

GRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TRABAJO FIN DE GRADO

ESTUDIO BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE COMPLEJOS
MACROMOLECULARES IMPLICADOS EN LA DISEMINACIÓN DE GENES DE
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL STUDY OF MACROMOLECULAR
COMPLEXES INVOLVED IN THE DISSEMINATION OF ANTIBIOTIC
RESISTANCE GENES

Autor/a: Ana Merino Hermoso

Director/a: Elena Cabezón Navarro

Co-director/a: Ignacio Arechaga Iturregui

Co-director/a:

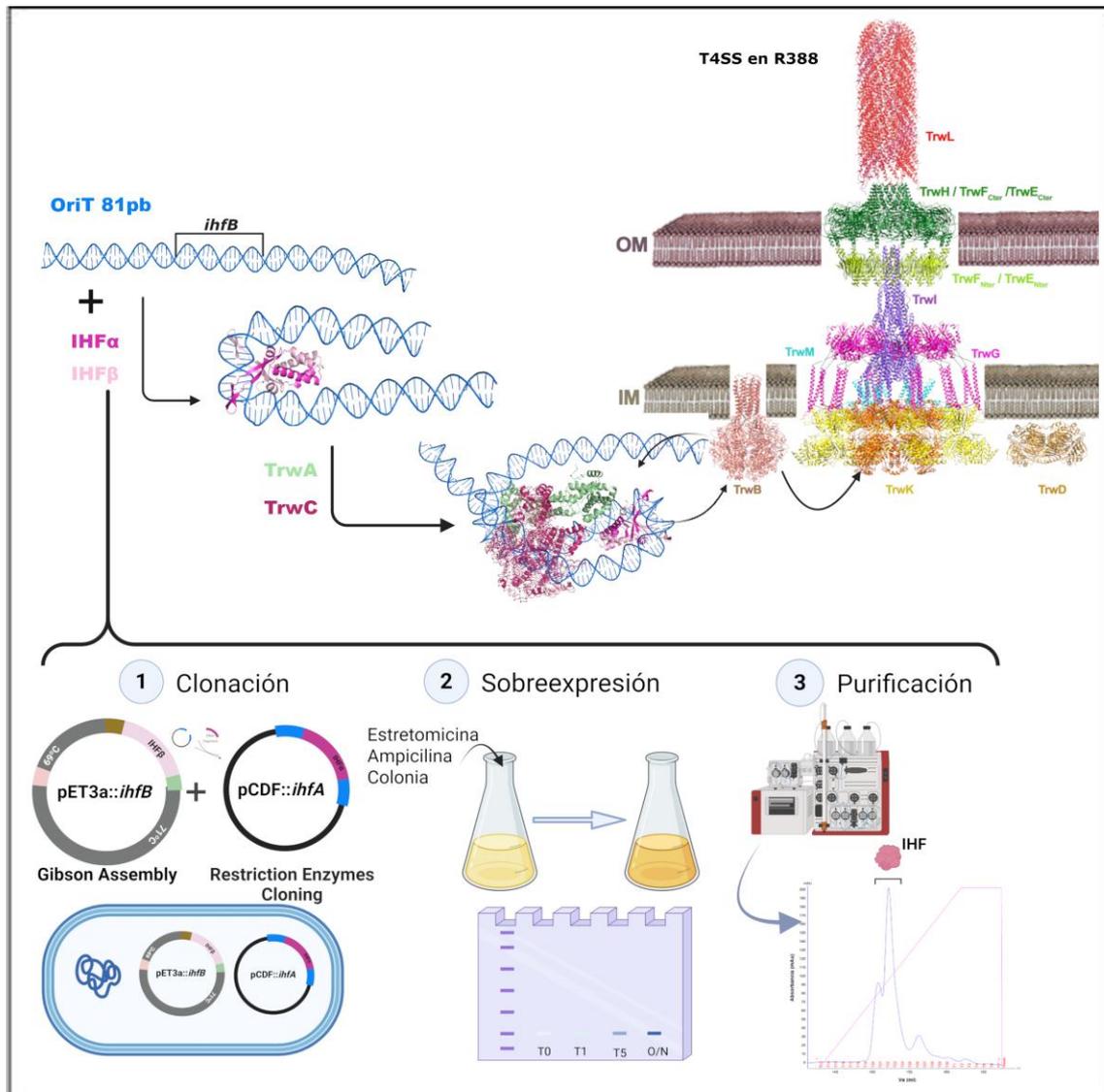
Santander, 5 June 2025

Índice

Título	1
Resumen Gráfico	1
Autores	1
Resumen	2
Abstract	3
Palabras Clave.....	3
Introducción	4
Resultados	6
Clonaje de las proteínas IHF α e IHF β	6
Sobreexpresión y estudios de solubilidad del heterodímero IHF.....	6
Purificación del heterodímero IHF	8
Formación de complejos IHF y ADN	9
Discusión	12
Metodología	14
Agradecimientos	19
Bibliografía	19
Información Suplementaria	22

Estudio bioquímico y estructural de complejos macromoleculares implicados en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos

RESUMEN GRÁFICO



AUTORES

Ana Merino Hermoso (alumno/a), Elena Cabezón Navarro (codirector/a) & Ignacio Arechaga Iturregui (codirector/a)

Correspondencia: cabezone@unican.es & arechagai@unican.es

Estudio bioquímico y estructural de complejos macromoleculares implicados en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos

Ana Merino Hermoso¹, Elena Cabezón Navarro^{1*} & Ignacio Arechaga Iturregui^{1*}

¹ Departamento de Biología Molecular e Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria - CSIC, Santander, España

* Correspondencia: cabezone@unican.es & arechagai@unican.es

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema global que continúa creciendo de forma alarmante. Esta situación, en combinación con la dificultad para desarrollar y validar nuevos antibióticos, pone de manifiesto la necesidad imperiosa de buscar nuevas estrategias frente a esta emergencia sanitaria. El mecanismo más desarrollado y estudiado por el cual las bacterias adquieren la capacidad de transmitir los genes de resistencia a antibióticos es la transferencia horizontal de genes, principalmente mediante el proceso de conjugación bacteriana. En bacterias Gram-negativas este proceso es mediado por un Sistema de Secreción Tipo IV, el relaxosoma y el *pilus*. Este proyecto se ha centrado en el estudio de parte del complejo del relaxosoma, usando como modelo el plásmido conjugativo R388. El relaxosoma es responsable del procesamiento inicial del ADN plasmídico y está compuesto por la relaxasa TrwC y dos proteínas auxiliares (IHF y TrwA) unidas al origen de transferencia del plásmido. En este trabajo se ha llevado a cabo la clonación, sobreexpresión y purificación de la proteína IHF (Factor de Integración del Hospedador) para, en un futuro, tratar de formar el relaxosoma completo. La formación del complejo IHF-ADN tiene como objetivo demostrar, en futuros proyectos, que la curvatura inducida en el ADN tras la unión de IHF favorece el acoplamiento del resto de proteínas.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

ABSTRACT

The emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria represent a major and growing threat to global health. This challenge, combined with the difficulty in developing new antibiotics, highlights the urgent need to explore alternative strategies to face this health emergency. The most studied and well-characterized mechanism by which bacteria acquire and disseminate antibiotic resistance genes is horizontal gene transfer, primarily mediated through bacterial conjugation. In Gram-negative bacteria this process involves the Type IV Secretion System, the relaxosome and the *pilus*. In order to characterize this system, this project focuses on characterizing components of the relaxosome complex, using plasmid R388 as a model system. The relaxosome is responsible for the initial processing of plasmid DNA and it is composed of the TrwC relaxase and two auxiliary proteins (IHF and TrwA) bound to the origin of transfer of the plasmid. In this project, the Integration Host Factor (IHF) protein was cloned, overexpressed and purified. Subsequently, the IHF-DNA complex was assembled. This study provides the basis for future research, to demonstrate how the DNA U-turn induced by IHF binding facilitates the recruitment and assembly of other proteins that also constitute the relaxosome complex.

PALABRAS CLAVE

Resistencia a antibióticos, conjugación bacteriana, plásmido R388, relaxosoma, complejo proteína-ADN.

INTRODUCCIÓN

La aparición y propagación de mecanismos de resistencia a los antibióticos se ha convertido en un grave problema para la salud pública. Si bien es sabido que el descubrimiento de los antibióticos fue un acontecimiento trascendental, circunstancias como el uso masivo de los mismos o el incumplimiento de los tratamientos prescritos han incrementado la aparición de resistencias¹. Esto, sumado a la falta de interés de las compañías farmacéuticas para desarrollar nuevos antibióticos, hace que estas “superbacterias” multirresistentes supongan una amenaza mundial^{2,3}. Un estudio recientemente publicado en la revista *The Lancet*⁴, realizado en distintos hospitales de España sobre la carga sanitaria de las infecciones por microorganismos multirresistentes, revela que la cifra atribuible a las muertes por dichos patógenos es muy superior a la estimada, e incide en la necesidad de tomar conciencia de esta nueva y preocupante realidad.

