular Matrix Proteins. *Cells*. 2021 Nov 5;10(11):3041. doi: 10.3390/cells10113041. PMID: 34831262; PMCID: PMC8616186.