



Universidad de la República, Facultad de Ciencias.

Expresión del dominio quinasa de un receptor de membrana plasmática de la planta de papa, *Solanum tuberosum*.

Andrés Berais Rubio

Tutor: Dr. Marcos Montesano Co-tutor: MSc. Alfonso Alvarez

> Montevideo, Uruguay 2018

Resumen

Las interacciones entre plantas y patógenos se encuentran en una permanente competencia evolutiva. Los patógenos (como pueden ser hongos, virus y bacterias, entre otros) han desarrollado numerosos mecanismos para obtener nutrientes de sus anfitriones, mientras que las plantas por su parte han evolucionado llevando a cabo diferentes estrategias de defensa para combatir a los microorganismos que las atacan.

Una ejemplo particular de esta interacción es el que se da entre la planta de papa (*Solanum tuberosum*), una de las principales fuentes alimenticias de la humanidad, y un tipo de microorganismos patógenos, que producen la podredumbre blanda de la planta de papa.

El mayor conocimiento acerca de esta interacción, de los mecanismos a nivel molecular mediante los cuales la planta resiste, y la respuesta de defensa que desencadena frente a este patógeno, son de gran importancia para la obtención de futuras soluciones a problemas sanitarios.

Este trabajo trata de la expresión de la región quinasa de un receptor de membrana plasmática de la planta de papa, *kinprk2*, utilizando el sistema de expresión bacteriano de *Escherichia coli*.

Índice

Abreviaciones	4
Introducción	6
La papa	6
Interacción planta-patógeno	8
Receptores tipo quinasa	. 14
PRKs	. 17
El sistema de expresión de Escherichia coli	. 19
Objetivos	. 22
Objetivo general	. 22
Objetivos específicos	. 22
Materiales y métodos	. 23
Medios de cultivo utilizados	. 23
Cepas bacterianas utilizadas y gliceroles	. 23
Obtención de plásmido de ADN por lisis alcalina con SDS	. 23
Cuantificación de ADN	. 24
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	. 24
Electroforesis en gel de agarosa	. 27
Purificación de productos de PCR	. 27
Incorporación del producto de PCR al vector pGEM-T easy	. 27
Digestión de ADN con enzimas de restricción	. 28
Extracción de bandas del gel de agarosa	. 29
Ligación de la secuencia de interés con el vector de expresión	. 29
Transformación de bacterias	. 30
Secuenciación de la construcción y análisis bioinformático	. 30
Expresión del dominio quinasa	. 31
Cuantificación de proteínas	. 32
Análisis SDS-PAGE	. 32
Purificación de la proteína recombinante	. 33
Detección de la proteína mediante ensayo Western Blot	. 33
Resultados y discusión	. 35
Diseño y construcción del vector de expresión	. 35
Transformación de bacterias competentes y análisis de la construcción	. 38
Expresión de la proteína recombinante	. 41

Identificación proteica mediante ensayo de Western Blot	44
Conclusiones finales	47
Bibliografía	48

Abreviaciones

ADNc	ADN complementario
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN transferencia
DAMPs	Damage-Associated Molecular Pattern
ET	Etileno
ETI	Effector triggered immunity
HR	Hypersensitive response
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
ISR	Induced systemic resistance
JA	Jasmonato
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucina
LRR	Leucine rich repeats
Lis	Lisina
MAPK	Mitogen associated protein kinase
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
Pcc	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum
PCR	Polymerase chain reaction
PCRc	PCR colonias
PCWDE	Plant cell Wall degrading enzymes
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	Pathogenesis-related
Pro	Prolina
PRR	Pattern recognition receptors
PTI	PAMP triggered immunity
RLK	Receptores like kinase
RLP	Receptor like protein
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	PCR transcriptasa reversa
SA	Ácido salicílico

- SAR Systemic acquired resistance
- Ser Serina
- Tre Treonina
- Tir Tirosina
- TTSS Type three secretion system

Introducción

La papa

La planta de papa (*Solanum tuberosum*) pertenece a la familia Solanaceae, comprendida por 98 géneros y más de 2700 especies, la cual contiene varios miembros bien conocidos cultivados a nivel mundial, como el tomate (*Lycopersicon esculentum*), la berenjena (*Solanum melogena*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el pimiento (*Capsicum annuum*) (Kumar *et al.*, 2017).

La papa es el alimento proveniente de cultivos no cereales más importante del mundo. Se caracteriza por la producción de estolones (brote lateral que nace de la base del tallo), los cuales sufren un engrosamiento para formar tubérculos bajo condiciones ambientales adecuadas. Estos tubérculos son una importante fuente de vitaminas, antioxidantes, proteínas y almidón (Xu *et al.*, 2011).

Su cultivo se ha dispersado desde su centro de origen, la región de Los Andes, Sudamérica, al resto del mundo, donde actualmente es cultivado en más de 125 países y cinco continentes. La papa se cultiva en clima templado, subtropical y tropical, para cuya producción la temperatura representa el límite principal: las temperaturas inferiores a 10° C y superiores a 30° inhiben el desarrollo del tubérculo, mientras que la producción óptima ocurre donde la temperatura diaria se mantiene en promedio de 18° a 20° C. La producción global de cultivo en el año 2016 fue de 376.83 millones de toneladas. (www.fao.org). El rendimiento de los cultivos de papa varía significativamente alrededor del planeta, donde muchos factores contribuyen a esta variación. Se ha adaptado para ser cultivada en un amplio rango de ambientes, y cuenta con un considerable potencial para explotar su biodiversidad natural gracias a la disponibilidad de importantes recursos que se encuentran en los bancos de germoplasmas (Birch *et al.*, 2012).

Su genoma fue secuenciado en 2011 por el *Potato Genome Sequencing Consortium* (PGSC), resultando en 96.6 Gb de información cruda, utilizando tecnología del tipo *next generation sequencing* (NGS), junto con el convencional método de Sanger para completar la secuencia. Esta fue exitosamente alineada de forma ininterrumpida en *super-scaffold*, en un 93.9% de los 840 Mb que componen el genoma completo (Xu *et al.*, 2011).

El desafío que se presenta es lograr la adaptación de la planta para que se sobreponga frente a múltiples eventos de estrés biótico (patogénico) y abiótico (ambiental), lo cual es crítico para el futuro del crecimiento de ésta como una fuente mayor de alimento. Los avances en biotecnología y la era genómica, aceleran la identificación de los genes clave en distintos mecanismos involucrados en el desarrollo, la fisiología y la eficiencia en el uso de agua y nutrientes de la planta (Birch *et al.*, 2012).

Además de un aumento en su productividad, en estos momentos el foco está en el mejoramiento de las características nutricionales, así como la resistencia a estrés biótico y abiótico. Se requieren variedades de papa con mayor tolerancia para el calor y la sequía situadas en climas tropicales y subtropicales. Se estima que para 2020, más de dos mil millones de personas en todo el planeta dependerán de la papa para sobrevivir ya sea como fuente laboral o de alimento (Xu *et al.*, 2011).

Interacción planta-patógeno

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa para adaptarse a condiciones adversas a las que se enfrentan. Existen dos tipos de estrés a los que estas están expuestas, el estrés abiótico correspondiente a las condiciones ambientales, y el estrés biótico (patogénico), el cual es ocasionado por diversos microorganismos como bacterias, virus, hongos, así como también insectos. Las plantas se encuentran en permanente contacto con estos, lo que las ha obligado a desarrollar diversas estrategias para detectar su presencia y combatirlos (Rehman *et al.*, 2014).

Hay distintos tipos de fitopatógenos, los cuales se clasifican en biótrofos, necrótrofos, y hemibiótrofos, dependiendo el estilo de vida que llevan. Los biótrofos obtienen nutrientes de los tejidos vivos de sus hospederos, mientras que los necrótrofos producen la muerte celular y se alimentan de los tejidos muertos. También existen patógenos llamados hemibiótrofos, que pueden comportarse tanto como biótrofos o necrótrofos, dependiendo de las condiciones o la etapa del ciclo vital en que se encuentren. Las respuestas que despliegan las plantas frente a uno u otro tipo de patógeno son diferentes (Zhang *et al.*, 2013).

Debido a la inmovilidad/sesilidad característica de los vegetales, es de gran importancia su capacidad de recibir y responder señales endógenas y exógenas. La discriminación entre estímulos beneficiosos o perjudiciales, y el inicio de una respuesta apropiada se encuentra en permanente desarrollo. La percepción de estos estímulos en tiempo y forma es fundamental para una correcta activación de la respuesta de defensa. A diferencia de los animales, las plantas carecen de un sistema inmunológico adaptativo, y cuentan únicamente con mecanismos de defensa innatos que no incluyen células especializadas (Tör *et al.*, 2009).

Cada célula vegetal está rodeada por una pared celular que actúa como una barrera, y también como fuente de nutrientes para posibles patógenos. Los patógenos que superan esta barrera están bajo vigilancia molecular por las células de la planta, usualmente por receptores que residen en la superficie celular o en el citoplasma (Tör *et al.*, 2009).

Estos receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrón (PRRs, *pattern recognition receptors*), se encargan del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; "Pathogen-Associated Molecular Patterns"), y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs; "Damage-Associated Molecular Pattern"). Los PAMPs son en general componentes esenciales del patógeno, como quitina fúngica o flagelina bacteriana, así como la proteína bacteriana Ef Tu la cual es reconocida como PAMP en Arabidopsis (Zipfel et al., 2006). Otro tipo de PAMPs reconocidos son productos derivados de la quitina proveniente de las paredes celulares de hongos, como n-acetilglucosamina o n-acetilquito-oligosacaridos (Kaku *et al.*, 2006).

Los DAMPs corresponden a moléculas endógenas liberadas por la infección del patógeno, como pueden ser fragmentos de las paredes celulares o fragmentos cuticulares (Dodds & Rathjen, 2010; Colls *et al.*, 2011)

Percepción del patógeno y desarrollo de la defensa

Los patógenos generalmente ingresan al interior de la planta penetrando la superficie de hojas y raíces, o a través de heridas y sitios naturales de entrada como los estomas (Tilsner & Oparka, 2010, Horbach *et al.*, 2011).

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa sofisticados para combatir la infección de patógenos mediante el bloqueo de la entrada y la activación de un abanico de respuestas de defensa. La primera barrera a la que se enfrentan los patógenos son capas cuticulares cerosas y paredes celulares, así como distintos compuestos antimicrobianos. Una vez que los patógenos penetraron la pared celular se activa el sistema inmune innato de la planta para atacar la infección. Este sistema ocurre a dos niveles, el primero es conocido como inmunidad inducida por PAMPs (PTI, *PAMP triggered immunity*), el cual se basa en la percepción de PAMPs a través de PRRs en la superficie celular, y el segundo nivel de respuesta se llama inmunidad inducida por efector (ETI, *effector triggered immunity*), el cual consta de la percepción de efectores producidos por patógenos exitosos que lograron evadir la PTI (Pajerowska-Mukhtar and Dong, 2009, Zhang *et al.*, 2013).

PTI corresponde a la respuesta inmune basal, y ha evolucionado para reconocer estructuras comunes de los microorganismos patógenos. El reconocimiento de PAMPs está asociado a una serie de respuestas para prevenir el crecimiento microbiano. La primer respuesta fisiológica al reconocimiento de PAMPs es la alcalinización del medio de crecimiento por las células vegetales (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Se presentan flujos de H⁺, Ca²⁺, K⁺, y Cl⁻ luego del reconocimiento. Además, se da un incremento de la concentración de Ca²⁺ citoplasmático. (Nicaise *et al.*, 2009; Jabs *et al.*, 1997).

Un ejemplo típico de receptores que desencadenan la PTI es FLS2, un receptor de tipo quinasa con motivo repetido rico en leucina (RLK-LRR), el cual una vez que logra el reconocimiento, produce la posterior transducción de señales por estos, y una de las principales consecuencias es la activación de cascadas MAPK (Asaí *et al.*, 2008; Boller & Felix, 2009).

Las cascadas de señalizacion MAPK (*mitogen associated protein kinase*) corresponden a una vía de señalización de gran importancia utilizada para transducir estímulos extracelulares a respuestas intracelulares. Dentro de esta cascada de señalización, ocurre la fosforilación y desfosforilación de MAPK, la cual es activada por una MAPK quinasa (MAPKK), donde esta última también es activada por una MAPKK quinasa (MAPKKK) (MAPK Group, 2002; Tena, 2016).

El reconocimiento de PAMPs por la planta también induce la rápida producción de especies reactivas de oxigeno (ROS, *reactive oxygen species*) en una explosión oxidativa (Zhang *et al.*, 2007). La producción de ROS juega un rol importante en las respuestas de defensa vegetales frente a patógenos. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran el peróxido de hidrogeno, el

superóxido, y los radicales hidroxilos, entre otros. Aparecen normalmente en células vegetales durante el metabolismo celular. Estas ROS son generadas principalmente por la actividad del transporte de electrones en organelos como las mitocondrias o los cloroplastos, y por actividades enzimáticas relacionadas a las reacciones redox en otros compartimentos celulares (Foyer *et al.*, 1994; Mehdy, 1994). Las ROS, especialmente el peróxido de hidrogeno, pueden tener un rol dual durante la respuesta de defensa de la planta, actuando como molécula señal y con actividad antimicrobiana. Como señal, el peróxido de hidrogeno induce la expresión de genes relacionados a la defensa (Lamb & Dixon, 1997; Mittler & Blumwald, 2015).