La necesidad de buscar nuevas formas de neutralizar estos patógenos multirresistentes abre nuevas líneas de investigación. Por ello, conocer los mecanismos que permiten la aparición de resistencias resulta fundamental. Los principales mecanismos para la aparición de bacterias multirresistentes son las mutaciones espontáneas y la transferencia horizontal de genes (HGT)³. La HGT se define como la transferencia de material genético de un organismo a otro, no existiendo relación de descendencia entre ellos. En el reino procariota es fundamental, ya que contribuye enormemente a la generación de diversidad genética, facilitando una mayor capacidad de adaptación. Lamentablemente, también es esencial en el proceso de diseminación de genes de resistencia. Esta transferencia puede darse de tres formas: Transformación, Transducción y Conjugación, siendo esta última la más desarrollada y frecuentemente estudiada.

La conjugación bacteriana se define como la transferencia de ADN de forma unidireccional entre una célula donadora y una célula receptora a través de un contacto célula- célula. Esta unión es normalmente mediada por un pilus o por adhesinas de la superficie celular. Generalmente, el material transferido es un plásmido conjugativo capaz de codificar los genes necesarios para formar la maquinaria conjugativa. También hay otros tipos de plásmidos, entre ellos los denominados movilizables o no conjugativos, que no son capaces de formar dicha maquinaria volviéndose dependientes de la presencia de un plásmido del primer tipo^{3,5-7}.

A diferencia de los escasos conocimientos que hay acerca de los eventos moleculares que suceden en las células receptoras durante este tipo de procesos, sí se conoce que en las células donadoras se precisa la presencia de tres complejos macromoleculares sintetizados a partir de la secuencia plasmídica. Estos son el relaxosoma, un Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS), y el pilus conjugativo^{6,7}.

El citado T4SS es un complejo macromolecular que permite el transporte del sustrato conjugativo entre bacterias Gram-negativas. Este complejo abarca toda la membrana bacteriana, desde la membrana interna hasta la externa, lo que permite el transporte del ADN plasmídico y proteínas directamente a la célula receptora sin necesidad del auxilio de otras maquinarias. La estructura del T4SS del plásmido R388 se ha resuelto recientemente⁸. Se compone de 11 proteínas, denominadas VirB1 a VirB11 que, junto con la proteína acopladora VirD4, (según la nomenclatura de *Agrobacterium tumefaciens*), forman cuatro dominios diferenciados (Figura S1)⁶⁻¹⁰.

El primero de los dominios es el complejo central de membrana externa, formado por VirB7 (TrwH), VirB9 (TrwF) y VirB10 (TrwE). Está conectado a un segundo complejo ubicado en el espacio periplásmico, compuesto por las proteínas VirB5(TrwJ), VirB6(TrwI) y VirB8 (TrwG). Este, a su vez, está anclado al tercero de los dominios, el complejo de la membrana interna, integrado por VirB3(TrwM), VirB4 (TrwK) y el dominio transmembrana de VirB8 (TrwG). El cuarto y último dominio es el pilus conjugativo, formado por VirB2 (TrwL). Este pilus es fundamental para establecer contacto con la célula receptora y solamente se forma en presencia de ésta. Todas estas proteínas se encuentran en distintos estados oligoméricos, formando un gran complejo macromolecular en la membrana (Figura S1) , que constituye el T4SS^{6,8}.

Tanto la biogénesis del sistema como el transporte del sustrato requieren energía, proporcionada por tres ATPasas esenciales: VirB4(TrwK), VirB11(TrwD) y VirD4(TrwB). Esta última, también conocida como proteína acopladora, se encuentra anclada a la membrana interna y conecta el complejo nucleoproteico que va a ser transferido con el T4SS (Figura S1), empleando la energía liberada por la hidrólisis del ATP para favorecer la transferencia del sustrato nucleoproteico a la célula receptora⁹. El procesamiento inicial del ADN plasmídico es promovido por un complejo de nucleoproteínas denominado relaxosoma, formado por la relaxasa, el ADN y dos proteínas auxiliares: TrwA e IHF. En el plásmido R388, la proteína relaxasa se conoce como TrwC y es la responsable de iniciar el proceso de conjugación mediante la realización de un corte específico en una de las cadenas del ADN, en concreto, en el sitio *nic* que se encuentra en el origen de transferencia del plásmido u *oriT*, quedándose unida covalentemente al extremo 5' del ADN. A su vez, TrwC presenta en su extremo C-terminal un dominio helicasa que favorece el desenrollamiento de la cadena de ADN.

Las proteínas auxiliares que conforman el relaxosoma son TrwA e IHF. TrwA es un tetrámero que se une al *oriT* en dos secuencias específicas. Su función es clave en la conjugación bacteriana, mejorando la actividad relaxasa de TrwC y estabilizando el complejo nucleoproteico. Además, en cantidades crecientes de esta proteína, la actividad ATPasa de TrwB aumenta significativamente^{9,11-13}. Por último, IHF (Factor Huésped de Integración), es la otra proteína auxiliar del relaxosoma. Se trata de una proteína codificada por el genoma de la bacteria, capaz de unirse a una secuencia específica en el ADN y generar tras su unión una curvatura de más de 160° en el mismo. El *oriT* del plásmido R388 contiene esta secuencia de reconocimiento para IHF, de forma que, tras su unión al ADN, pone en contacto secuencias del plásmido más alejadas y facilita la unión de las proteínas TrwA y TrwC. IHF forma un heterodímero compuesto de dos subunidades, IHF α e IHF β , con una masa molecular de 11,3 kDa y 10,6 kDa, respectivamente, y con una identidad del 30% en su secuencia. Su unión forma dos brazos largos con un residuo de prolina en el extremo de cada uno de ellos, permitiendo la interacción con el ADN y promoviendo la curvatura mencionada^{12,14}.

En este proyecto se ha realizado el clonaje y la purificación del heterodímero IHF con el propósito de formar el relaxosoma junto a las proteínas TrwA y TrwC y el origen de transferencia del plásmido R388, y poder realizar el análisis estructural de este complejo macromolecular.

RESULTADOS

Este proyecto se ha desarrollado en base a los conocimientos teóricos sobre la formación del relaxosoma y la importancia de la presencia de la proteína IHF en su ensamblaje. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el transcurso del estudio.

Clonaje de las proteínas IHF α e IHF β

Con el objetivo de construir los plásmidos necesarios para la expresión de las proteínas IHF α e IHF β , se han llevado a cabo dos estrategias distintas de clonaje descritas en la sección de metodología: clonaje por enzimas de restricción y ensamblaje isotérmico, respectivamente.

En ambos casos se obtuvieron numerosas colonias tras la transformación bacteriana por electroporación. Se realizó la extracción de ADN plasmídico, según se indica en la sección de metodología, y las muestras se mandaron a secuenciar con el objetivo de comprobar su correcta inserción y descartar la aparición de mutaciones que pudieran alterar la proteína de interés. Los resultados de secuenciación (Figura S2) fueron comprobados con el uso del programa *Chromas*, mostrando, en su lectura, muy buena calidad de secuenciación en ambos casos. Estas secuencias fueron alineadas en *SnapGene* con sus respectivos vectores (pCDF::*ihfA* y pET3a::*ihfB*). En ninguno de los dos casos se observaron mutaciones, de forma que la secuencia obtenida correspondía con la secuencia teórica esperada.

Sobreexpresión y estudios de solubilidad del heterodímero IHF

Previo a la purificación, es necesario conocer las características de nuestra proteína de estudio. Con este fin, se realizaron pruebas de sobreexpresión a distintas temperaturas tras la inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, se estudió la solubilidad de IHF para saber si existía un correcto plegamiento de la proteína.

La proteína IHF está compuesta por el heterodímero IHF $\alpha\beta$. Con el propósito de favorecer la correcta formación de cada monómero y el posterior ensamblaje de la proteína funcional, se llevó a cabo la co-expresión de las dos proteínas a 37°C y a 25°C, respectivamente. Tal y como se describe en el apartado de metodología, las muestras recogidas a distintos tiempos durante la prueba de sobreexpresión fueron preparadas para ser cargadas en un gel SDS-PAGE. Se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos y cada una de ellas se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió con tampón de carga. La mayor sobreexpresión se obtuvo después de una inducción o/n (datos no mostrados).

Tras recoger la muestra de los cultivos incubados o/n, se realizó el ensayo de solubilidad manteniendo separadas las dos pruebas a distinta temperatura. Como se explica en la sección de metodología, se realizó una primera centrifugación para concentrar las células en el pellet y así, lisarlas con el buffer de lisis mediante el uso del sonicador. Después, se efectuaron tres centrifugaciones seriadas de las que se recogieron muestras tanto del sobrenadante como del pellet y se cargaron en un gel SDS-PAGE.