Entre las primeras respuestas a la infección, también ocurre la síntesis de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas, y en algunos casos de un tipo de proteínas llamadas defensinas.

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, que se producen en respuesta a las infecciones de patógenos. Presentan una acumulación en la zona cercana a la infección, de esta forma limitando la dispersión del invasor, ya que presentan toxicidad frente a estos (Zhang *et al.*, 2013).

Por su parte, las defensinas son pequeños péptidos ricos en cisteína, que forman parte de la respuesta inmune innata contra patógenos fúngicos y bacterianos, además de presentar actividad inhibidora de proteasas y de amilasas de insectos (Stotz *et al.*, 2009).

Otro grupo de proteínas que participa en la respuesta son las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), las cuales son un tipo de proteínas producidas por la planta cuando se da el ataque de un patógeno. La infección activa genes que producen la expresión de estas proteínas PR. Estas tienen carácter antimicrobiano, donde atacan moléculas de las paredes celulares bacterianas (Haque et al., 2014, van Loon, 1985; van Loon et al., 2006).

Otros mecanismos de respuesta que ocurren en la planta son la acumulación de calosa, sintetizada entre la pared celular y la membrana plasmática, y el cierre estomático, respuestas características de la PTI. Además, ocurre la inducción de hormonas de defensa jasmonato (JA), etileno (ET) y ácido salicílico (SA), principalmente (Nicaise *et al.*, 2009; Jones & Dangl, 2006).

Con respecto a la ETI, además de las respuestas ya mencionadas que ocurren en PTI, el reconocimiento de efectores provenientes de los patógenos produce una reprogramación transcripcional de vías antimicrobianas y hormonas asociadas al estrés, acompañado por una respuesta de muerte celular programada conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR) (Zhang *et al.*, 2013).

HR es una forma de muerte celular programada localizada en el sitio donde ocurre la infección del patógeno. Corresponde a un tipo específico de muerte celular, en el que ocurre la contracción citoplasmática, la hinchazón mitocondrial, combinada con otras características que son específicas de la planta, como la vacuolización y la disrupción del cloroplasto durante las etapas finales (Colls *et al.*, 2011).

Los genes R, codifican proteínas R que se encargan de monitorear la presencia de efectores provenientes de patógenos de forma directa o indirecta,

y desencadenar la respuesta de defensa. Los patógenos han desarrollado efectores para evadir la ETI. Estas interacciones entre proteínas R y efectores van variando entre reacciones compatibles e incompatibles a lo largo del tiempo (Qutob *et al.*, 2006). Los genes que codifican para la producción de efectores de patógenos, que inducen resistencia mediada por genes R se definen como genes Avr, los cuales reducen cualitativamente la virulencia pero solo cuando el anfitrión presenta el gen R afín. Muchos patógenos bacterianos contienen miembros de la familia proteica de sistemas de secreción de tipo 3 (TTSS, *"type three secretion system"*), los cuales tienen la habilidad de hacer que ingresen los efectores de virulencia bacterianos directo en las células del hospedero. El primer gen de resistencia en plantas en ser clonado fue Pto (Thilmony et al., 1995), el cual codifica una proteína quinasa intracelular del tipo Ser/Tre que activa la ETI en tomate (Oh and Martin, 2011; He *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013).

El modelo de zigzag esquematiza los pasos que sigue la respuesta vegetal (Figura 1; Jones & Dang, 2006).



Figura 1: Modelo zigzag de respuesta vegetal. Se observa el desarrollo de la defensa vegetal en ambos niveles PTI y ETI (Tomado de Jones et al; 2006).

A pesar de que PTI y ETI son dos procesos independientes, comparten mecanismos de respuesta y señalización, como la reprogramación transcripcional y cambios hormonales, aunque se diferencia en cómo interpreta la planta las señales en cada caso. Ambos mecanismos generan producción de ROS, activación de las cascadas de señalización MAPK, así como la activación de vías de señalización de ET, JA y SA, pero de distinta forma y en diferentes circunstancias. También en algunas plantas las hormonas como ácido abscísico, giberelina y auxina tienen roles importantes en la inmunidad vegetal (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Resistencias sistémicas: adquirida e inducida

Además de las respuestas mencionadas, existen otros mecanismos de defensa que se activan en la planta una vez ocurrida la percepción del patógeno (Figura 2). Estos corresponden a dos tipos de resistencias que desarrolla la planta, la resistencia sistémica adquirida (SAR), y la resistencia sistémica inducida (ISR). De esta forma una vez que la planta fue infectada, ocurre la activación de vías de señalización que provocaran una respuesta de larga duración en todos los órganos de la planta. La resistencia sistémica adquirida (SAR) es un mecanismo de defensa que confiere protección contra un amplio espectro de microorganismos. Es un mecanismo dependiente de SA, ya que es necesaria esta molécula señal, en asociación con la acumulación de las proteínas relacionadas a la patogénesis. La SAR es activada en las plantas por patógenos que causen necrosis, ya sea como un síntoma de la infección o por formar parte de la HR. Este tipo de resistencia sistémica se caracteriza por el incremento de la expresión de un gran número de genes PR, tanto en los tejidos locales como sistémicos (Durrant & Dong, 2004).



Figura 2: Diagrama de la respuesta de defensa contra patógenos. En la parte superior se observa la respuesta frente a necrótrofos donde se observan RLKs, defensinas, fitoalexinas, y las vías de señalización JA/ET. En la parte inferior se observa el sistema de resistencia frente a un patógeno biotrofo, con el desarrollo de los dos niveles de defensa, en primer lugar PTI, que se desencadena por el reconocimiento de P/DAMPs por PRRs anclados a la membrana, seguido por la activación de las cascadas MAPK. ETI se desencadena por una interacción entre el efector y una proteína R, donde esta resistencia mediada por genes R resulta en una respuesta HR, y por consiguiente activa vías de señalización dependientes de SA que conllevan al desarrollo de SAR. (Tomado de Zhang et al., 2013).

Con respecto a la resistencia sistémica inducida (ISR), también es un fenómeno que es desencadenado por una infección local, al cual la planta responde con cascadas de señalización dependientes de SA, las cuales conllevan a una expresión sistémica de una resistencia duradera contra microorganismos patógenos. Esta se caracteriza por provocar cambios en la composición de las paredes celulares, la producción de novo de proteínas PR, y la síntesis de fitoalexinas (Heil & Bostock, 2002). También ha sido demostrada la participación de las vías de señalización dependientes de JA y ET en la ISR (Bari and Jones 2009; Sharon *et al.* 2011; Martinez-Medina *et al.* 2013). Además de las respuestas basales de resistencia que actúan en el sitio de infección, las plantas también son capaces de llevar a cabo este tipo de resistencia sistémica, la cual es muy eficiente frente a los patógenos (Bostock, 2005; Vidhyasekaran, 2014).

Receptores tipo quinasa

La percepción de señales extracelulares por receptores de membrana plasmática es una característica ubicua durante la vida celular. Una comunicación continua y coordinada entre la planta y el ambiente es fundamental para la supervivencia de esta (Spoel & Dong, 2012; Jamieson *et al.*, 2018).

Los receptores vegetales (Figura 3), se caracterizan por pertenecer a los RLK (*Receptor like kinase*), o a los RLPs (*Receptor like protein*). Los RLK están conformados estructuralmente por un dominio extracelular que lleva a cabo la percepción de señales, un dominio transmembrana, y un dominio quinasa citoplasmático. La diferencia estructural entre estos dos grupos de receptores es que los RLPs carecen del dominio quinasa intracelular que presentan los RLKs (Shiu & Bleecker, 2001). Son proteínas con un receptor y un dominio de señalización, en una misma molécula.

La región extracelular de RLK percibe directamente las señales extracelulares (PAMPs), donde el dominio quinasa citoplasmático transduce estas señales dentro de la célula (Vidhyasekaran, 2014).



Figura 3: Ejemplos de PRRs vegetales. Se observan ejemplos de diferentes PRRs vegetales desencadenados por PAMPs como bacterias, hongos, oomycetes, y DAMPs, donde se especifican a la derecha los distintos dominios que los componen (Tomado de Moneghan & Zlpfel; 2012)

Los RLKs más comúnmente utilizados por las plantas son los receptores serina/treonina quinasa (STK) para la transducción inmediata de señales corriente abajo, aunque los RLKs de muchas plantas también presentan actividad tirosina quinasa (Oh *et al.*, 2009; Shiou & Bleecker, 2001; Lin *et al.*, 2014)

Estos receptores forman una primera línea de defensa al detectar la presencia de microorganismos en su ambiente a través de elicitores generales desde el exterior de la célula vegetal (Boller and He 2009; Albert *et al.* 2010; Jamieson *et al.*, 2018).

Reconocen moléculas de diversa naturaleza como glicopéptidos, péptidos, lipopolisacáridos, oligosacáridos, entre otras estructuras derivadas de patógenos o de la planta proveniente del daño. Presentan una gran especificidad y selectividad para reconocer moléculas no propias a concentraciones nano o subnanomolares, al mismo tiempo sin reconocer moléculas propias de la plantas aunque estén química o estructuralmente relacionadas con las no propias (Tor *et al.*, 2009).

En función de la estructura de los dominios extracelulares, los RLKs se pueden clasificar hasta en 14 familias, donde los repetidos ricos en leucina

(LRRs) comprenden la familia más grande (Gou et al. 2010). Esta es la familia mejor caracterizada dentro de los RLKs. Entre las otras familias se encuentran Bulb-type lectin domain (B-lectin) la cual se une a manosa, Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular (CHASE) que presenta sitios de unión para ligando de bajo peso molecular, la familia Lectina de tipo C (C-LEC) que se unen a carbohidratos. Domain of Unknown Function26 (DUF26) es una familia que presenta cuatro cisteínas conservadas y está involucrada en respuestas de defensa, Epidermal Growth Factor (EGF) contiene motivos de unión a calcio. Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Domain (GDPD) y Glycoside hydrolase, se caracterizan por estar presentes en enzimas hidrolasas, la familia Legume lectin B presenta sitios de unión a carbohidratos, y los Motivos de Lisina (LysM) son una familia que interacciona con peptidoglicanos y con guitina. Además se encuentran las familias Plasminogen/Apple/Nematode protein domain (PAN) que llevan a cabo interacciones proteína-proteína y proteínacarbohidrato, la familia S-locus glycoprotein involucrada en la secreción proteica, Pathogenesis-Related Protein-1 Sperm-Coating Glycoprotein domain (SCP) es una familia que se encuentra en las proteínas PR involucradas en la respuesta de defensa, Thaumatina la cual se considera que puede tener actividad antifúngica, y por último la familia WAK, que está involucrada en la unión a componentes de paredes celulares (Baluska & Vivanco, 2012).

Una de las interacciones más conocidas entre RLKs y sus ligandos es la correspondiente al reconocimiento de flagelina por el receptor FLS2 (flagelin sensing 2) (Figura 4). Este fue identificado por primera vez en *Arabidopsis thaliana* y tiene ortólogos en otras plantas. Este receptor está compuesto por un dominio extracelular con 28 motivos de LRRs en tándem, un dominio transmembrana y un dominio quinasa Ser/Tre en el extremo C-terminal. El inicio de la respuesta de defensa por el reconocimiento de FLS2 ocurre a partir de la asociación además con otro receptor quinasa de tipo LRR, el BAK1, el cual es un receptor involucrado en la señalización de brasinosteroides. Cuando se da el reconocimiento de la flagelina, ocurre inmediatamente esta asociación entre ambos receptores y comienza la activación de la señalización, desencadenando así la PTI de la planta (Boller & Felix, 2009; Lu *et al.*, 2010).



Figura 4: El complejo FLS2. Reconocimiento y asociación del receptor FLS2 con BIK1 en *A. thaliana* (Tomado de Monaghan & Zipfel, 2012).

A fines de la década de 1990, se encontraron una gran cantidad de RLKs en *A. thaliana*. Un análisis computacional global de *A. thaliana* estableció que los RLK eran una de las familias de genes más grandes en las plantas (Baluskabaluska & Vivanco, 2012). En *A. thaliana*, hay al menos 610 RLKs, que representan el 2.2% del total de proteínas codificadas en todo el genoma de la planta, incluyendo más de 400 RLKs típicos transmembrana, y cerca de 200 receptores de tipo quinasa citoplasmáticos (RLCKs), cuyos dominios extracelulares y transmembrana se han perdido durante la evolución (Arabidopsis Genome Initiative 2000; Shiu and Bleecker 2001).