Los resultados a 37°C y 25°C se muestran en los paneles A y B, respectivamente, de la Figura 1. En los geles se distinguen dos bandas que se corresponden con la masa molecular de las proteínas IHF α e IHF β . En ambas imágenes se observa, en el pellet de la centrifugación a 800 x g, una banda ancha e intensa que corresponde a proteína

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

presente en células sin lisar. Lo mismo sucede en el pellet de la centrifugación a 10.000 x g, correspondiente en este caso a la formación de agregados de proteína. No obstante, en el sobrenadante de la última centrifugación (100.000 x g) se observan dos bandas de la masa molecular esperada, lo que indica que tenemos abundante proteína en la fracción soluble. Es importante señalar que las muestras en los dos geles no tienen la misma concentración.

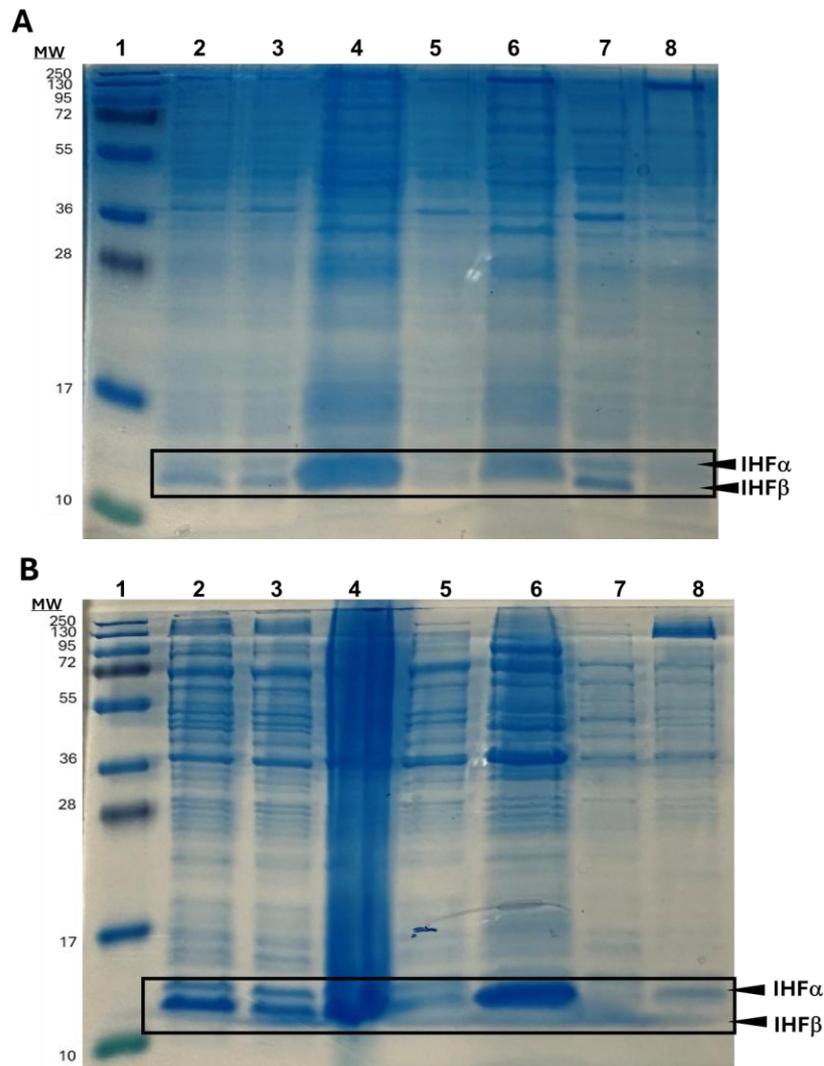


Figura 1. Resultados de sobreexpresión y solubilidad de las proteínas IHF α e IHF β

(A) Gel SDS-PAGE al 15%, teñido con BlueSafe que muestra el resultado del ensayo de solubilidad de IHF α e IHF β a 37°C. (1) Marcadores de peso molecular (kDa), (2) muestra tras sonicar, (3 y 4) sobrenadante y pellet tras centrifugación a 800 x g, respectivamente, (5 y 6) sobrenadante y pellet de la centrifugación a 10.000 x g, respectivamente, y (7 y 8) sobrenadante y pellet tras la centrifugación a 100.000 x g, respectivamente. El recuadro señala las bandas que corresponden a IHF α e IHF β . (B) Gel SDS-PAGE al 15%, teñido con BlueSafe del resultado del ensayo de solubilidad de IHF α e IHF β a temperatura 25°C, con muestras en orden idéntico al panel A de la figura.

Purificación del heterodímero IHF

Con la proteína ya sobreexpresada, se procedió a la lisis celular y se comenzó la purificación cargando la muestra del lisado, una vez centrifugada a 100.000x g, en una resina P11, con el objetivo de eliminar contaminantes. La resina P11 es un tipo de resina de intercambio iónico que se utiliza para separar proteínas que se unen al ADN. Tras la elución de la proteína en un gradiente de NaCl, se continuó con una cromatografía de intercambio catiónico. La proteína, en buffer de equilibrio A (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,001% PMSF), se cargó en una columna HiTrapSP de 1 ml previamente equilibrada con el mismo buffer. IHF tiene un punto isoeléctrico de 9,34, de forma que a pH 7,8 la proteína tiene carga positiva y se unirá a la resina de esta columna, permitiendo hacer un segundo cribado frente al resto de componentes de la muestra.

El cromatograma resultante (panel A, Figura 2) mostró un pico principal de elución a un volumen de 150-155 ml, en un gradiente de NaCl en tampón B (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1M NaCl, 0,001% PMSF). Las fracciones que contenían el heterodímero (F8-13) fueron cuantificadas por el método de Bradford¹⁵ y posteriormente cargadas en un gel SDS-PAGE al 15%, teñido con BlueSafe (panel B, Figura 2). En el gel se observa la co-elución de ambas proteínas que forman el heterodímero, con masas moleculares de 11,3kDa y 10,6 kDa, respectivamente.

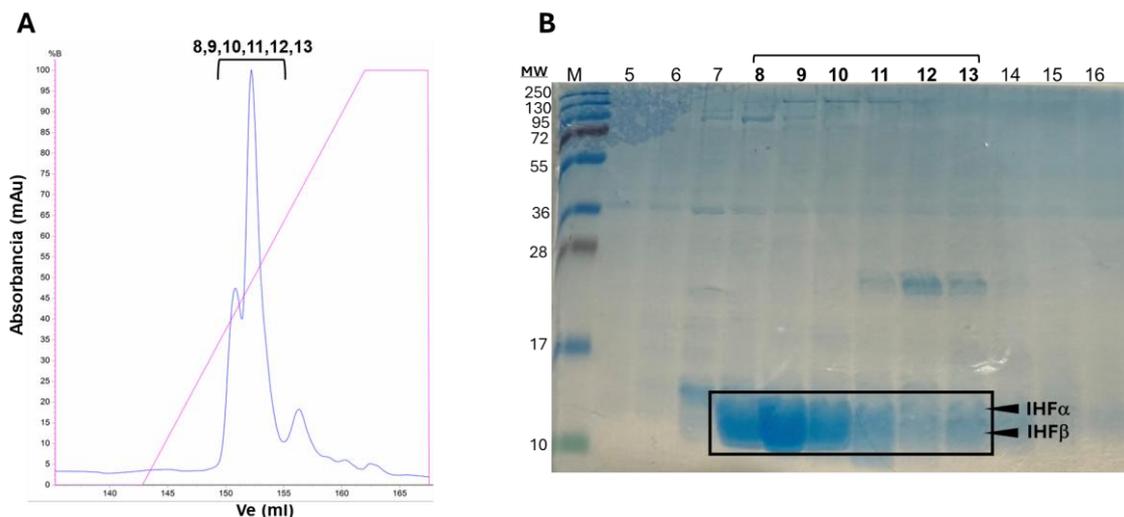


Figura 2. Resultado cromatografía de intercambio catiónico de IHF

(A) Cromatograma que muestra el perfil de elución del heterodímero IHF resultante tras cargar la muestra en una columna HiTrapSP. Se representa la absorbancia a 280nm frente al volumen de elución (Ve). La línea rosa muestra el porcentaje de concentración del tampón de elución y en negro se indican las fracciones correspondientes a los picos de elución obtenidos. (B) Gel SDS-PAGE al 15% de las fracciones correspondientes a los picos de elución de la cromatografía de intercambio catiónico. MW: marcadores de peso molecular (kDa). Las fracciones se han numerado en orden de elución (5-16). El recuadro señala las bandas que corresponden a IHF α e IHF β (fracciones 8-13).

Las fracciones se concentraron en un centricon hasta un volumen final de 500 μ l. Dicha muestra se sometió a cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex-75 increase 10/300GL con el tampón S75 (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA,

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

100 mM NaCl, 0,001% PMSF, 5% glicerol). Así, se realizó un último paso de purificación con el objetivo de separar las proteínas según su tamaño molecular e intentar aumentar el grado de pureza de la muestra de IHF. Concretamente, esta columna permite distinguir tamaños entre 3 y 70 kDa. Los resultados se muestran en el siguiente cromatograma (panel A, Figura 3), en el que se observa un único pico definido con un volumen de elución de 9,62ml. Este pico corresponde con nuestra proteína de interés, el heterodímero formado por IHF α e IHF β . Las fracciones correspondientes al pico fueron preparadas y cargadas en un gel SDS-PAGE (panel B, Figura 3).