Los RLKs son regulados por la fosforilación diferencial controlada por quinasas y fosfatasas asociadas. Estos reguladores controlan la localización y abundancia del receptor, para mantener un cuidadoso balance en la percepción de señales y en el cambio en la expresión de genes corriente abajo. La fosforilación reversible de residuos de Ser, Tre y Tir, es una modificación proteica post traduccional de gran importancia, y conduce a la modulación crítica de una enorme cantidad de vías de transducción de señales eucariotas. El resultado final de estas vías de señalización que involucran a los RLKs es generalmente el cambio en la expresión de cientos de genes, resultando en una cascada de interacciones proteicas, y eventos de fosforilación que alteran la actividad específica de factores de transcripción. Los genomas vegetales codifican cientos de RLKs con una organización de los dominios funcionales similar a la de los receptores guinasas animales. La identificación de los sitios específicos de fosforilación, seguido de la caracterización funcional de estos ha permitido el avance del entendimiento de los mecanismos de señalización de estos receptores, su crecimiento regulado, morfogénesis y su resistencia a enfermedades (Baluska & Vivanco, 2012).

PRKs

Montesano y colaboradores (2001) identificaron y caracterizaron un grupo de genes de respuesta temprana de la planta de papa (*Solanum tuberosum*), a partir del aislamiento de cuatro ADNc obtenidos como resultado de la inoculación con filtrado de cultivo de la bacteria *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (Pcc)*. Estas son bacterias gram negativas, no esporulantes, anaerobias facultativas, y que llevan a cabo la producción de grandes cantidades de enzimas extracelulares degradadoras de las paredes celulares (PCWDE, *plant cell wall degrading enzymes*), a través de las cuales causan enfermedades en sus hospederos, principalmente la pudrición suave en cultivos de gran importancia como es la papa (Collmer & Keen, 1986).

Los ADNc aislados corresponden a cuatro genes (PRK1-4), los cuales presentan un alto grado de homología (91-99%), y codifican para RLKs. PRK2, PRK3 y PRK4 presentan un 98-99% de similitud en cuanto a las secuencias aminoacídicas, mientras que PRK1 un 91% con respecto a los otros tres PRKS.

Además, PRK1, PRK2 y PRK4 codifican un polipéptido 676 aminoácidos con un peso molecular de 75 kDa, mientras que PRK3 codifica para un polipéptido de 651 aminoácidos de 72 kDa. Estos PRKs presentan dos regiones altamente hidrofóbicas. Una en la región amino terminal, que indica la presencia de un péptido señal (Von Heinje, 1990), la cual es seguida por un dominio hidrofílico de 255-280 aminoácidos, que contiene 6-7 sitios de glicosilación. La otra región hidrofóbica consta de 23 aminoácidos la cual es seguida de un grupo de residuos básicos, correspondientes a proteínas integrales de membrana de tipo I (Singer, 1990).

El dominio extracelular presenta un patrón conservado de cisteínas, que se presentan en dos módulos de seis cisteínas cada uno.

El primer módulo comienza cerca del péptido señal en la región amino terminal, y contiene un motivo C-X(49–53)-C-X(8)-C-X(2)-C-X(11)-C-X(12–14)-C. A este le siguen 75-77 aminoácidos que se unen al segundo módulo, el cual posee un motivo C-X(8)-C-X(2)-C-X(10)-C-X(0–1)-C-X(12)-C, seguido por un segmento de 42-46 aminoácidos previos al dominio transmembrana.

Algunos PRKs carecen de cisteínas en distintos módulos, como PRK3 que carece de una cisteína perteneciente al módulo I, mientras que a PRK4 le falta una en el módulo II. Estas cisteínas conservadas pueden estar involucradas en la formación de enlaces disulfuro que determinan el plegamiento general de la proteína. Existen otros grupos de PRRs que presentan similitudes en cuanto a la presencia de repetidos ricos en cisteína. Un ejemplo de estos son los CRK (*Cysteine-rich RLKs*), los cuales fueron caracterizados en *A. thaliana* y presentan de 1 a 4 motivos DUF26 (CX(8)CX(2)C). Los CRKs son inducidos por estrés oxidativo, además de la aplicación de SA y el ataque de microorganismos patógenos (Wrzaczek et al, 2010). PRK3 presenta una deleción de 25 aminoácidos en el dominio extracelular, donde en los otros PRKs se encuentra una cisteína conservada y un sitio de glicosilación. La región C-terminal en los PRKs presenta 11 subdominios conservados entre distintas quinasas (Hanks, 1988), incluyendo 15 aminoácidos invariantes con organización correcta. Los

motivos presentes en el centro catalítico, DLKXXN en el subdominio IV, y APE en el subdominio VIII, son indicadores de proteínas quinasa del tipo Ser/Tre (Hanks & Quinn, 1991).

Montesano *et al.* (2001) observaron que se producía una acumulación de transcriptos de PRK en hojas y tubérculos de papa heridas tratadas con filtrado de cultivo de *Pcc* (Figura 5). En la figura se puede observar un ensayo de *Northern Blot* para confirmar la acumulación de transcriptos de PRKs en hojas de papa con heridas, tratadas con moléculas componentes de las paredes celulares como son los dímeros y trímeros del ácido galacturónico, así como con el anteriormente mencionado filtrado de cultivo de *Pcc*. En primera instancia, por esta expresión temprana de los PRKs en dichas condiciones, es que estos genes podrían estar involucrados en el reconocimiento de PAMPs de esta bacteria y de DAMPs relacionados al daño de las paredes celulares que ocasionan las enzimas producidas por *Pcc* (Montesano *et al.*, 2001).



Figura 5: Acumulación de transcriptos de PRKs en hojas. Se observa la acumulación en hojas con heridas tratadas en distintos tiempos (0, 1, 2, 4 horas) con filtrado de cultivo de *Pcc* (CF), dimeros y trimeros de ácido galacturónico, y como control agua para ver la transcripción intrínseca de estos.

El sistema de expresión de Escherichia coli

Gracias a los avances en el área de la proteómica, ha incrementado significativamente el uso de proteínas recombinantes. Los sistemas de expresión bacterianos son muy atractivos debido al bajo costo y la alta productividad. Además tienen la habilidad de crecer rápidamente con una gran variedad de sustratos, y de ofrecer genomas bien caracterizados con la disponibilidad de un importante número de vectores de clonación. Para llevar a cabo la sobreexpresión de proteínas, en general es útil clonar genes corriente abajo de promotores bien conocidos y regulados (Terpe, 2006). El organismo más utilizado para la producción de proteínas recombinantes es la bacteria *Escherichia coli*. Este es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo comensal, miembro de la familia de las enterobacterias_(Terpe, 2006).

El sistema de expresión de *E.coli* es el principal sistema de expresión bacteriana y es utilizado para la comparación entre distintas plataformas de expresión de proteínas recombinantes. Su flexibilidad en términos de manipulación genética ha convertido a esta bacteria en un punto de referencia debido al gran número de herramientas genéticas que se encuentran disponibles y en desarrollo gracias a este hospedero. Considerando que solo en el *Protein Data Bank*, más del 90% de las estructuras depositadas utilizaron *E. coli* para la producción de al menos una macromolécula. Además el aumento en el interés de estudiar proteínas eucariotas ha comenzado a desafiar a *E. coli* para esta exploración (Vincentelli & Romier, 2013).

Dentro de las características fundamentales con respecto a este sistema, una de las principales es la utilización de la lactosa, la cual corresponde a uno de los mecanismos de regulación mejor conocido en el sistema de expresión de *E. coli*. Muchos promotores derivados del *lac* han sido construidos (Polisky *et al.* 1976). La capacidad de *E.coli* de producir proteínas glicosiladas modificadas genéticamente promete amplias aplicaciones para el futuro de este sistema de expresión (Chen, 2012).

En general, las proteínas sobreexpresadas se acumulan en el citoplasma, la cual es la primera opción para la producción de proteínas recombinantes debido a presentar un mayor rendimiento, aunque estas también pueden ser producidas en el periplasma (Terpe, 2006).

La elección del sistema promotor y el huésped adecuado para la expresión de una proteína es una etapa fundamental.

Uno de los principales inconvenientes que se presenta en el uso de este sistema se debe a la diferencia entre el uso de codones de *E. coli* y de la proteína sobreexpresada, en caso de que esta sea proveniente de otra especie. Esto ocurre porque los aminoácidos son codificados por más de un codón, y cada organismo cuenta con su propio repertorio de los 61 codones (Terpe, 2006).

En cada célula, la población de ARNt representa el repertorio de codones del ARNm (Dong *et al.* 1996). Si se quiere sobreexpresar el ARNm de los genes recombinantes diana, diferencias en el uso de codones pueden impedir la traducción debido a la demanda de uno o más ARNts que pueden ser extraños o no encontrase en el sistema de expresión del hospedero (Kane 1995; Goldman *et al.* 1995). *Pools* de ARNt insuficientes pueden provocar un estancamiento de la traducción, una terminación prematura de la traducción, errores en la incorporación de aminoácidos y corrimientos del marco de lectura (Kurland and Gallant 1996; Tucci et al., 2016).

Muchas cepas de esta especie han sido modificadas para aumentar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones que no son comunes en el sistema de *E.coli*, y de esta forma sobreponerse a los problemas que se puedan presentar (Terpe, 2006).

Otra característica de este sistema de expresión es la que comprende el uso de antibióticos para ejercer una presión selectiva que aumente la estabilidad de los cultivos. A pesar de esto, el alto costo y el riesgo potencial al esparcimiento de los genes de resistencia a antibióticos hace que el uso de antibióticos a gran escala este siendo dejado de lado (Hagg *et al.*, 2004).

Por otro lado, la biodiversidad que ya presentan las secuencias peptídicas y las modificaciones post traduccionales agregan dificultad en la busqueda de obtener una proteína bioactiva, porque no requiere solo la síntesis del esqueleto peptídico, sino también de las modificaciones auténticas que se presentarían en la especie original (Chen, 2012).

Los esfuerzos en mejorar y aumentar la expresión de proteínas recombinantes es de gran interés y algunas tecnologías exitosas han comenzado a tener impacto en la producción más allá de las investigaciones de laboratorio. Dos áreas que están presentando un desarrollo considerable son la glicosilación y las modificaciones post traduccionales (Chen, 2012).

Hace no muchos años atrás, se creía que las bacterias eran incapaces de producir proteínas glicosiladas. El descubrimiento del sistema de glicosilación *N-linked* en las bacterias gram negativas *Camylobacter jejuni* y la subsecuente transferencia de este sistema a *E. coli*, permitió la posibilidad de usar *E. coli* para sintetizar glicoproteínas (Wacker *et al.*, 2002).

Una de las principales complicaciones que presenta esto es que en algunos casos la glicosilación ocurre de forma incompleta, y la eficiencia de esta es muy baja. Cuando se presenta más de un sitio de glicosilación, la heterogeneidad también es un inconveniente (Chen, 2012).

Esta N-glicosilación puede no solamente ser utilizada para producir proteínas con actividad biológica, sino que también como una herramienta muy efectiva para modificar las propiedades físicas de una proteína. Es por esto que *E. coli* puede producir proteínas recombinantes de proteínas glicosiladas a partir de los glúcidos deseados.

Otra modificación de gran importancia es la acetilación, ya que en las células eucariotas, aproximadamente el 98 % de las proteínas son acetiladas en el extremo N-terminal (Johnson *et al.*, 2010). Además de la glicosilación, la N-acetilación de la lisina es una modificación común. La importancia de la acetilación puede ser considerada a la altura de la fosforilación y esta afecta la replicación del ADN, la reparación y recombinación, el mantenimiento de la estabilidad del genoma, del metabolismo, de la dinámica del citoesqueleto, la transducción de señales, el plegamiento proteico y el tráfico de estas (Newmann *et al.*, 2008). Es por esto la importancia de generar la acetilación autentica en el esqueleto peptídico para producir proteínas recombinantes bioactivas. Y aunque

no se ha reportado de forma tan amplia, un enfoque similar al de la acetilación se le puede aplicar a la fosforilación. (Chen, 2012).

Por otro lado, el sistema de expresión de *E. coli* también está asociado a algunos inconvenientes además de la falta de modificaciones post traduccionales, como es la degradación de proteínas nativas (Baneyx & Mujacic, 2004)

Las proteínas expresadas a veces se agregan como cuerpos de inclusión, que deben someterse a procesos complicados, tales como despliegue, diálisis y replegamiento, para producir proteínas solubles y activas. Por lo tanto, la optimización de todo el proceso de aislamiento de los cuerpos de inclusión lleva tiempo y el proceso comúnmente no proporciona altos rendimientos (Georgiou & Valax, 1996; Sorensen & Mortensen, 2005). Una solución es optimizar las condiciones de expresión para obtener directamente una proteína recombinante soluble y activa. Se puede lograr mediante la reducción de la temperatura, una sustitución de aminoácidos, la co-expresión de proteínas chaperonas, el cambio de las condiciones del cultivo o la elección de otra cepa bacteriana. También se puede llevar a cabo la solubilización de los cuerpos de inclusión y su replegamiento (Tsai *et al.*, 2017, Makrides, 1996; Singh & Panda 2005).

Durante el último tiempo muchos hospederos bacterianos han sido optimizados para la producción de proteínas recombinantes. La era genómica ofrece nueva información acerca de las bacterias hospederas que son más y menos frecuentemente utilizadas. También se ha progresado en sistemas de expresión bacterianos alternativos a este, como son las bacterias *Corynebacterium glutamicum* y *Corynebacterium ammoniagenes*, y las pertenecientes a *Streptomyces* (Terpe, 2006).