El gel muestra en las fracciones 13-18 dos bandas con la masas moleculares esperadas. Además, la intensidad máxima del pico de elución, la cual refleja una mayor cantidad de proteína, se alcanzó en las fracciones 14 y 15, disminuyendo progresivamente en las posteriores fracciones.

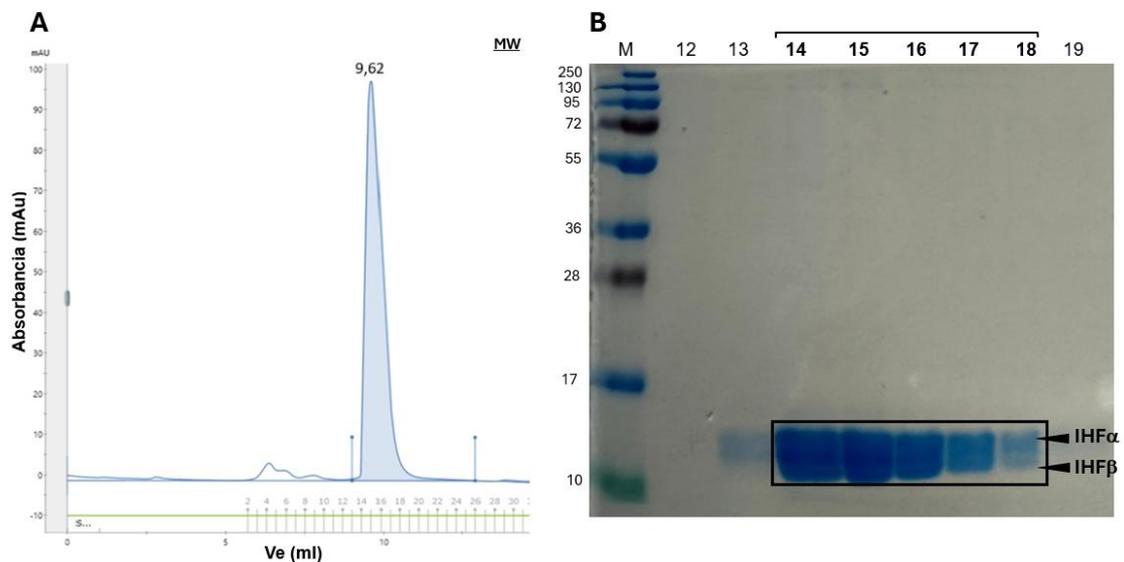


Figura 3. Resultado de la cromatografía en gel filtración de IHF

(A) Cromatograma que muestra el perfil de elución resultante tras cargar en una columna Superdex 75 increase las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico, previamente concentradas. Se representa la absorbancia a 280nm frente al volumen de elución (Ve). (B) Gel SDS-PAGE al 15% de las fracciones correspondientes al pico principal de la cromatografía de filtración en gel. MW: marcadores de peso molecular (kDa). Las fracciones se han numerado en orden de elución (12-21). El recuadro señala las bandas que corresponden a IHF α e IHF β (fracciones 14-18). Las fracciones se cuantificaron mediante Bradford para su posterior almacenamiento a -80°C.

Formación de complejos IHF y ADN

Una vez obtenido el heterodímero IHF purificado, se procedió a la formación de un complejo de esta proteína con ADN del *oriT* del plásmido. Para ello, se adquirieron comercialmente dos oligonucleótidos 81-mer (de secuencia complementaria) que incluían las secuencias de unión del heterodímero IHF $\alpha\beta$ y la proteína accesoria TrwA (panel A, Figura 4).

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Con el objetivo de evaluar la interacción entre este heterodímero y el fragmento de ADN de 81pb (formado previamente por la hibridación de los dos oligonucleótidos), se llevó a cabo un EMSA (Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética) o ensayo de retardo en gel (en sección metodológica). Este procedimiento permite distinguir a través de la migración en un gel de agarosa si se ha producido unión entre el ADN y la proteína, pues el patrón de migración difiere.

El resultado del gel agarosa 3%, visualizado mediante el uso del sistema ChemiDoc (panel B, Figura 4), muestra como en la calle control, dónde se cargó solamente el ADN, aparece una única banda estrecha muy intensa. En el siguiente carril, se cargó una reacción con la misma cantidad de ADN y una concentración 0,5 μM de IHF y el patrón de migración ya no muestra una única banda bien definida, si no que se aprecia un ligero retardo. Tal y como se aprecia en la figura, a medida que aumenta la concentración de IHF en las reacciones, se aprecia como el retardo observado va incrementándose de forma proporcional, mientras que la señal de ADN libre va perdiendo intensidad; siendo la intensidad de banda a 5 μM indetectable respecto a la banda del control.

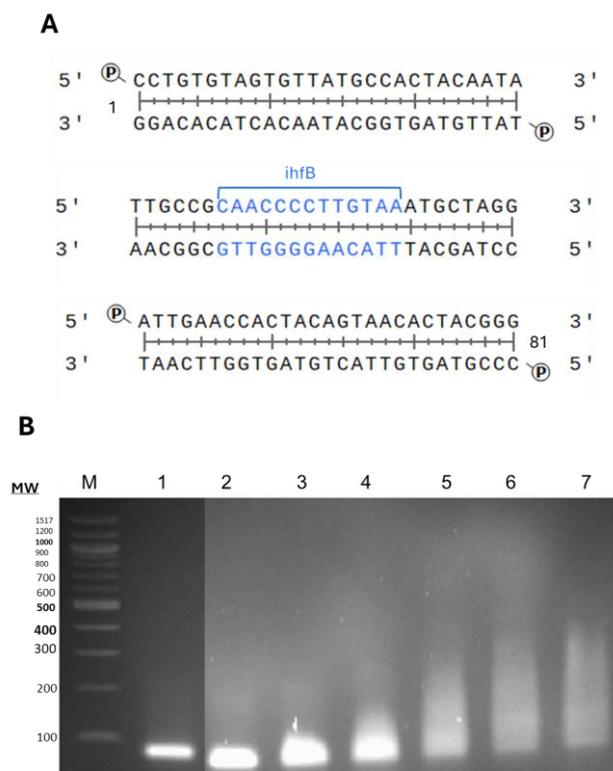


Figura 4. Resultado EMSA del complejo IHF-ADN

(A) Secuencia de 81 pares de bases del *oriT* del plásmido R388. En azul se resalta uno de los dos sitios de unión del heterodímero IHF $\alpha\beta$, denominado sitio de unión ihfB. (B) Gel de agarosa al 3% que muestra el retardo producido por la unión de IHF al ADN. MW: marcadores de peso molecular (kDa). (1) ADN (0,2 μM) en ausencia de proteína IHF. (2) ADN (0,2 μM) incubado con IHF (0,5 μM) a 25°C durante 30 min. (3-7) ADN (0,2 μM) incubado con concentraciones crecientes de IHF (1 μM , 1,5 μM , 3 μM , 4 μM y 5 μM , respectivamente). Experimento realizado en colaboración con Tamara Menguiano, cuyo resultado forma parte de su tesis doctoral.

Otra forma experimental de demostrar la unión entre IHF y el *oriT* del plásmido R388 es mediante la realización de cromatografía de filtración en gel, tal y como se explica en la sección de metodología. En este caso, se utilizó una columna Superdex200 increase 10/300GL, que permite separar las proteínas en un rango de masa molecular de 10kDa a 600kDa. Primero se realizó una carga del heterodímero IHF solo, luego se cargó la muestra de 81 pb de ADN del *oriT* sola, y después se realizó una última carga con el complejo IHF-ADN.

El cromatograma obtenido de la carga del heterodímero IHF $\alpha\beta$ (panel A, Figura 5) muestra un único pico principal bien definido, con un volumen de elución de 15,72 ml. En la carga del ADN de 81 pb se obtuvo un volumen de elución (V_e) de 10,95 ml (datos no mostrados). Cuando, posteriormente, se cargó la muestra preincubada de IHF con el ADN, se aprecia un pico de mucha mayor absorbancia y de un volumen de elución intermedio (11,5 ml) (pico 1 panel B, Figura 5), coincidiendo con lo esperado, puesto que el complejo proteína-ADN es de mayor tamaño que la proteína sola. En este panel B se observa la superposición de los dos cromatogramas. El complejo IHF-ADN (cromatograma en color azul) tiene una absorbancia significativamente mayor debido a la presencia de ADN. Además, aparece otro pico de elución posterior (pico 2) que coincide con el volumen de elución del heterodímero IHF solo, sin ADN, lo que puede explicarse por la relación ADN: IHF (1: 3,6). Es decir, este segundo pico refleja la proteína en exceso que no está formando complejo con el ADN.

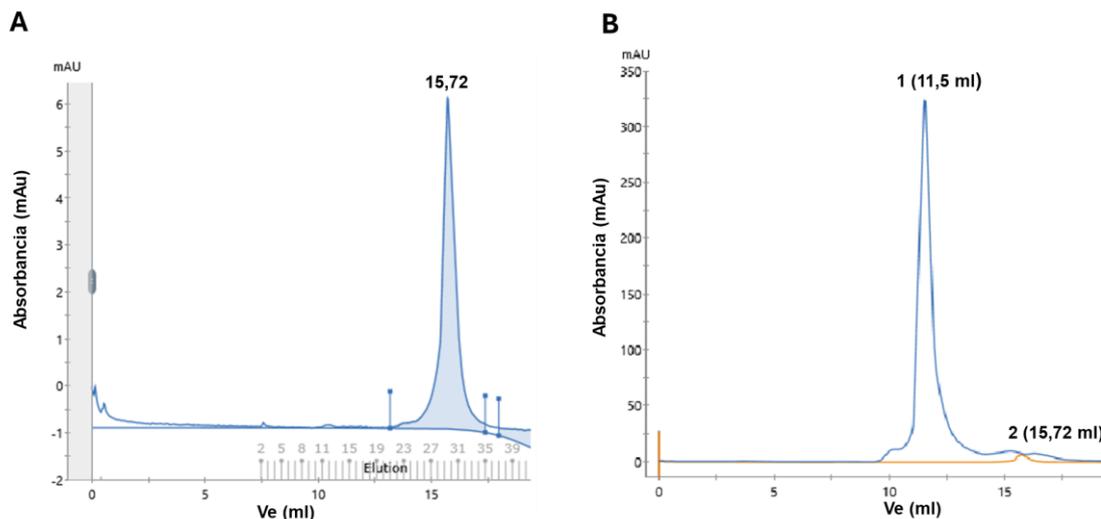


Figura 5. Resultado de la cromatografía gel filtración del complejo IHF-ADN

(A) Cromatograma que muestra el perfil de elución resultante tras cargar en una columna Superdex 200 increase una fracción de IHF purificada (200 μ l). Se representa la absorbancia a 280nm frente al volumen de elución (V_e). (B) Superposición del cromatograma obtenido tras la carga de un complejo IHF-ADN (cromatograma azul) con el cromatograma de IHF $\alpha\beta$ sin ADN (cromatograma naranja). Experimento realizado en colaboración con Tamara Menguiano, cuyo resultado forma parte de su tesis doctoral.

DISCUSIÓN

El relaxosoma es un complejo nucleoproteico esencial en la conjugación bacteriana, siendo responsable del procesamiento inicial del ADN plasmídico y de su preparación para ser transferido a otra célula receptora. Está compuesto por una relaxasa (TrwC), el ADN y dos proteínas auxiliares IHF y TrwA. El presente estudio se ha realizado con el objetivo de profundizar en la caracterización de la estructura de dicho relaxosoma y en su posible implicación en el proceso de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Mediante técnicas de clonaje, sobreexpresión y purificación se ha logrado obtener el heterodímero IHF $\alpha\beta$ disponible para la formación del complejo ADN-IHF $\alpha\beta$. Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis sobre la interacción de la proteína IHF $\alpha\beta$ con una secuencia de 81pb en la región *oriT* del plásmido R388.

Las colonias logradas a través de clonaje con enzimas de restricción (pCDF::*ihfA*) y mediante ensamblaje isotérmico (pET3a::*ihfB*) han sido verificadas por medio de secuenciación Sanger. La calidad de lectura de ambas secuencias ha sido muy buena y su alineación nos ha permitido confirmar la ausencia de mutaciones o errores en ella, garantizando la correcta formación de los constructos. La posterior sobreexpresión de la proteína revela la existencia de una relación directamente proporcional entre el tiempo de incubación y la cantidad de proteína, reflejando a tiempo overnight la concentración más elevada. En la comparativa entre ambas temperaturas parece distinguirse una mayor producción de proteína a tiempo overnight a 25°C respecto a 37°C, lo que podría indicar que a una temperatura más baja se favorece un mejor plegamiento de la proteína.

En lo relativo a los resultados obtenidos en la prueba de solubilidad, se ha detectado una pérdida significativa de proteína en el pellet de la centrifugación a 800 x g que sugiere que el proceso de lisis celular no ha sido efectivo. Además, en la centrifugación a 10.000 x g se han observado cuerpos de inclusión en el pellet, lo que podría explicarse por la sobreproducción de la subunidad IHF α frente a la cantidad de IHF β . Esta descompensación favorecería la aparición de IHF α en estado monomérico, presentando menos estabilidad y favoreciendo su agregación. No obstante, en el sobrenadante de la última centrifugación se puede visualizar la presencia de las dos proteínas, lo que sugiere que una parte importante permanece en la fracción soluble, permitiendo continuar con la purificación. En este caso, no es posible concluir que la solubilidad sea mayor a 25°C, puesto que las muestras no fueron cuantificadas antes de ser cargadas en los distintos geles. (se ha cargado una mayor cantidad de proteína en este segundo gel SDS-PAGE, dada la intensidad de las bandas y la notable ineficacia del proceso de lisis).

La dos cromatografías de intercambio iónico (P11 y HiTrapSP) permitieron la separación de numerosos contaminantes, generando perfiles de elución con un pico principal bien definido, indicando una interacción significativa entre la proteína y la matriz de la columna. El posterior análisis, mediante SDS-PAGE de las fracciones correspondientes al último pico de elución, reveló la presencia de dos bandas con un tamaño compatible al de las proteínas de interés, IHF α e IHF β . En una última etapa de purificación, la muestra fue sometida a cromatografía de filtración en gel. El cromatograma muestra un único pico estrecho y de elevada absorción en el que el volumen de elución de la proteína es de 9,6ml. El posterior gel SDS-PAGE en el que se cargaron las fracciones de ese pico presenta, de nuevo, dos bandas con una masa molecular igual a la teóricamente esperada.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Tras haber obtenido IHF $\alpha\beta$ purificada, se continuó el proyecto iniciando la formación del complejo relaxosoma del plásmido R388. Se seleccionó un fragmento de 81pb del *oriT*, el cual contenía una de las secuencias de unión del heterodímero IHF $\alpha\beta$ (sitio de unión *ihfB*). Con el objetivo de estudiar la unión de ambos elementos, se realizó un ensayo EMSA (Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética) y una cromatografía de filtración en gel. Los resultados del gel retardo mostraron una correlación entre concentraciones mayores de IHF $\alpha\beta$ y el retardo producido en la migración de ADN, demostrando que se produce unión. De forma complementaria, el cromatograma resultante en la filtración en gel muestra un volumen de elución menor en el complejo IHF $\alpha\beta$ -ADN (11,5 ml) en comparación con el pico observado en el cromatograma del heterodímero IHF $\alpha\beta$ solo (15,7 ml), indicando la formación de un complejo de mayor tamaño en presencia de ADN. Es importante señalar también que el complejo IHF-ADN (11,5 ml) presenta un volumen de elución mayor que el sustrato de dsDNA de 81pb solo (10,9 ml). Este resultado se explica por la curvatura de más de 160° que IHF produce en el ADN, eliminando su forma extendida y favoreciendo su migración como sustrato de menor tamaño.

A través de una reciente versión del programa *AlphaFold*¹⁶ se ha realizado una predicción de la interacción entre el ADN y el heterodímero IHF $\alpha\beta$, reafirmando lo predicho teóricamente sobre la curvatura pronunciada que ocasiona la unión de esta proteína al ADN.

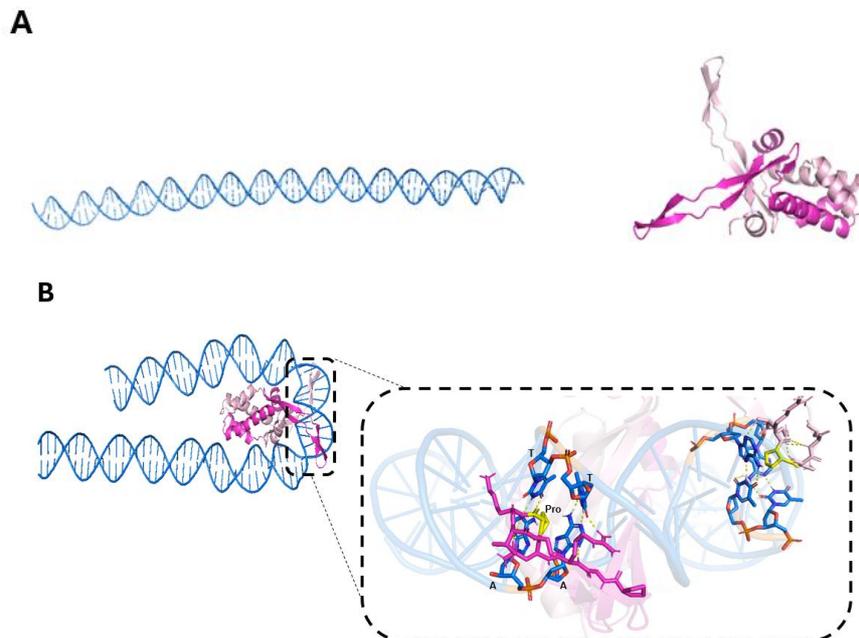


Figura 6. Predicción *AlphaFold3* del Complejo IHF-ADN

(A) Representación en *PyMol*¹⁷ de la secuencia de 81pb del *oriT* (azul) y del heterodímero IHF α (magenta)- IHF β (rosa) (pdb1IHF). (B) Representación en *PyMol* de la predicción por *AlphaFold* de la interacción entre el heterodímero IHF α (magenta)- IHF β (rosa) y la secuencia de 81pb del *oriT* del plásmido R388. Se observa la curvatura de casi 180° esperada en el ADN por la unión del heterodímero. En la ampliación se destaca la interacción de los residuos de prolina (Pro, en amarillo) con el surco menor del ADN (azul).