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es la expresión del dominio quinasa del receptor de papa (*Solanum tuberosum*) PRK2, en estado soluble, utilizando el sistema de expresión de *Escherichia coli* para la producción de esta proteína recombinante.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos en las distintas instancias del trabajo son:

a) Llevar a cabo el diseño y la construcción del vector de expresión, incorporando la secuencia *kinprk2* dentro del vector pQE30.

b) Obtener colonias transformantes con la construcción pQE30-*kinprk2* y pQE30 vacío respectivamente, y analizar la correcta incorporación de estas construcciones en las colonias obtenidas.

c) Llevar a cabo la expresión de *kinprk2* en las bacterias transformantes, con posterior purificación e identificación de la proteína recombinante.

Materiales y métodos

Medios de cultivo utilizados

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano para diferentes experimentos, tanto en medio sólido como líquido fue Luria-Bertani con selección para ampicilina. El medio LB está compuesto por 10 g de peptona, 5 g de cloruro de sodio y 5 g de extracto de levadura para un volumen de un litro. En el caso del medio sólido a la composición mencionada se le adicionan 12 g de agar. Por último se agregó ampicilina en una concentración efectiva de 100 µg/ml.

Cepas bacterianas utilizadas y gliceroles

La cepa de *E. coli* seleccionada para llevar a cabo la expresión de nuestro dominio quinasa, fue JM109, la cual cuenta con un buen crecimiento y es transformada eficientemente. Las características genotípicas que la componen son la presencia de *endA1* correspondiente a la endonucleasa A, y *recA1*, que hace que no ocurra la restricción no deseada del ADN clonado ó la recombinación con un cromosoma del hospedero, debido a que carece del sistema de restricción K de *E. coli*. También fue utilizada la cepa de *E. coli* XL1-Blue, la cual también cuenta en su genotipo con *recA1* y *endA1*. Esta cepa fue transformada y utilizada para evaluar el sistema de expresión.

Se realizaron gliceroles para contar con un respaldo de todas las colonias obtenidas en las diferentes etapas del trabajo. Para ello, a partir de cultivos líquidos de LB con selección para ampicilina de las respectivas colonias purificadas, luego de un crecimiento toda la noche a 37°C con agitación a 220 *rpm*, se agregó en tubos *Cryo.s*^R 50% de glicerol y 50% de cultivo. Los mismos fueron conservados a -80°C.

Obtención de plásmido de ADN por lisis alcalina con SDS

Se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico de cultivos que presentaban diferentes construcciones en más de una ocasión. Esto fue realizado utilizando el *Qiagen Miniprep kit* (Qiagen^{*R*},Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante que se encuentran en el protocolo para purificación de plásmidos de ADN. Se partió de cultivos líquidos de 10 ml de medio LB ampicilina (concentración final de 100 µg/ml), con colonias aisladas provenientes de placas con el mismo medio. Estos fueron incubados toda la noche a 37 °C

con agitación a 220 *rpm*. Los cultivos fueron centrifugados a máxima velocidad durante 2 minutos, para luego descartar el sobrenadante, y a partir del *pellet* se llevó a cabo el procedimiento como indica el protocolo del kit, el cual se basa en primer lugar en una lisis alcalina con hidróxido de sodio y con el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), seguido de una posterior precipitación con etanol del ADN plasmídico. Este se guardó a -20 °C.

Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó en nanodrop (Thermo Fisher Scientific^{*R*}, USA) midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm, para evaluar no solo la concentración de ácidos nucleicos, sino también el índice de pureza de las muestras, el cual es un coeficiente que se calcula: Abs260nm/Abs280nm. Los valores del índice de pureza óptimos se encuentran en el rango entre 1.8 y 2 (Sambrook & Russell, 2001).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo la amplificación del fragmento de interés correspondiente a la secuencia *kinprk2*. En primer lugar se realizó el diseño de los *cebadores* a partir de la plataforma bioinformática *Idtdna Oligo Analyzer*. Una vez diseñados, fueron enviados a sintetizar a Macrogen^R (Corea del Sur). Los cebadores fueron sintetizados teniendo en consideración los parámetros de temperatura de *melting*, la formación de homo y heterodímeros, así como la formación de horquillas. A continuación se detallan las secuencias de los cebadores *Fwd* y *R3*, siendo estos el directo y el reverso, respectivamente:

Fwd : 5-AAAG A<u>GGA TCC</u>C TGGT GAAC GAAA TTCAG-3

R3 : 5-CTGA GTTA TATC CTCG TTAA <u>GTCG AC</u>C ATC-3

En ambos *cebadores* se encuentran subrayadas las secuencias de restricción para la enzima BamHI (New England Biolabs^R, USA) en *Fwd*, y para Sall (New England Biolabs^R, USA) en *R3.*

Se realizaron *PCRs* en distintas instancias del trabajo, en primer lugar la ya mencionada amplificación de nuestra secuencia de interés, así como también se utilizó esta técnica para corroborar la presencia de nuestra construcción en distintas etapas de la transformación, para esto se realizó un *PCR* de colonias obtenidas. En todos los casos fueron utilizados, como control positivo un

plásmido proveniente de una bacteria transformante de *E.coli* que presentaba la secuencia de interés (pENTR2b-PRK2) y como negativo un *mix* de reacción sin ADN.

El *mix* para cada reacción, con un volumen final de 49 μ l, estuvo compuesto de la siguiente forma:

Taq DNA Polymerase PCR Buffer is a 10X buffer	5 µl
dNTP´s (10 mM)	1 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
MgCl₂ (50 mM)	4 µl
H₂O	36 µl
Enzima Taq polimerasa (1.25 unit)	1 µl

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador *Masterclass personal* (Eppendorf^R, Alemania), donde se programaron 40 ciclos con las siguientes características:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	5
	94	0.5
40	60	0.5
	72	1.5
1	72	5

Con el fin de corroborar la correcta incorporación de *kinprk2* en el vector pGEM-T Easy, se realizó una PCR de colonias. Las colonias aisladas obtenidas de la transformación fueron repicadas en placas de LB ampicilina (100 µg/ml), y se dejaron crecer *toda la noche* a 37°C. A partir de estas, se realizó una PCR con los cebadores universales SP6 y T7 (*forward y reverse* respectivamente), los cuales amplificaron las regiones que abarcaban a nuestro inserto *kinprk2*. El ciclado para esta reacción de PCR fue el mismo que se desarrolló anteriormente, con la diferencia de que la temperatura de *annealing* fue de 52°C.

SP6: 5'-ATTT AGGT GACA CTA TAG -3'

T7: 5'- TAAT ACGA CTCA CTAT AGGG-3'

También se realizó PCR de colonias para comprobar la presencia de la construcción tanto en las cepas de *E. coli* JM109 como en XL1-Blue, en este caso con nuestros cebadores *R3* y *Fwd*, con el ciclado descripto en primera instacia.

Se picó con la punta de un tip en mechero cada muestra de colonia, mientras que se utilizó como control negativo un *mix* sin ADN, y como control positivo un *mix* con ADN plasmídico extraído de un cultivo que contaba con la construcción pENTR-2B-*PRK*2. Los resultados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, y visualizados en transiluminador UV.

En el caso del *PCR* de las colonias obtenidas, el volumen final fue de 20 μ l, y el *mix* de reacción estuvo compuesto de la siguiente forma:

Taq DNA Polymerase PCR Buffer is a 10X buffer	2 µI
dNTP´s (10 mM)	0.4 µl
Primer forward (10 µM)	0.9 µl
Primer reverse (10 µM)	0.9 µl
MgCl₂(50 mM)	1.6 µl
H₂O	13.2 µl
Enzima Taq polimerasa (1.25 unit)	1 µl

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa fue utilizada en distintas etapas para separar, purificar y visualizar fragmentos de ADN según su tamaño. La tasa de migración del ADN en estos geles está determinada por una serie de factores como el tamaño de la secuencia de interés, la concentración de agarosa, la conformación del ADN, la presencia de agentes intercalantes tanto en el buffer como en el gel, y el voltaje aplicado (Sambrook & Russell, 2001). En nuestro caso se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (0.04 M Trisacetato, 0.001 M EDTA). El agente intercalante utilizado fue GelRede, y las muestras fueron cargadas con loading buffer 4x (Bromophenol blue 0.05 m/v; Xylenecyanol blue 0.1% m/v; Glicerol 30 %; EDTA pH 8.0 50 mM). La corrida electroforética fue realizada en una cuba (Enduro^R Electrophoresis systems) con el gel sumergido en buffer TAE 1X, conectado a una fuente de poder a un voltaje de 100 V y 90 mA durante 40 minutos . Fue utilizado un marcador de peso molecular correspondiente al ADN del fago lambda digerido con Pstl. Este también nos permitió estimar la concentración de las bandas debido a que corresponde a 0.5 ng de ADN por carril, digerido en 29 fragmentos de tamaño conocido, por lo que es posible comparar intensidad de bandas con las del marcador. La visualización de la técnica se realizó en el transiluminador UV del Laboratorio de Virología Molecular (C.I.N).

Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR fue realizada a partir del *PCR Purification kit* (Quiagen^R, Alemania), siguiendo el protocolo especificado por el fabricante, donde se utilizó la columna del kit para retener el ADN debido a las altas concentraciones salinas que presentan los *buffers*, mientras que todos los contaminantes se pierden en los lavados, y luego se realiza la elución de forma de obtenerlo purificado. El producto de la purificación se guardó a -20°C.

Incorporación del producto de PCR al vector pGEM-T easy

El producto de *PCR* purificado, *kinprk2*, fue incorporado al vector pGEM-T easy (Promega^R, USA), el cual es un vector linealizado que presenta dos timinas, una en cada extremo cohesivo 3´ libre, que permite clonar los productos de PCR. Este último fue utilizado para facilitar la incorporación de nuestra secuencia en el vector de expresión. Se llevó a cabo la ligación del vector T con el inserto, donde a partir de un gel de agarosa se determinó la concentración del inserto, en función de las concentraciones conocidas de las bandas del marcador de peso molecular *\lambda*/Pstl. Se preparó la mezcla de reacción para la ligación, donde

se estableció una relación 2:1 inserto vector utilizando 1 µl de enzima correspondiente a 400 unidades de la *T4 DNA ligase* (New England Biolabs^R), 5 µl de Buffer 2*X T4 DNA Ligase Reaction Buffer*, 1 µl de inserto correspondiente a 92 ng, y 1 µl de vector correspondiente a 50 ng de vector y 2 µl de agua *milli-* Q para llevar a un volumen final de reacción de 10 µl. La reacción de ligación se desarrolló a 4°C toda la noche.

Digestión de ADN con enzimas de restricción

Mediante el uso de endonucleasas de restricción fueron digeridos el vector pGEM-T easy, en el cual se encontraba *kinprk2*, y el vector vacío pQE30 (Qiagen^R, Alemania), seleccionado para contener nuestra construcción, el cual cuenta en su extremo N-terminal con el *tag* 6xHis (cola de polihistidina), que vamos a utilizar para reconocer y separar nuestra proteína, (Figura 13). Ambos plásmidos presentaron sitios de corte para las enzimas BamHI y Sall (New England Biolabs^R, USA), y las mezclas de reacción se llevaron a cabo añadiendo, en el caso de la construcción en el vector pGEM-T easy, 20 unidades de cada enzima, 8 µl de agua *milli-Q*, 2 µl de *NEB Buffer 3.1*, y 8 µl del vector que corresponden a 390 ng, en un volumen final de 20 µl. En el caso del vector vacío pQE30, en un volumen final de 30 µl, se añadieron 20 unidades de cada enzima, 3 µl de *NEB Buffer 3.1*, y 25 µl del vector que corresponden a 472 ng.

La reacción de digestión se desarrolló durante 3 horas a 37°C en termoblock. En los distintos casos las digestiones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa, siendo visualizadas en transiluminador UV (Sambrook & Russell, 2001).



Extracción de bandas del gel de agarosa

A partir del gel de agarosa en el que se corrieron las digestiones realizadas con endonucleasas de restricción, se cortaron las bandas de interés, las cuales corresponden a nuestra secuencia, *kinprk2* obtenida del vector pGEM-T easy, así como el vector pQE30 vacío linealizado. Estas fueron colocadas en tubos *eppendorf* de 1.5 ml para realizar la extracción del ADN de las bandas del gel a partir del *PCR extraction kit* (Qiagen^R, Alemania), siguiendo las indicaciones del protocolo de este. Las muestras de ADN obtenidas fueron conservadas a -20°C (Sambrook & Russell, 2001).