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

En conclusión, estos hallazgos confirman la purificación del heterodímero IHF α -IHF β y la posterior formación del complejo estable con el fragmento de 81 pb del *oriT* del plásmido R388. Sin embargo, es preciso seguir profundizando en el análisis estructural para conocer exactamente si la unión producida es igual a la teóricamente esperada y evaluar su implicación en la formación del resto del complejo. Futuros experimentos se centrarán en la incorporación del tetrámero de TrwA y de la relaxasa TrwC a este sustrato ya formado, con el fin de poder ensamblar el complejo relaxosoma completo. Es de esperar que la curvatura que IHF $\alpha\beta$ produce en el *oriT* acerque espacialmente los dos sitios de unión de la proteína TrwA (flanqueando el sitio de IHF $\alpha\beta$), favoreciendo su ensamblaje en el ADN. Este análisis estructural del relaxosoma supondrá un importante avance en el estudio del procesamiento y transporte del ADN plasmídico en la conjugación bacteriana, y, por ende, un avance en el desarrollo de inhibidores que impidan la diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

METODOLOGÍA

Cepas Bacterianas

Las cepas empleadas en este proyecto fueron las siguientes: *Escherichia coli* K12 DH5 α (almacenamiento de los plásmidos construidos) y *Escherichia coli* B C41 (sobreexpresión de proteínas).

Clonaje por enzimas de restricción

Se llevó a cabo el clonaje con enzimas de restricción seleccionando el sitio de inserción del gen que codifica la proteína de interés dentro del vector y asegurando que ambos portaran los sitios de restricción compatibles para dichas enzimas. En el clon PCDF::*ihfA* se utilizaron *NcoI* y *BamHI* como enzimas de restricción. Utilizando el programa SnapGene se realizó un boceto del clon resultante que permitió visualizar el corte de las enzimas de restricción y comprobar la conservación del marco de lectura.

El inserto IHF α se amplificó mediante PCR, para ello se diseñaron los siguientes primers: *ihfA Forward* (5' GATATACCATGGCGCTTACAAAAGC 3') e *ihfA Reverse* (5'CAATTGGGATCCTTACTCGTC 3'). Se prepararon reacciones de 50 μ l: 10 μ l del 5x Buffer GC, 1 μ l de mezcla de dNTP (10mM), 2,5 μ l de cada cebador (10 μ M), 0,5 μ l de ADN polimerasa *Phusion*, 1,5 μ l de ADN molde (10ng/ μ l) y agua Mili-Q hasta completar el volumen. Las condiciones de la reacción PCR fueron: 98°C,1' para desnaturalización inicial, 12 ciclos de 98°C,10" (desnaturalización), 61°C,1' (anillamiento), 72°C,30" (elongación) y un último paso de elongación final, 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron purificados siguiendo las instrucciones del *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher).

Para la digestión con las enzimas *NcoI* y *BamHI* de la muestra amplificada por PCR se prepararon reacciones en un volumen final de 20 μ l, añadiendo 500 ng ADN, 2 μ l de 10xFast Digest Buffer, 1 μ l de *NcoI* y 1 μ l *BamHI* y el resto de agua Mili-Q. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante una hora en el termobloque. Finalmente, las muestras se purificaron de nuevo con el *GeneJET PCR Purification Kit* y, una vez listas, se cuantificaron en el nanodrop.

En caso del vector pCDF, se realizó la extracción de ADN a través de un cultivo inoculado de 10 ml siguiendo el protocolo del kit *GeneJET Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher). Las muestras extraídas se cuantificaron en el nanodrop y se procedió a la

digestión de 500 ng de ADN bajo las mismas condiciones que el inserto. Los productos de la digestión se cargaron en un gel de agarosa al 1%, se cortó la banda de interés y se purificó con el *GeneJET Gel Extraction Kit*. Para prevenir la religación del vector, se procedió a la desfosforilación del vector mediante reacciones con 12,5 µl ADN, 1 µl Fast Alkaline Phosphatase, 2 µl 10x Fast Alkaline Phosphatase buffer y agua Mili-Q hasta 20 µl. Se siguieron las indicaciones del fabricante activándola durante 15 minutos a 37°C e inactivándola durante 5 minutos a 75°C en el termobloque. Finalmente, las muestras recogidas fueron purificadas siguiendo de nuevo el *GeneJET PCR Purification Kit*. Una vez listas, las muestras se cuantificaron en el nanodrop.

Con el inserto y el vector listos, se efectuaron las reacciones de ligación poniendo una relación vector: inserto de 1:5. Cada reacción de 20 µl contenía: 15 ng de vector, 75 ng de inserto, 1 µl T4 ADN ligasa, 4 µl 5X ADN T4 ligasa buffer y agua Mili-Q. Las mezclas se incubaron overnight a 22°C y la ligasa se inactivó a 65°C durante 10 minutos. Los productos de ligación se sometieron a microdiálisis, electroporación en *E.coli* DH5α y plaqueo en la resistencia correspondiente (Estreptomicina y Nalidíxico).

Clonación por ensamblaje isotérmico

El método de ensamblaje de Gibson o ensamblaje isoterma es una técnica de clonación que no depende de enzimas de restricción, si no que permite unir varios fragmentos de ADN específicos de manera simultánea en una sola reacción¹⁸. En este proyecto se empleó esta técnica para introducir el gen que codifica la proteína IHFβ en el vector pET3a.

Para la reacción de ensamblaje, se utilizó de molde un fragmento de 365pb que contenía la secuencia del gen IHFB flanqueada por 40pb del vector pET3a en cada uno de sus extremos, asegurando así la presencia de secuencia solapante con el resto de los fragmentos de ADN del vector empleados en el ensamblaje (se emplearon muestras de PCR de otros dos fragmentos solapantes del vector previamente preparadas por otro miembro del grupo de investigación). Por lo tanto, solo se tuvo que preparar directamente la reacción de ensamblaje de Gibson. Para ello, se usaron 15 µl de la mezcla comercial Gibson (New England Biolabs), que incluye las enzimas necesarias para el ensamblaje: exonucleasa 5', polimerasa de ADN y ligasa de ADN. A ese *master mix* de 15 µl se le añadió 5 µl de ADN total, suma de los tres fragmentos necesarios para el ensamblaje. Para calcular cuanta cantidad poner de cada fragmento amplificado se tomó como referencia el fragmento que incluye el origen de replicación (*oriT*). La fórmula empleada fue: pares de bases segmento/pares de bases de referencia x100. Así, en los 5 µl de ADN totales se pusieron 1,37 µl del fragmento que contenía el *oriT*, 1,19 µl del otro fragmento del vector y 2,4 µl del inserto amplificado. A continuación, los 20 µl fueron incubados a 50°C durante una hora utilizando un termociclador para permitir el ensamblaje. Finalmente, el nuevo constructo se electroporó a células competentes DH5α y se plaqueó en la resistencia correspondiente (Nalidíxico y Ampicilina)

Microdiálisis

La microdiálisis se utilizó para eliminar el exceso de sales de nuestra muestra de ADN plasmídico y permitir así la posterior electroporación. Para ejecutar este procedimiento se empleó una membrana de filtración MF-milipore de un tamaño de poro de 0,05 µm. Primero, se depositó en un placa Petri estéril agua Mili-Q y, con sumo cuidado, se colocó la membrana de filtración en el centro de la placa. Sobre la membrana se añadieron 20

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

µl de muestra y tras un tiempo de incubación de 30 minutos, se recogió de nuevo para poder continuar con la transformación bacteriana por electroporación.

Transformación bacteriana por electroporación

La transformación bacteriana se llevó a cabo por electroporación utilizando las células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α (para almacenamiento plasmídico) o C41 (para sobreexpresión proteica). Se emplearon cubetas de electroporación de 0,05 cm y se aplicó un único pulso eléctrico de 2,5 kV, con una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 200Ω.