Ligación de la secuencia de interés con el vector de expresión

Se llevó a cabo la reacción de ligación (Figura 14) entre *kinprk2* y el vector vacío pQE30. A partir del gel de agarosa correspondiente a la purificación de las muestras se determinó la concentración del inserto y el vector, en función de las concentraciones conocidas de las bandas del marcador de peso molecular *N*Pstl. Se preparó la mezcla de reacción para la ligación, donde se estableció una relación 3:1 inserto vector, en un volumen final de 30 µl añadiendo, 1 µl de enzima que corresponde a 400 unidades de *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs^R, USA), 3 µl de *10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer*, 3.5 µl de agua *milli-Q*, 10 µl de ADN molde de kinprk2 que corresponde a 74 ng, y 12.5 µl de ADN molde de pQE30 que corresponde a 25 ng, ambas muestras de ADN provenientes de las digestiones previas. La mezcla fue incubada durante una hora a 25°C, y 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. El producto de ligación se conservó a -20°.



incorporado.

Transformación de bacterias

Una vez obtenida la construcción, se buscó incorporarla en bacterias *E.coli* XI1-Blue. Esto se llevó a cabo colocando el producto de ligación pqe30-*kinprk2* con 100 mM de células quimiocompetentes de *E.coli* XI1-Blue en un tubo *eppendorf.* Estas se dejaron reposar 30 minutos en hielo, luego se les aplicó un *heatshock* a 42°C por 40 segundos, y por último con el agregado de 200 µl de medio LB, se las incubó una hora en estufa a 37°C con agitación a 220 rpm. El fin de este último paso fue el desarrollo de la resistencia a la ampicilina por parte de las bacterias, para luego plaquearlas en LB ampicilina (100 µg/ml) *toda la noche* a 37°C, en dos placas, una con 50 µl, y otra con el resto, alrededor de 280 µl, para asegurarnos obtener una proporción adecuada de colonias aisladas en alguna de las dos placas.

Luego de intentar realizar los siguientes pasos del trabajo con las bacterias transformadas de la cepa XI1-Blue, se decidió utilizar otra cepa de *E.coli*, JM109, ya que esta era recomendada para la expresión proteica por el manual *theQIAExpressionist* (Qiagen^R, Alemania).

Para llevar a cabo esta transformación se empleó otro protocolo, entre las ya transformadas *E.coli* XL1-Blue *kinprk2*-pQE30, y colonias de *E.coli* JM109. Esta transformación rápida se basó en la resuspensión de una anzada de *E. coli* JM109 en 100 µl de CaCl₂ 0.1 M, dejando reposar en hielo durante una hora. Luego se agregaron 100 ng de plásmido proveniente de una *miniprep* de *E.coli* XL1-Blue *kinprk2*-pQE30, repitiendo el paso de reposo en hielo durante una hora. En este momento se le aplicó un *heatshock* durante 3 minutos a 37°C, y se le agregó 400 µl de medio LB, colocando en estufa a 37°C durante una hora con agitación a 220 *rpm*. Por último se repitió el paso final del método de transformación descrito anteriormente, en donde se plaqueó por un lado 50 µl de esta reacción en una placa de LB ampicilina (100µg/ml), y el resto en otra placa igual, creciendo *toda la noche* a 37°C, para asegurarnos de obtener colonias aisladas en alguna de las dos placas.

Secuenciación de la construcción y análisis bioinformático

Para evaluar el resultado de nuestra transformación, se envió a secuenciar el ADN plasmídico extraído de una colonia de *E.coli* JM109 transformada con nuestra construcción, pQE30-*kinprk2*, a la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Además de nuestra muestra de ADN en una concentración de 250 ng/µl, se enviaron los cebadores (15 ng de c/u) PR31, PR35 y pQE30 *sense*.

Pr31 : 5-GAGG TCTT GTTG GTTG CCAG GCTT CAAC-3

Pr35 : 5-CCAA CCAT GGCA GCTG TTGT TCT-3

pQE30 Sense : 5-TTT ATT TGC TTT GTG AGC GGA T -3`

Se utilizaron distintos *cebadores* para asegurarnos de que todas las regiones de nuestro inserto fueran secuenciadas, de forma de que abarcaran toda la región de interés, ya que con un solo cebador no era posible cubrir toda la secuencia del inserto. La secuencia obtenida fue analizada mediante el programa bioinformático *Bioedit* (Hall, 1999).

Expresión del dominio quinasa

Para llevar a cabo la expresión de nuestra proteína, se siguieron las indicaciones del protocolo de *theQIAExpressionist*. Se desarrolló en dos etapas, las cuales se realizaron tanto para un cultivo de bacterias con nuestra construcción pQE30-*kinprk2*, como para un cultivo con el vector vacío, utilizado como control.

<u>Crecimiento de cultivo</u>: Se inoculó previamente 10 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina, y se dejó creciendo con agitación a 220 rpm toda la noche a 37°C. Posteriormente se inoculó en un *erlenmeyer* de 1000 ml, 2.5 ml del cultivo anterior, con 140 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina, y se incubó con agitación a 220 rpm y 37°C hasta alcanzar una densidad óptica OD₆₀₀ entre 0.5-0.7. Una vez alcanzada la densidad óptica de interés, y previo al agregado del agente inductor, se tomaron 20 ml para controles sin inducir de ambos cultivos (nuestra construcción y control).

Se indujo la expresión con el agregado de IPTG en una concentración final de 1 mM. El IPTG es un análogo no hidrolizable de la alolactosa, y actúa como inductor debido a que desencadena la transcripción del operón lac, el cual se encuentra en nuestra construcción (Sambrook & Russell, 2001). Como paso final de esta etapa, se centrifugaron las muestras a 4000 x g por 20 minutos, descartando el sobrenadante.

Extracción de las proteínas mediante lisis celular: El pellet proveniente de la centrifugación anterior se resuspendió en 1980 µl *buffer* Tris 20 mM pH 8, con 20 µl de PMSF, en una concentración final de 1 mM, el cual actúa como inhibidor de proteasas de serina. Las células fueron lisadas mediante ultrasonido con un sonicador del Institut Pasteur de Montevideo, utilizando el *microtip* del mismo, donde se llevaron a cabo 6 ciclos de 20 segundos al 30 % de potencia del sonicador, con 10 segundos de pausa entre cada ciclo. Los lisados fueron conservados en hielo, para luego ser centrifugados a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante en tubos *eppendorf* en el que se llevó a cabo la centrifugación, se resuspendió el pellet, correspondiente a la fracción

insoluble, en 495 µl del *buffer* Tris 20 mM ph 8, con 5 µl de PMSF en concentración final de 1 mM, ya que luego de la centrifugación anterior, el PMSF previamente agregado quedó en la fracción soluble. Ambas fracciones, solubles e insolubles, fueron conservadas a -20°C, para luego ser cuantificadas y analizadas por SDS-PAGE.

Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas presente en las distintas muestras fue cuantificada mediante el método de Bradford. Se realizó una curva de calibración con muestras de BSA (seroalbúmina bovina) de distintas concentraciones (0.01 M, 1 M y 10 M), junto con el reactivo de *Bradford* (100 mg de *Coomassie Brilliant Blue* G-250; 50 ml de etanol;100 ml de ácido fosfórico al 85%; H₂O *milli-Q*). Las muestras recibieron un tratamiento en el que a 25 µl de cada muestra se le adicionó 1.25 ml de reactivo de *Bradford*, y luego de 5 minutos se realizaron las medidas de absorbancia a 595 nm. A partir de las medidas de absorbancia, se determinó mediante nanodrop (Thermo Fisher Scientific^R, USA) la concentración proteica de cada muestra (Sambrook & Russell, 2001).

Análisis SDS-PAGE

Las distintas muestras proteicas fueron sometidas a un análisis SDS-PAGE, donde se realizaron corridas electroforéticas a 170 V con la intensidad liberada, durante 2 horas 20 minutos, para la visualización de nuestras proteínas. El gel de poliacrilamida fue preparado en dos etapas correspondientes a un *lower* gel y un upper gel. El lower gel, el cual se preparó con una mayor concentración de acrilamida que el upper gel, de forma de provocar el retardo de las proteínas, estuvo compuesto por poliacrilamida al 12%. Para lograr esto, se agregó 3.5 ml de agua milli-Q, 2.5 ml de 4x lower buffer pH 8 (36.4% Tris-HCl, 0,8% SDS), 4 ml de acrilamida:bis acrilamida 30%, 33.3 µl de APS 10 % y 9.3 µl de Temed, en un volumen final de 10 ml. El upper gel, el cual contó con una menor concentración de acrilamida de 3.8% para que se diera el apilamiento de las muestras, estuvo constituido por 2.41 ml de agua milli-Q, 1.04 ml de 4x upper buffer pH 6.8 (6,05% Tris-HCl, 0,4% SDS), 560 µl de acrilamida:bis acrilamida 80%, 16 µl de APS 10 % y 8 µl de Temed, en un volumen final de 4 ml. Se dejaron polimerizar ambas partes del gel, primero el lower gel y luego el upper gel.

Las muestras fueron preparadas a partir de la mezcla de 10 µl de *Sample buffer* 4x (Tris 0.755 g; 10 ml glicerol, 2 g SDS, 5 ml de b-mercaptoetanol, 0.001 g de *bromophenolblue*, en un volumen final de 25 ml), con distintas cantidades de muestra proteica y Tris base 20 mM, para ecualizar la concentración de los distintos extractos en cada carril, de forma de evitar tener diferencias de concentración entre los carriles, en un volumen final de 40 µl. Antes de cargar

las muestras en los pocillos, estas fueron sometidas a una desnaturalización térmica a 100°C en *termoblock* durante 5 minutos y colocadas en hielo. La corrida se llevó a cabo con *running buffer 1x* (250 ml *running buffer 4x* (3 g Trisbase, 14.4 g glicina), 750 ml agua *milli-Q*, 1% SDS), en una cuba conectada a la fuente de poder a 170 V y 390 mA durante 2 horas 20 minutos.

Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel fue teñido con una solución de *Coomasie* (0.4 g *Coomasie brilliant blue*, 250 ml de isopropanol, 100 ml ácido acético), durante 30 minutos con agitación, con posterior reposo *toda la noche* en agua destilada a 4 °C. El desteñido se realizó en dos pasos con agitación, primero con la solución 1 (40% alcohol etílico absoluto, 7% ácido acético glacial, agua destilada), y luego con la solución 2 (40% alcohol etílico absoluto, 14% ácido acético glacial, agua destilada), durante 30 minutos cada paso.

Purificación de la proteína recombinante

La purificación de la proteína de interés se llevó a cabo utilizando el *Ni-NTA spin kit (*Qiagen^R, Alemania), donde se siguieron las indicaciones del protocolo de purificación bajo condiciones desnaturalizantes de lisados celulares provenientes de *E. coli*. Este kit se basa en la separación y purificación de proteínas recombinantes que poseen una cola de seis residuos de histidina, obtenidas de cultivos de expresión en pequeña escala. A partir de la alta afinidad que presentan los iones de níquel por la resina inmovilizada de NTA (ácido nitrilotriacético) ubicada en la columna, y la alta especificidad de la interacción de la cola de polihistidina con estos iones, se logra la retención y posterior purificación de la proteina. Tanto el *flow through*, cómo los dos lavados, y las dos eluciones se guardaron a -20 °C para su posterior análisis mediante SDS-PAGE.

Detección de la proteína mediante ensayo Western Blot

Con el fin de identificar nuestra proteína, tanto en los productos purificados, como en el extracto proteico sin purificar, se llevó a cabo un *Western Blot*, siguiendo los pasos que indica el protocolo publicado en Ausubel *et al.*, (2003). Este experimento se basa en primer lugar, en la separación de las proteínas en función de su tamaño, en un SDS-PAGE, en las mismas condiciones descritas anteriormente, para luego realizar la electrotransferencia desde el gel a una membrana de nitrocelulosa.