Las células electrocompetentes (60 µl), conservadas a -80°C, se descongelaron en hielo. A continuación, en hielo, se añadieron 1-2 µl de ADN al volumen de las células y la muestra se transfirió a la cubeta para la electroporación. Tras la descarga, se incorporó 1 ml de medio LB estéril directamente en la cubeta. Posteriormente, se transfirió todo el contenido a un eppendorf y se incubó a 37°C con agitación (140 rpm) durante una hora. Finalmente, como la eficiencia de transformación esperada era baja, se centrifugó la muestra 30 segundos a 13.000 rpm. Se descartaron 700 µl de sobrenadante y el pellet se resuspendió en el volumen restante (100 µl), dejando la muestra lista para ser plaqueada en su antibióticos correspondientes.

PCR de colonia

La presencia del gen de interés insertado en el vector de clonaje se verificó mediante PCR de colonia. Se empleó el kit comercial *NZYTaq II 2X Green Master Mix* (NZYTech), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El *master mix* contiene todo lo necesario para realizar una PCR. Se prepararon, en hielo, las reacciones de 50 µl que contenían: 25 µl de *master mix*, 1,25 µl de oligo forward (0,25 mM), 1,25 µl del oligo reverse (0,25 mM) y se enrasó con agua Mili-Q. A cada reacción se le añadió una colonia aislada picada con la punta de pipeta. A continuación, se realizó una reacción de PCR con las siguientes condiciones: 95°C, 3' para desnaturalización inicial y 25-35 ciclos de: 94°C, 30" (desnaturalización), 60°C, 30" (anillamiento), 72°C, 30" (elongación) y un último paso de elongación final, 10 minutos a 72°C. Finalmente, los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa y se realizó una electroforesis, visualizada posteriormente en el GelDoc.

Extracción y secuenciación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se empleó el kit comercial *GeneJet Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher). Se añadieron 10 µl de los antibióticos apropiados (de acuerdo con la resistencias) a 10ml de medio LB y, seguidamente, se inoculó una colonia de *E.coli* DH5α portadora del constructo de interés. El cultivo se incubó *overnight* a 37°C con agitación.

Al día siguiente, las células se recuperaron por centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, la extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo siguiendo el protocolo del *kit*. El ADN plasmídico fue eluido en 50 µl de agua Mili-Q mediante centrifugación de la columna a 13.4000 rpm durante 2 minutos. La concentración y pureza del ADN eluido fueron evaluados en un espectrofotómetro *NanoDrop* mediante medición de la absorbancia a 260 nm y la relación A260/A280.

Una vez se comprobó que la muestra tenía una concentración aproximada de 100 ng/ μ l, se prepararon distintas reacciones para mandar a secuenciar, que contenían 10 μ l del ADN plasmídico y 3 μ l del oligonucleótido (10 μ M). Los resultados de la secuenciación por el método Sanger fueron analizados con los programas *Chromas* y *SnapGene*.

Plásmidos construidos

Durante el desarrollo de este proyecto se construyeron dos plásmidos: pET3a::*ihfB* Ap^R (generado a través de la técnica de ensamblaje isotérmico (Gibson)), pCDF::*ihfA* Str^R (creado mediante la digestión por enzimas de restricción específicas).

Pruebas de sobreexpresión y solubilidad

Para evaluar la sobreexpresión y solubilidad de IHF $\alpha\beta$, se inocularon 10mL de medio LB suplementado con 10 μ l de estreptomina (Str) y 10 μ l ampicilina (Ap) con una colonia aislada de *Escherichia Coli* C41 portadora de los plásmidos pCDF::*ihfA* y pET3a::*ihfB*. El cultivo se incubó overnight a 37°C y agitación 140 rpm. Al día siguiente, 1 ml de este cultivo se transfirió a un matraz de 50ml de LB agar estéril con los mismos antibióticos y se dejó incubando a 37°C en agitación (140 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.4-0.6, medida en un espectrofotómetro. A continuación, la expresión se indujo añadiendo isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una relación 1:1000, por lo que se añadieron 50 μ l en el matraz de 50 ml y se tomaron muestras postinducción a tiempos 0, 1 hora, 2.5 horas, 5 horas y overnight. En paralelo, se realizó el mismo procedimiento a 25°C. Tras la sobreexpresión overnight, el matraz crecido se centrifugó a 4.000rpm durante 15 minutos a 4°C y el pellet resultante se resuspendió en el tampón de lisis (1,25 ml Tris pH 7,5 (50 Mm), 50 μ l EDTA (1 mM), 25 μ l PMSF (0,001%), 250 μ l DNAsa y 1 ml NaCl (200mM)). El contenido se vertió en un recipiente conservado en hielo y la ruptura celular se efectuó por sonicación.

Una vez se produjo la lisis se llevaron a cabo tres centrifugaciones secuenciales, a partir de las cuales se tomaron muestras, tanto de sobrenadante como de pellet. La primera a 850 x g (15 minutos, 4°C), la segunda a 10.000 x g (15 minutos, 4°C) y la última a 100.000 x g (30 minutos, 4°C) para separar los fragmentos de células intactas, cuerpos de inclusión y proteínas de membrana, respectivamente. El sobrenadante final, correspondiente a la fracción soluble, se recogió para ser purificado.

Finalmente, se prepararon las muestras recogidas a lo largo de los dos ensayos y se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% para ver la producción de nuestra proteína y para comprobar que es soluble.

Purificación del heterodímero IHF α -IHF β

Para la purificación del heterodímero IHF α -IHF β , los plásmidos pCDF::*ihfA* y pET3a::*ihfB*, contenidos en la cepa C41 de *E. coli*, fueron sobreexpresados en 2 L de LB a 25°C overnight tras la inducción con IPTG. Posteriormente, las células se recolectaron por centrifugación a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C y se resuspendieron en el tampón de lisis (50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,001% PMSF, DNAsa, 20mM NaCl, pastilla de inhibidores de proteasas, 50 mg Lisozima). Se incubaron durante 1 hora en el buffer de lisis en hielo y fueron lisadas por sonicación. A continuación, se realizaron las tres centrifugaciones seriadas para obtener la proteína soluble.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

El último sobrenadante obtenido tras la centrifugación a $100.000 \times g$ (30 minutos a 4°C), se ajustó a 100mM de NaCl mediante dilución con tampón sin sal (50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,001% PMSF), dado que la muestra se encontraba a 200mM de NaCl. Seguidamente, se cargó la muestra en la resina P11 (15 ml), previamente equilibrada en tampón A (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,001% PMSF). La elución de la proteína se efectuó con dos volúmenes de columna (2 CV) de un tampón B 0,6M de sal (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,6M NaCl, 0,001% PMSF), seguidos de 2CV de tampón 1M (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1M NaCl, 0,001% PMSF) para asegurar su completa elución.

Antes de la segunda cromatografía de intercambio iónico, se diluyó de nuevo la muestra en el tampón sin sal para reducir la concentración de 1M a 100mM NaCl y, tras descartar precipitados por centrifugación, se cargaron 137 ml sobre una columna de intercambio catiónico Hitrap-Sp-Sepharosa de 1ml. La cromatografía se realizó en el tampón de equilibrio A, de composición ya mencionada, con un gradiente creciente de 0 a 100% de tampón B 1M de sal para eluir las proteínas. Se recogieron fracciones de 750 μl , que se concentraron en centricones (Amicon Ultra 0,5 ml - 3K, Merck Millipore).

Finalmente, para la elución del heterodímero en cromatografía en gel filtración se cargó la muestra en una columna Superdex75 increase 10/300GL equilibrada en tampón S75 (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,001% PMSF, 5% glicerol). Se recogieron fracciones de 300 μl , se cuantificaron por el método Bradford¹⁵ y se alicuotaron para su almacenamiento a -80°C .

Ensayos de retardo en gel de agarosa

El ensayo de gel retardo o *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) se realizó con el objetivo de detectar la formación de complejos proteicos con ácidos nucleicos. Se preparó un gel de agarosa al 3%, disolviendo 3 gramos de *Agarose D1 Medium* en 100ml de TBE1X pH 6,8. La mezcla se fundió en el microondas y, una vez atemperada, se añadieron 2,5 μl de SafeView por cada 50 ml de gel. La mezcla se vertió en la cubeta del gel, se colocó el peine para los pocillos y se dejó solidificar a temperatura ambiente, protegiéndolo de la luz.

El fragmento de ADN del 81pb correspondiente al *oriT* se preparó por hibridación de dos oligos 81-mer comerciales con la secuencia requerida del *oriT* del plásmido:

OriT_81b_Fw(5'CCTGTGTAGTGTTATGCCACTACAATATTGCCGCAACCCCTTGTA AATGCTAGGATTGAACCACTACAGTAACACTACGGG3').

OriT_81b_Rv(5'CCCGTAGTGTTACTGTAGTGGTTCATCCTAGCATTTACAAGGGG TTGCGGCAATATTGTAGTGGCATAACACTACACAGG3').