En la corrida electroforética se utilizó el marcador molecular PierceTM *Prestained Protein MW Marker* (Thermo Scientific^R, USA), el cual jugó un papel fundamental para la interpretación del resultado. Una vez realizado el SDS-PAGE, se equilibró el gel en *buffer* de Transferencia (Tris-base 1.52 g; glicina 7.21 g; 100 ml metanol, 250 ml agua *milli-Q*). Se recortó la membrana de modo que quede del mismo tamaño que el gel, se la humedeció en agua *milli-Q*, y se

dejó reposar 5 minutos en buffer de Transferencia. El papel de filtro y las esponjas que forman parte del cassette de transferencia también se humedecieron en este buffer. A partir de este punto, se llevó a cabo el ensamblado del sandwich de transferencia dentro del cassette, donde se colocó sobre el cátodo (electrodo negativo de la cuba electrolítica) en el siguiente orden, esponja, papel de filtro, el gel, la membrana, dos papeles de filtro y esponja, cerrando así el cassette por el ánodo, y colocándolo en la cuba de transferencia. El cassette se llenó con 350 ml de *buffer* de Transferencia, y se colocó 1.8 litros de agua milli-Q en la cuba. La transferencia se realizó a 30 V durante 2 horas, liberando la intensidad. Una vez finalizada, se desensambló el cassette, colocando la membrana en una bandeja pequeña, con 20 ml de solución de Ponceau (Ponceau S, 0.02 g; ácido acético glacial 1 ml; 20 ml agua milli-Q), para confirmar la transferencia a partir de esta tinción, con posterior lavado con agua destilada. Luego se realizó el bloqueo de la membrana con 100 ml de buffer de Bloqueo (leche en polvo 5 g; buffer de lavado (Tris-HCl 1.57 g; NaCl 8.76 g; Tween 20 1 ml, agua milli-Q 1 litro) 100 ml), toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Al día siguiente se realizó la incubación de la membrana con la dilución del anticuerpo primario, la cual fue 1/2000 en buffer de bloqueo en un volumen final de 10 ml, durante 1 hora a temperatura ambiente, con 5 lavados posteriores de 12 minutos cada uno en buffer de Lavado pH 7.5. Este anticuerpo reconoce como epítope colas de polihistidina (6x), la cual se encuentra en nuestra construcción. Luego, se incubó en las mismas condiciones con la dilución del anticuerpo secundario de cabra anti inmunoglobulina G de conejo, conjugado a la peroxidasa de rabanito, la cual en presencia de sus sustratos, peróxido y luminol, produce una reacción guimioluminiscente, que es detectada por autorradiografía. La dilución del anticuerpo secundario fue de 1/10000 en buffer de bloqueo, en un volumen final de 20 ml, repitiendo el paso de lavado. Una vez realizado esto, se incubó la membrana con la solución del kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific^R, USA) durante 5 minutos en oscuridad, la cual contiene los sustratos para la reacción quimioluminiscente desencadenada por la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario. La membrana fue envuelta en papel film, y se pegó dentro del cassette para revelado de films, para realizar dentro del cuarto oscuro, solamente en presencia de la luz roja, la exposición de las películas a distintos tiempos(2 minutos, 1.30 minutos, 30 segundos, 20 segundos). Luego de la exposición, se dejó reposar las películas durante 16 minutos en solución de revelado (0,02% metilfenidona. 0.5% hidroquinona. 10% sulfito de sodio. 0.5% hidróxido de potasio, 6% tiocionato de amonio), con posterior lavado con agua, y incubación durante 5 minutos en solución de fijado (15% tiosulfato de sodio, 5% sulfato de sodio). Se dejaron secar las películas y se analizaron sobre la membrana pegada al cassette, de modo de tomar como referencia el marcador de peso molecular y poder marcar carriles e interpretar bandas obtenidas.

Resultados y discusión

Diseño y construcción del vector de expresión

En la búsqueda de incorporar nuestra secuencia, *kinprk*2, en un vector de expresión, en primer lugar se partió de un glicerol correspondiente a una colonia de *E. coli XL1-Blue*, la cual contenía el vector pENTR2b-PRK2. Este glicerol fue plaqueado en medio LB con selección para ampicilina (100 μ g/ml), y crecido toda la noche a 37°C.

A partir de esta placa, se creció un cultivo líquido con las colonias correspondientes, en medio LB con selección para ampicilina (100 μ g/ml) a 37°C y 220 *rpm* toda la noche. Se realizó una extracción de ADN plasmídico, y éste fue cuantificado con nanodrop (Thermo Fisher Scientific^{*R*}, USA). La concentración fue de 468.8 ng/µl, con un índice de pureza de 1.81.

Una vez extraído el plásmido pENTR2b con *PRK*2, se realizó la amplificación de la región quinasa de PRK2, *kinprk*2 por PCR, a partir de los *cebadores Fwd* y *R*3. *Fwd*, correspondiente al cebador *forward* (hacia adelante), fue diseñado conteniendo en su secuencia el sitio de restricción para la enzima BamHI, flanqueando el extremo N-terminal de nuestra secuencia, mientras que *R*3, fue diseñado conteniendo el sitio de restricción para la enzima Sall, delimitando el extremo C-terminal de *kinprk*2, que abarca todo el dominio quinasa por PCR.

Se llevó a cabo la amplificación de *kinprk2* a partir de la *miniprep* anteriormente mencionada, por triplicado, para obtener más cantidad de producto de PCR. El control negativo utilizado fue un *mix* de reacción sin ADN. Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa 1% para ser analizados, y visualizados en un transiluminador UV, pudiéndose observar una banda con un tamaño esperado, correspondiente al inserto, de 1.1 kb (Figura 6). Posteriormente se realizó la purificación del producto de PCR.



Figura 6 Amplificación de kinprk2 por PCR. 1, 2 y 3: amplificación de kinprk2. 4: control negativo. 5: Marcador de peso molecular Pstl.

En busca de facilitar la construcción, y de asegurarnos que nuestras enzimas de restricción clivaran el producto de interés, se optó por incorporar el producto de PCR purificado en el vector pGEM-T Easy (Promega, USA), ya que este garantiza el correcto anclaje enzimático de las enzimas de restricción en la secuencia. Este es un vector linealizado de 3015 pares de bases, que presenta en sus dos extremos cohesivos 3'libres una timidina, mientras que los productos de PCR que son sintetizados por polimerasas termoestables como la nuestra, añaden en sus extremos una desoxiadenosina libre. Se llevó a cabo la ligación del producto con el vector pGEM-T easy a 4°C toda la noche.

A continuación se realizó la digestión de pGEM-T Easy-*kinprk*2 y el vector de expresión pQE30.

En un principio, el vector de expresión seleccionado había sido el pQE60 (Qiagen, Alemania), el cual contiene el promotor T5 y el sitio de inicio de transcripción para este, el elemento del operador *lac*, un origen de replicación *ColE1*, un sitio de clonado múltiple y una cola de polihistidina *6x-hys tag*, además de dos terminadores transcripcionales (Lambda t_o y rrnB T1) y la secuencia codificante para la β -lactamasa, que es quien proporciona la resistencia al antibiótico ampicilina.

El inconveniente que se presentó con este vector, fue que las enzimas seleccionadas, BamHI y Ncol, producían extremos cohesivos en los que había un grado de complementariedad relativamente alto, dado que por lo menos tres bases se podían aparear, y esto resultó en la religación del vector vacío digerido, sin la incorporación de *kinprk*2.

Luego de varios intentos sin éxito con este vector, se cambió al plasmido pQE30, el cual es muy similar al anterior, pero se diferencia en que posee seis sitios de restricción más que pQE60, ya que este presentaba sitios solamente para tres enzimas, y esta era la principal limitante, mientras que el pQE30 presenta 9 sitios de restricción en el sitio de clonado múltiple.

La otra diferencia que presentan estos dos vectores corresponde a la ubicación de la cola de polihistidina (6x), ya que en el pQE60 se encuentra en el

extremo C-terminal del sitio de clonado múltiple, mientras que en el pQE30 se encuentra en el extremo N-terminal de este. Cabe destacar la importancia de esta cola de polihistidina para nuestro trabajo, ya que actúa como epítope para el anticuerpo primario utilizado en el ensayo final de *Western Blot,* así como quelante de los iones de níquel presentes en la columna de purificación en el paso previo.

La digestión (Figura 7) se realizó a partir de una *miniprep* de *E.coli XL1-Blue* con el vector pQE30 vacío, que presentaba una concentración de ADN plasmídico de 79 ng/µl con un índice 260/280 de 1.8; y de la ligación del producto de PCR con el vector pGEM-T easy.

Las enzimas seleccionadas fueron BamHI y Sall, las cuales favorecieron el desarrollo de la construcción ya que no produjeron extremos complementarios en los productos de digestión, lo que hubiera generado complicaciones en la etapa de ligación, como la recircularización de nuestro vector.



La visualización de la digestión y la posterior extracción de bandas se realizó a partir de una corrida electroforética en gel de agarosa 1%. Se puede observar que en el carril 3, en el que se corrió la muestra pGEM-T easy-*kinprk2*, se observan dos bandas, la inferior de 1.1 kb correspondiente al inserto y otra banda de 3.0 kb correspondiente al vector vacío.

La banda observada en el carril 2, correspondiente al vector pQE30 vacío, se observa un poco por encima a la del vector pGEM-T easy vacío, ya que cuenta con aproximadamente 0.4 kb más.

Las bandas extraídas fueron las correspondientes al vector pQE30 linealizado, de 3.4 kb, y la banda de 1.1 kb correspondiente a *kinprk*2. Estas fueron cuantificadas estimando su concentración en función de las bandas de concentraciones conocidas del marcador de peso molecular λ PstI.

Transformación de bacterias competentes y análisis de la construcción

Una vez realizada la construcción, se buscó incorporarla en bacterias competentes *E.coli XL1-Blue*. Se llevó a cabo la transformación de estas, como se describe en materiales y métodos, y se cultivaron de forma de obtener colonias aisladas, en placas de LB ampicilina (100 µg/ml), toda la noche a 37°C. Se reaislaron 25 colonias, en las mismas condiciones anteriormente mencionadas, de las cuales crecieron 19. De estas 19, se seleccionaron 10 para realizar un PCR de las colonias obtenidas, buscando amplificar *kinprk2* de forma de corroborar la correcta incorporación y la presencia de nuestra construcción en estas.

Se utilizaron los mismos *cebadores* que en las reacciones de PCR anteriores, *Fwd y R3*, y como control positivo se utilizó una *miniprep* de pENTR2B-PRK2, mientras que como control negativo se utilizó un *mix* de reacción sin ADN. Los productos del PCR de colonias fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa 1%.

Como se observa en la Figura 8, solo se obtuvo la amplificación de la colonia 5, que presenta una banda a la altura esperada ya que *kinprk2* es de 1121 pb. El que solo se haya obtenido la amplificación de una colonia puede deberse a una religación del vector sin haber incorporado nuestra secuencia, ya que en este caso igual podría crecer en el medio selectivo porque la resistencia a ampicilina se encuentra en el vector.



Figura 8: gel de agarosa para el análisis de transformantes. c-: control negativo, c2 a c11: colonias a analizar. c+: control positivo. M: Marcador de peso molecular

Es por eso que se evaluó la posibilidad de que algunas colonias hubieran incorporado el vector pQE30 vacío, religado, con ausencia de *kinprk2*. En este caso, sí tendrían resistencia a ampicilina, ya que la secuencia para que se desarrolle dicha resistencia se encuentra en el vector y no en *kinprk2*. También hay que tener en cuenta que en el PCR de las colonias obtenidas, la muestra no se encuentra de forma pura, sino que es tomada directamente de una placa, por lo que puede haber presencia de componentes que inhiban la reacción de PCR, ya que es una técnica altamente sensible.

La banda correspondiente a la amplificación de *kinprk*² en la colonia 5, se corresponde con el tamaño de la banda del control positivo, a la altura de las bandas del marcador conformado por la digestión del fago lambda con la enzima Pstl, de 1093-1159 pb, siendo que el peso de nuestro inserto es de 1121 pb.

Se pudo observar también, en los carriles que no hubo amplificación una acumulación los cebadores formando dímeros u otras estructuras que se pueden visualizar debido al agente intercalante de ácidos nucleicos utilizado.

Una vez confirmada la correcta transformación de *E.coli* XL1-Blue con pQE30-*kinprk2*, se intentó llevar a cabo la expresión proteica en esta cepa en más de una oportunidad, pero los resultados obtenidos nos llevaron a tomar la decisión de utilizar otra cepa de *E.coli*, JM109, la cual era más adecuada para la expresión proteica que la cepa XL1-Blue, según las recomendaciones del protocolo descrito para el uso de estos plásmidos como vectores de expresión. Para esto se realizó una transformación rápida de la colonia 5 en *E. coli* JM109

Se llevó a cabo una reacción de PCR de las colonias obtenidas, de forma de confirmar la correcta transformación de las bacterias *E.coli* JM109. De las colonias en las que se observó amplificación, se seleccionó una para seguir adelante.

A partir de estas nuevas transformantes de *E.coli* JM109 *kinprk2*-pQE30, se envió a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo nuestra construcción para analizar la misma, y asegurarnos de que se encontrara en el marco de lectura correcto y que no hubieran alteraciones de la secuencia. Se utilizaron tres cebadores diferentes de forma que se abarcara toda la secuencia de *kinprk2*, ya que solo con dos cebadores probablemente nos quedarían regiones sin secuenciar debido al largo de nuestra secuencia. Los *cebadores* utilizados fueron PR31, PR35 y el pQE30-*sense*, donde este último reconoció un segmento final 3´ de 142 bases, mientras que PR31 y PR35 reconocieron desde el extremo 5´ la mayor parte de la secuencia.

Una vez obtenida la secuencia, se llevó a cabo el análisis de esta, y se encontró que la dirección en que fue incorporado *kinprk2* y el marco de lectura eran correctos, pero había ocurrido una inserción de una base, una timina, previo al codón codificante para el último aminoácido de nuestro dominio quinasa (Figura 9-A).

Se llevó a cabo la traducción de la secuencia nucleotídica a través de la plataforma bioinformática *Gene Runner*, para obtener la secuencia aminoacídica, y así evaluar los cambios generados por la inserción de una base mencionada anteriormente.

El análisis evidenció un corrimiento del marco de lectura, lo que generó que después del residuo de prolina, el penúltimo de la secuencia teórica de 380

residuos aminoacídicos, en vez de tener una arginina seguida del codón *stop*, obtuvimos diez aminoácidos antes del codón *stop* (Figuras 9-ByC). Esta modificación a nivel de estructura primaria de nuestro dominio quinasa, provocó el cambio de un residuo de arginina, por diez aminoácidos que fueron los siguientes: Serina-Leucina-Serina-Arginina-Prolina-Alanina-Alanina-Lisina-Leucina-Asparagina.

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCTGGTGAACGAAATTCAGAGTACATCT GTAGATGATACTAGTATTGCAGAATCTTTTCAATATGATTTTTCGGCAATTAGAGCAGCAACA ATGACTTCTCAGATGCTAATAAGCTCGGAGAAGGCGGATTTGGTCCTGTGTACAAGGGTAAG CTTCAAAATGGACAAGAAGTAGCAGTGAAAAGGTTATCAGCAGATTCAGGCCAAGGTGATC1 AGAATTCAAAAATGAGGTCTTGTTGGTTGCCAGGCTTCAACACAGGAATTTGGTTAGGTTGCT GGATTTTGCCTAGACGGAACAGAGCGACTTCTTGTCTATGAGTTTGTTCCCAATGCAAGTCT GACCACTTCTTATTTGATTCAGTTAAACGTAGGCAATTGGATTGGGAAAGGCGATCCAAAATC ATAGGAGGCATTGCTAAGGGAATTCTTTATCTTCATGAGGATTCTAGGCTTCGGATCATTCAC GTGATCTCAAAGCTAGTAATGTTCTACTAGATGCAGAAATGAATCCTAAAATCTCAGATTTTGG CATGGCAAGGCTATTTGAATTAGATGAAACTCAAGGCAGCACAAACAGAATTGTTGGGACCT ATGGATATATGGCACCAGAATATGCAATGCACGGGCAATTTTCTGTGAAGTCAGATGTTTTTA GCTTTGGAGTACTAGTCTTAGAAATTTTAAGTGGCCAAAAAAACACTTGTTTCAGAAATGGAG AATCGGTGGAAGACCTTCTGAGTTTTGCTTGGTCGAGCTGGCGTAATGGAACAACTATAAATT TTGTAGATCCAATGCTGAAGGAAAGCACAGGACTGATTCGTGACATAATGAGAAACATTCACA GCTCAGTAGCTTTTCGTTGAGTCTTCCCATGCCTTCAGGGCCAGCATTCTATATGCACAGTAAT ATTACCGCAGGGACGTCGCTTATTCAAGAATACAACACAAGAGTGACAGACTCTAGTGAACG AGCCAAAAGTAAATCTATTGGTTCATCACGAAATGAGGCGTCCATAACTGAGTTATATCCT TTAAGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAG AŇ

B)

MRGS<mark>HHHHHH</mark>GSLVNEIQSTSVDDTSIAESFQYDFSAIRAATDDFSDANKLGEGGFGPVYKGKLQNGQEV AVKRLSADSGQGDLEFKNEVLLVARLQHRNLVRLLGFCLDGTERLLVYEFVPNASLDHFLFDSVKRRQLDWE RRSKIIGGIAKGILYLHEDSRLRIIHRDLKASNVLLDAEMNPKISDFGMARLFELDETQGSTNRIVGTYGYMAP EYAMHGQFSVKSDVFSFGVLVLEILSGQKNTCFRNGESVEDLLSFAWSSWRNGTTINFVDPMLKESTGLIRD IMRNIHIALLCVQESVADRPTMAAVVLMLSSFSLSLPMPSGPAFYMHSNITAGTSLIQEYNTRVTDSSERAKS KSIGSSRNEASITELYPR

C)

TELYPSLSRPAAKLN

Figura 9:A- Secuencia de *kinprk2* proveniente de la colonia 5. Se observa en gris los codones de inicio y terminación, en rojo subrayados los sitios de corte para *BamHI y Sall*, en amarillo la cola de polihistidina 6x, y en celeste subrayada la inserción de una timina.

B- Secuencia proteica teórica completa con la cola polihys en amarillo y el codón de terminacion en rojo, con el residuo final de arginina subrayado. C- Últimos aminoácidos provenientes de la traducción de la secuencia obtenida por secuenciación. Se observa la perdida del residuo final de arginina de la secuencia teórica, y la incorporación de diez nuevos residuos aminoacídicos (subrayado en celeste), con el codón de terminación en rojo.

Se analizaron las características de la secuencia aminoacídica con la que contábamos, intentado inferir cuáles podrían ser las consecuencias de este cambio a nivel de secuencia del dominio quinasa. Al igual que en la secuencia teórica, se contó con la presencia de una Arg, el cual es un residuo hidrofóbico, de carácter básico con una alta solubilidad. Esta cuenta con un grupo guanidino, el cual es altamente reactivo. Además de la Arg, el cual era el único residuo que estaría en esta región C-terminal de nuestra secuencia teórica, ahora se contaba con cinco residuos hidrofóbicos no polares y de relativamente baja solubilidad,

como son Ala (x2), Leu (x2) y Pro, también con tres residuos polares sin carga, Asp y Ser (x2), ambos de carácter hidrofílico, y con Lys, que como Arg, es un aminoácido de carácter básico, pero es hidrofílico.

Para realmente comprender cómo afectó esta inserción al plegamiento y función de nuestro dominio, se debería haber realizado estudios más profundos acerca de los cambios termodinámicos que sufriría nuestra proteína al experimentar el agregado de nueve nuevos residuos finales, principalmente por las nuevas interacciones que se presentarían entre estos y cómo afectarían a nivel conformacional y funcional. Esto se podría llevar a cabo mediante herramientas de bioinfórmatica estructural que permiten sondear de forma aproximada los cambios generados en una estructura proteica 3D como la nuestra, y así como a través de métodos fisicoquímicos clásicos cuánticos. A pesar de no contar con esta información, se decidió seguir adelante, ya que se consideró que los residuos que se incorporaron no afectaban de forma significativa la basicidad de la región, ya que ninguno era ácido, sino que eran básicos, no polares, o polares sin carga, y que estos no presentaban grupos aromáticos, tiol o imidazol, como podría ser en caso de que fueran otros aminoácidos. Además no afectó nuestra cola de polihistidina que se encuentra en el extremo N-terminal de la secuencia.

Expresión de la proteína recombinante

A partir de nuestra colonia 5, la cual incorporó la construcción kinprk2pQE30, se procedió a desarrollar la expresión proteica de nuestra secuencia, en el sistema de expresión de *E.coli* JM109. Esto se llevó a cabo a partir de dos cultivos de 10 ml de medio LB con selección para ampicilina, uno de la colonia 5, y un control que fue cultivado en paralelo correspondiente a una colonia de *E.coli* JM109 con el vector pQE30 vacío incorporado.

Después de crecer toda la noche dichos cultivos, se inoculó con cada uno de estos a dos cultivos de mayor escala (140 ml) de LB con ampicilina (100 μ g/ml), y se dejó crecer en las condiciones mencionadas en materiales y métodos (ref). A partir de este momento se buscó llegar a una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.5-0.7. El cultivo de la colonia 5 tardó una hora y media en llegar a OD₆₀₀=0.52, y el cultivo del vector pQE30 vacío tardó dos horas en alcanzar una OD₆₀₀=0.53.

Una vez alcanzadas las densidades ópticas correspondientes, se extrajo una muestra de cada cultivo, las cuales serían utilizadas posteriormente como controles previos a la inducción.

El paso siguiente fue la inducción de la expresión de *kinprk2*, mediante el agregado de IPTG a cada cultivo. Se experimentó con distintos tiempos y temperaturas para la inducción, los cuales fueron a 16°C toda la noche con agitación a 220 rpm, a 22°C toda la noche con agitación a 220 rpm, y a 37°C durante 4 horas con agitación a 220 rpm.

Una vez finalizada la inducción se llevó a cabo el paso de lisis celular por sonicación, y se separó la fracción soluble de la lisis celular correspondiente al sobrenadante, y la fracción insoluble que corresponde al *pellet*.

Para resuspender las distintas muestras, en primera instancia se utilizó el *lysis native buffer* pH 8 (NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM) que proporcionó condiciones nativas, pero debido a que obtuvimos degradación proteica en nuestras muestras, se optó por cambiar a continuación al Tris *buffer* 20 mM pH 8, el cual proporcionaba condiciones desnaturalizantes.

Las fracciones provenientes de la inducción toda la noche a 22°C, fueron resuspendidas en el *buffer* Tris 20 mM pH 8, con el agregado de PMSF, el cual es un inhibidor de proteasas de serina. Las muestras de las fracciones solubles e insolubles fueron sometidas a un análisis SDS-PAGE.



Figura10:Análisis SDS-PAGE. 1- Control de la fracción soluble previo a la inducción del vector pQE30 vacío. 2-Control de la fracción soluble previo a la inducción de la colonia 5. 3- Marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific™, USA). 4- Muestra correspondiente a la fracción soluble inducida de la colonia que presenta el vector pQE30 vacío. 5- Muestra correspondiente a la fracción soluble inducida de la colonia 5 que presenta la construcción pQE30-*kinprk2*.

En la figura se muestra el resultado del análisis de la fracción soluble, donde se encontró nuestra proteína (Figura 10).

Se puede observar en el carril 5, en el que se corrió la muestra inducida de la colonia 5 con nuestra construcción, una banda con mayor intensidad que se encuentra un poco por encima de los 40 kDa (banda A), la cual consideramos que corresponde a nuestra proteína, la cual tiene un peso de 41 kDa, dado que no se encuentra una banda con la misma intensidad ni en el control negativo correspondiente al carril 4 que contiene el vector pQE30 vacío sin *kinprk2*, ni en el control de la colonia 5 sin inductor (carril 2). También se observó en el carril 5,

por encima de nuestra banda, un poco por debajo de los 55 kDa una banda de intensidad similar a la nuestra (banda B), y que no se encuentra en los controles.

Fue considerada la posibilidad de que nuestra proteína hubiera sufrido modificaciones post-traduccionales que pudieran aumentar el peso de nuestro dominio quinasa. Al mismo tiempo, no está claro cómo afecta al sistema la expresión de esta proteína, ni la fidelidad de este, ya que se trata de la expresión de una proteína eucariota en un organismo procariota, lo que representa diferencias en cuanto al *pool* de codones de cada uno, además de las modificaciones post-traduccionales, por lo que es difícil afirmar a qué se debe esta banda (Terpe, 2006).

Se llevó a cabo la purificación por columna de níquel de la muestra correspondiente a la fracción soluble de la colonia 5, utilizando el *Ni-NTA spin kit* (Qiagen, Alemania). El análisis y la visualización de la purificación se realizó mediante SDS-PAGE, donde se corrieron junto al marcador Pierce[™] Prestained Protein MW Marker (Thermo Scientific[™], USA), las dos eluciones realizadas, los lavados y el *flow through* (Figura 11).



Figura11: Análisis SDS-PAGE de productos de purificación proteica. 0- Marcador Pierce™ Prestained Protein MW Marker (Thermo Scientific™, USA). 1- Elución 1. 2- Elución 2. 3- Lavados. 4- Flow through.

Se puede observar en los carriles correspondientes a las eluciones 1 y 2, dos bandas que se encuentran un poco por encima de los 40 kDa (bandas A y B), y dada la sensibilidad con la que cuenta este ensayo, asumimos que nuestra proteína fue retenida y purificada.

En ambos carriles 1 y 2, además de las primeras bandas A y B observadas, se observan otras bandas por encima de estas de distintos tamaños, las cuales pueden corresponder a un reconocimiento inespecífico por parte de la columna, dado que no podríamos explicar la presencia de estas por el carácter policsitrónico de las bacterias. Esto es debido a que variaciones en varios kDa, como se observa en la distancia entre bandas, no se correspondería con las modificaciones que podría generar un cambio en el marco de lectura, que no podrían ser mas de algunos residuos aminoacídicos debido a las características de nuestra construcción, ya que cuenta corriente abajo con una serie de codones de terminación, y corriente arriba regiones del vector que no lo permiten.

Identificación proteica mediante ensayo de Western Blot

Con el fin de detectar e identificar la presencia de nuestra proteína en las muestras provenientes del ensayo de purificación anterior, se llevó a cabo un ensayo *Western Blot* (Materiales y métodos).

Este ensayo cuenta con una alta sensibilidad y especificidad. Las muestras fueron sometidas en primer lugar a un SDS-PAGE, donde el gel fue posteriormente electrotransferido a una membrana, la cual fue bloqueada, e incubada con ambos anticuerpos, para luego llevar a cabo la reacción quimioluminiscente de la peroxidasa de rabanito conjugada al anticuerpo secundario.

Las muestras analizadas fueron la primer elución obtenida, E1, proveniente de la purificación por columna, el extracto proteico crudo obtenido de la inducción, y un control negativo del extracto crudo proveniente de la inducción de la colonia que contaba con el vector pQE30 vacío. Además de estas muestras, se sembró el marcador Pierce[™] *Prestained Protein MW Marker* (Thermo Scientific[™], USA), el cual fue transferido a la membrana, y posteriormente marcado en las placas radiográficas para analizar el tamaño de los resultados del ensayo.

Se sometió a las placas a distintos tiempos de exposición, comenzando por 2 minutos, pero dada la gran intensidad de la reacción quimioluminiscente, estos fueron reducidos a 30 y 20 segundos.

Solamente se obtuvo señal en el carril correspondiente a la primer elución (E1), donde se observó una banda a la altura esperada (banda a), del tamaño de nuestro dominio quinasa, por encima de los 40 kDa, confirmando la detección de esta (Figura 12).



Figura 12: Resultado obtenido del ensayo Western Blot. 1- Marcador Pierce™ Prestained Protein MW Marker (Thermo Scientific™, USA). 2- Muestra correspondiente a la elución 1 proveniente de la purificación por columnas NiNTA. 3- Extracto crudo proveniente de la inducción proteica.

También se pudo observar, un poco por debajo y de menor intensidad, dos bandas (bandas b y c), las cuales se consideró que podían deberse al carácter policistronico de *E.coli*, pero considerando que los seis residuos de histidina presentes en nuestro dominio quinasa se encuentran en el extremo N-terminal, unas pocas bases después del primer residuo de metionina, si se debiera a productos peptídicos sintetizados en otro marco de lectura, estos no podrían ser de menor tamaño, ya que no contarían con la cola de polihistidina, y de esta forma no podrían ser detectados tanto por los residuos de níquel presentes en la columna de purificación, como por el anticuerpo primario anti-*Hys.* También se consideró que pudiera haber ocurrido una terminación prematura de la traducción por tratarse de una proteína eucariota en un sistema procariota. En ese caso, dichos productos prematuros igual podrían ser detectados ya que la cola de polihistidina se encuentra en el extremo N-terminal de la secuencia.

No se le puede atribuir el tamaño de dichas bandas, a la presencia de modificaciones post-traduccionales, dado que en este caso deberíamos encontrarnos con bandas de mayor peso molecular. También se consideró que estas bandas podrían deberse a que la proteína hubiera sufrido un clivaje por alguna enzima proteolítica, o en un caso menos probable que se trataran de una interacción inespecífica del anticuerpo con la membrana debido a un mal bloqueo con el *buffer* de bloqueo, pero en esta situación esperaríamos ver interacciones inespecíficas de forma aleatoria y no solo en el carril de la elución.

El que no se haya obtenido señal en el carril 3 correspondiente al extracto crudo proveniente de la inducción proteica de la colonia que contaba con la

construcción, se puede explicar debido a que la concentración en esta muestra era mucho menor a la elución proveniente de la purificación, por lo que este pudo haber sido el motivo por el que no se obtuvo señal.

Conclusiones finales

A partir de los resultados obtenidos es posible afirmar que se cumplió con el objetivo principal de llevar a cabo la expresión proteica de *kinprk*2. Se pudo observar en el ensayo de *Western Blot* la detección del eluído proveniente de la purificación proteica por columna de níquel.

El objetivo fue logrado a pesar de haber sufrido la inserción de una base en nuestra secuencia, inserción que no conocemos con claridad como afectó al plegamiento y la función de nuestra proteína, pero que podríamos analizar mediante un ensayo quinasa, el cual detecta mediante una reacción luminiscente la actividad quinasa.

Además, también es posible que el sistema de expresión haya experimentado variaciones, ya que no sabemos cómo afecta a la expresión el hecho de que se trate de una proteína de origen eucariota en un sistema de expresión procariota. Así como también es posible que la proteína haya sufrido modificaciones post-traduccionales, y este sea el motivo por el que en distintas etapas del trabajo se observan algunas bandas de distintos tamaños.

Se logró la expresión de la proteína en estado soluble, lo que permite en un futuro avanzar en la determinación de la función del receptor PRK2, y determinar cual es el papel que este desempeña en la percepción de microorganismos patógenos y en la activación de la respuesta inmune de la planta.

También, es posible a partir de la proteína desarrollar anticuerpos para en un futuro abordar y solucionar los problemas y las pérdidas que provocan los patógenos como *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* en alimentos de importancia mundial como es la papa (*Solanum tuberosum*).

Bibliografía

Albert, M., Jehle, A.K., Mueller, K., Eisele, C., Lipschis, M., Felix, G. (2010) Arabidopsis thaliana pattern recognition receptors for bacterial elongation factor Tu and flagellin can be combined to form functional chimeric receptors. J Biol Chem 285:19035–19042

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408:796–815

Asai, S., Ohta, K., & Yoshioka, H. (2008). MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Bursts in. *Source: The Plant Cell*, *20*(5), 1390–1406.

Baluska, F., & Vivanco, J. (2012.). Signaling and Communication in Plants Series Editors. Baneyx, F., Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat. Biotechnol., 22, pp. 1399-1408

Bari, R., Jones, J.D.G. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol Biol 69:473–488

Birch, P. R. J., Bryan, G., Fenton, B., Gilroy, E. M., Hein, I., Jones, J. T., Toth, I. K. (2012). Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable? Food Security, 4(4), 477–508.

Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, *60*(1), 379–406.

Boller, T., He, S.Y. (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. Science 324:742–744

Bostock, R.M. (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. Annu Rev Phytopathol 43:545–580

C*. Mehdy, M. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. Plant physiology (Vol. 105).

Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. Biotechnology Advances, 30(5), 1102–1107.

Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, *18*(8), 1247–1256.

Collmer A, Keen NT, (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology 24, 383–409.

Dodds, P.N., Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. Nature Reviews 11:539-548

Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. Annual Review of Phytopathology, 42(1), 185–209.

Flor H.H. (1971) Currents status of gene-for-gene. Annv. Rev. Phytopatol. 9: 275-296.

Foyer, C. H., Lelandais, M., & Kunert, K. J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92(4), 696–717.

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol. Plant Microbe Interact., 19, pp. 711-724

Georgiou, G., Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli. Curr. Opin. Biotechnol., 7, pp. 190-197

Goldman E, Rosenberg AH, Zubay G, Studier FW (1995) Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in Escherichia coli. J Mol Biol 245:467–473

Gou, X., He, K., Yang, H., Yuan, T., Lin, H., Clouse, S.D., Li, J. (2010) Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptorlike protein kinase genes in Arabidopsis thaliana. BMC Genomics 11:19

Hagg, P., de Pohl, J., Abdulkarim, F., Isaksson, L. (2013). A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in Escherichia coli. Cell, 152, pp. 327-339

Hall. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41.

Hanks, S.K. and Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence data base: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. Meth Enzymol. 200, 38–62

Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domain. Science, 241, 42–52.

Haque, M. E., Abe, F., Mori, M., Oyanagi, A., Komatsu, S., & Kawaguchi, K. (2014). Characterization of a wheat pathogenesis-related protein, TaBWPR-1.2, in seminal roots in response to waterlogging stress. *Journal of Plant Physiology*, *171*(8), 602–609.

He, S.Y., Nomura, K., Whittam, T.S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. BBA Mol. Cell Res., 1694, pp. 181-206

Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, *89*(5), 503–512

Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W., Deising H.B. (2011). When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. J. Plant Physiol., 168, pp. 51-62 Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel D.(1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, pp. 4800-4805.

Jamieson, P. A., Shan, L., & He, P. (2018). Plant cell surface molecular cypher: Receptor-like proteins and their roles in immunity and development. Plant Science, 274, 242–251.

Johnson, M., Coulton, A.T., Geeves, M.A., Mulvihill, D.P. (2010). Targeted amino-terminal acetylation of recombinant proteins in E. coli. PLoS One, 5, pp. 1-5

Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature, 444, pp. 323-329

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 (2006), pp. 11086-11091

Kane JF (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 6:494–500

Kumar, S., Conghua, C., Jagesh, X., & Tiwari, K. (2017). Compendium of Plant Genomes. The Potato Genome.

Kurland C, Gallant J (1996) Errors of heterologous protein expression. Curr Opin Biotechnol 7:489–493

Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48(1), 251–275.

Lin, W., Li, B., Lu, D., Chen, S., Zhu, N., He, P., Shan, L. (2014). Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 111, pp. 3632-3637

Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., He, P., & Ausubel, F. M. (2010). A Receptor-Like Cytoplasmic Kinase, BIK1, Associates with a Flagellin Receptor Complex to Initiate Plant Innate Immunity. *Source*, *107*(1), 496–501.

Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. Microbiol. Rev., 60, pp. 512-538

MAPK Group (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. Trends Plant Sei. 7: 301-308.

Martinez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M.J., Jung, S.C., Pascual, J.A., Pozo, M.J. (2013) Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by Trichoderma harzianum in tomato. Front Plant Sci 4:206

Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. The Plant Cell Online, 27(1), 64–70.

Montesano, M., Kõiv, V., Mäe, A., & Palva, E. T. (2001). Novel receptorlike protein kinases induced by Erwinia carotovora and short oligogalacturonides in potato. *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 339–346.

Newmann, H., Peak-Chew, S.Y., J.W C. (2008). Genetically encoding Neacetylllysine in recombinant proteins. Nat Chem Biol, 4, pp. 232-234

Nicaise, V., Roux, M., Zipfel, C. (2009). Recent advances in PAMPtriggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. Plant Physiol., 150, pp. 1638-1647

Oh, C.S., Martin, G.B. (2011). Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. Trends Plant Sci., 16, pp. 132-140

Oh, M., Wang, X., Kota, U., Goshe, M.B., Clouse, S.D., Huber, S.C. (2009) Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci., 106, pp. 658-663

Pajerowska-Mukhtar, K., Dong, X.N. (2009). A kiss of death-proteasomemediated membrane fusion and programmed cell death in plant defense against bacterial infection. Genes Dev., 23, pp. 2449-2454

Polisky, B., Bishop, R.J., Gelfand, D.H. (1976) A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 73:3900–3904

Rehman, K., Reiaz, H., Rehman, U., & Tahir, I. (n.d.). *Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk.*

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. Annu. Rev. Phytopathol., 49, pp. 317-343

Sambrook J, Russell D. (2001). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sharon, M., Freeman, S., Sneh, B. (2011) Assessment of resistance pathways induced in Arabidopsis thaliana by hypovirulent Rhizoctonia spp. isolates. Phytopathology 101:828–838.

Shiu, S.H., Bleecker, A.B. (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, pp. 10763-10768

Shiu, S.H., Bleecker, A.B. (2003) Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 132:530–543.

Singer, S.J. (1990) The structure and insertion of integral proteins in membranes. Annu. Rev. Cell Biol. 6, 247–296

Singh, P., Dwivedi, **U.N.** (2008). Purification and characterisation of multiple forms of polygalacturonase from mango (Mangifera indica cv. Dashehari) fruit. Food Chem., 111, pp. 345-349

Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. (1996). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. Microb. Cell Fact., 4, pp. 1-8

Spoel, S.H., Dong, X. (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. Nat. Rev. Immunol., 12, p. 89

Stotz, H. U., Thomson, J. G., & Wang, Y. (2009). Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signaling & Behavior, 4*(11), 1010–1012.

Tena, G. (2016). Pattern recognition: the MAPK connection. Nature Plants, 2(11), 16175.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology, 72(2), 211–222.

Thilmony, R. L., Chen, Z., Bressan, R. A., & Martin, G. B. (1995). Expression of the Tomato Pto Gene in Tobacco Enhances Resistance to Pseudomonas syringae pv tabaci Expressing avrPto. The Plant Cell, 7(10), 1529–1536.

Tilsner, J., Oparka, K.J. (). Tracking the green invaders: advances in imaging virus infection in plants. Biochem. J., 430 (2010), pp. 21-37

Tör, M., Lotze, M. T., & Holton, N. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. Journal of Experimental Botany, 60(13), 3645–3654.

Tsai, W.-C., Wu, T.-C., Chiang, B.-L., & Wen, H.-W. (2017). Cloning, expression, and purification of recombinant major mango allergen Man i 1 in Escherichia coli. Protein Expression and Purification, 130, 35–43.

Tucci, P., Veroli, V., Señorale, M., & Marín, M. (2016). Escherichia coli: The Leading Model for the Production of Recombinant Proteins. In Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability (pp. 119–147). Singapore: Springer Singapore.

van Loon, L.C. (1985). "Pathogenesis-related proteins". Plant Molecular Biology. 4 (2-3): 111–116.

van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annual Review of Phytopathology, 44(1), 135–162.

Vidhyasekaran, P. (2014). Signaling and Communication in Plants PAMP Signals in Plant Innate Immunity Signal Perception and Transduction.

Vincentelli, R., & Romier, C. (2013). Expression in Escherichia coli: becoming faster and more complex. Current Opinion in Structural Biology, 23(3), 326–334.

von Heijne, G. (1990) The signal peptide. J. Membr. Biol. 115, 195–201

Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., *et al.* () N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli.* Science, 298, pp. 1790-1793 Wrzaczek, M., Brosché, M., Salojärvi, J., Kangasjärvi, S., Idänheimo, N., Mersmann, S., Kangasjärvi, J. (2010). Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, *10*, 95.

Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P, Visser, R. G. F. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. Nature, 475(7355), 189–195.

Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., Zhou J.M. (2007). A *Pseudomonas* syringae effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. Cell Host Microbe, 1, pp. 175-185.

Zhang, Y., Lubberstedt, T., & Xu, M. (2013). The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. *Journal of Genetics and Genomics*, *40*(1), 23–35.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., Felix, G. (2009). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. Cell, 125, pp. 749-760