Para las reacciones de EMSA se prepararon 7 reacciones de 20 μl , incorporando en todas 0,2 μM de ADN *oriT* y aumentando la concentración de proteína IHF $\alpha\beta$ de 0,5 a 5 μM (0,5; 1,0; 1,5;3,0; 4,0; y 5,0 μM), reservando la primera reacción sin proteína a modo de control negativo. El volumen final se ajustó con agua Mili-Q. Las muestras se incubaron a 25°C durante 25 minutos en un termobloque y, tras el periodo de unión, se cargaron en el gel.

Análisis por gel filtración de los complejos

Para la formación del complejo ADN- IHF, se preparó una mezcla de 200 μ l que contenía ADN del *oriT* de 81pb, a una concentración 10 μ M, e IHF $\alpha\beta$, previamente purificada, a una concentración 36 μ M. La reacción se incubó a 25°C durante 25 minutos en el termobloque.

La muestra se cargó directamente en la columna Superdex200 increase 30/100GL a través de un loop de 200 μ l. Para la elución de las proteínas en cromatografía en gel filtración se equilibró la columna, previamente, con tampón S200 (50 mM Pipes pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,001% PMSF). Para comparar los perfiles de elución, se cargó de forma individual la proteína IHF $\alpha\beta$ sola, el fragmento de ADN de 81pb y, posteriormente, el complejo IHF $\alpha\beta$ -ADN.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi profunda gratitud a los directores de este proyecto. Elena e Iñaki, gracias por abrirme las puertas de vuestro laboratorio y ofrecerme la oportunidad de aprender de vosotros. Gracias por ayudarme en cada paso del experimento y por convertir esta experiencia en un recuerdo tan especial. Valoro especialmente la cercanía con la que me habéis acogido, haciendo del ambiente de trabajo un espacio tan agradable.

También quiero destacar el apoyo de Tamara y, muy especialmente, de Adrián, mis compañeros estos meses. Gracias por atender siempre mis incansables dudas y por estar pendientes de mis avances y de mí. Gracias a los dos por acogerme y hacerme sentir cómoda y, por supuesto, por enseñarme tantas cosas. He aprendido muchísimo de vosotros, no solo en lo profesional sino también en constancia e interés . Espero no haber supuesto mucha carga para vosotros y agradezco todo lo que me habéis ayudado.

Para finalizar, agradecer a mi familia, en especial a mis padres y hermanos, por su paciencia y su apoyo incondicional siempre. Gracias por animarme y confiar en mí. También a mis amigos y pareja por estar siempre a mi lado.

Gracias a todos.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS (2020). Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
2. ONU (2022). La OMS alerta de que el desarrollo de nuevos antibióticos está “estancado” | Noticias ONU. Not. ONU. <https://news.un.org/es/story/2022/06/1510742>.
3. von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., and Wolfs, P.F.G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

4. Peñalva, G., Cantón, R., Pérez-Rodríguez, M.T., González-López, J.J., Rodríguez-Baño, J., Barrio-Tofiño, E. del, Kirkegaard-Biosca, C., Sánchez-Romero, I., Gutiérrez-Villanueva, A., Marrodán-Ciordia, T., et al. (2025). Burden of bacterial antimicrobial resistance among hospitalised patients in Spain: findings from three nationwide prospective studies. *Lancet Reg. Health – Eur.* 51. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2025.101220>.
5. Teresa del Campo Gutierrez (2016). Estudio de la red de regulación global de R388. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/165008/1/TesisR388Campo.pdf>.
6. Waksman, G. (2025). Molecular basis of conjugation-mediated DNA transfer by gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 90, 102978. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2024.102978>.
7. Waksman, G. (2019). From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. *EMBO Rep.* 20, e47012. <https://doi.org/10.15252/embr.201847012>.
8. Macé, K., Vadakkepat, A.K., Redzej, A., Lukoyanova, N., Oomen, C., Braun, N., Ukleja, M., Lu, F., Costa, T.R.D., Orlova, E.V., et al. (2022). Cryo-EM structure of a type IV secretion system. *Nature* 607, 191–196. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04859-y>.
9. Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., and Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 81–95. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>.
10. Cabezón, E., Valenzuela-Gómez, F., and Arechaga, I. (2023). Primary architecture and energy requirements of Type III and Type IV secretion systems. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1255852. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1255852>.
11. Agúndez, L., Machón, C., César, C.E., Rosa-Garrido, M., Delgado, M.D., and Llosa, M. (2011). Nuclear Targeting of a Bacterial Integrase That Mediates Site-Specific Recombination between Bacterial and Human Target Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 201–210. <https://doi.org/10.1128/AEM.01371-10>.
12. Moncalián, G., Valle, M., Valpuesta, J.M., and De La Cruz, F. (1999). IHF protein inhibits cleavage but not assembly of plasmid R388 relaxosomes. *Mol. Microbiol.* 31, 1643–1652. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01288.x>.
13. Tato, I., Matilla, I., Arechaga, I., Zunzunegui, S., Cruz, F. de la, and Cabezón, E. (2007). The ATPase Activity of the DNA Transporter TrwB Is Modulated by Protein TrwA: IMPLICATIONS FOR A COMMON ASSEMBLY MECHANISM OF DNA TRANSLOCATING MOTORS *. *J. Biol. Chem.* 282, 25569–25576. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703464200>.
14. Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K., and Nash, H.A. (1996). Crystal Structure of an IHF-DNA Complex: A Protein-Induced DNA U-Turn. *Cell* 87, 1295–1306. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81824-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81824-3).

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

15. Kruger, N.J. (1994). The Bradford Method for Protein Quantitation. In *Basic Protein and Peptide Protocols*, J. M. Walker, ed. (Humana Press), pp. 9–15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>.
16. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A.J., Bambrick, J., et al. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 630, 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
17. PyMOL | pymol.org <https://pymol.org/#screenshots>.
18. Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Información Suplementaria

Estudio bioquímico y estructural de complejos macromoleculares implicados en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos

Ana Merino Hermoso¹, Elena Cabezón Navarro¹ & Ignacio Arechaga Iturregui ¹

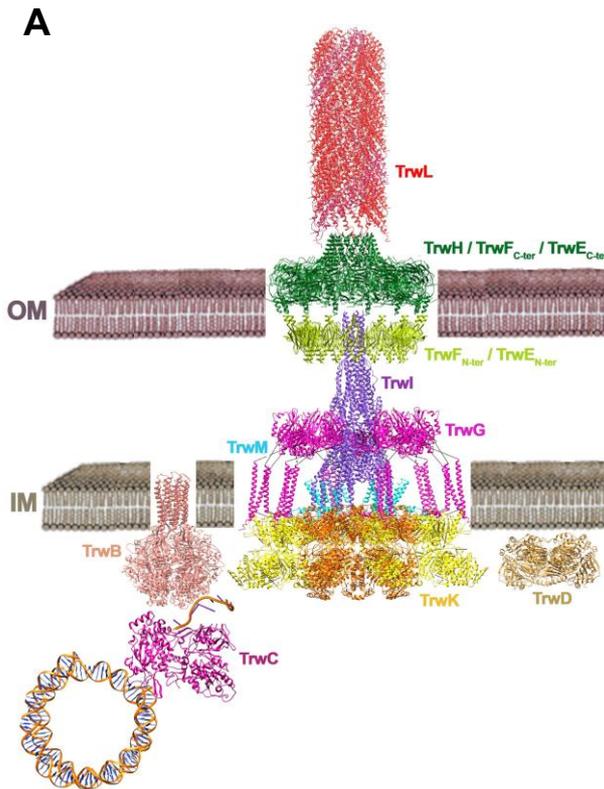


Figura S1. Sistema de Secreción tipo IV

(A) Arquitectura del T4SS del plásmido R388 (figura tomada de Cabezón et al. 2023)¹⁰. Las subunidades se nombran según la nomenclatura de este plásmido. Se compone de 12 proteínas, organizadas en cuatro dominios distintos. El complejo de membrana externa (OMC) está constituido por TrwH, TrwF y TrwE formando en la capa más exterior un ensamblaje tetradecamérico y en la capa más interna hexadecamérico (representado en colores verde oscuro y verde claro, respectivamente). Por otro lado, la región periplásmica está compuesta por un pentámero de TrwJ (en color morado) dispuesto sobre la base del pentámero de TrwI (en color morado) y rodeado de un hexámero de TrwG (en color rosa). El complejo de membrana interna (IMC) se dispone en seis protómeros, cada uno de ellos constituido por un monómero de TrwM (en color cian), un dímero de TrwK (en colores amarillo claro y oscuro) y tres colas N-terminal de TrwG (en color rosa). Finalmente, se incluye la proteína acopladora TrwB (en color marrón), una ATPasa hexámérica anclada a la membrana interna, responsable de conectar el relaxosoma con el canal de secreción. En relación al relaxosoma, se muestra la proteína TrwC (en color magenta) y el ADN plasmídico de doble cadena.

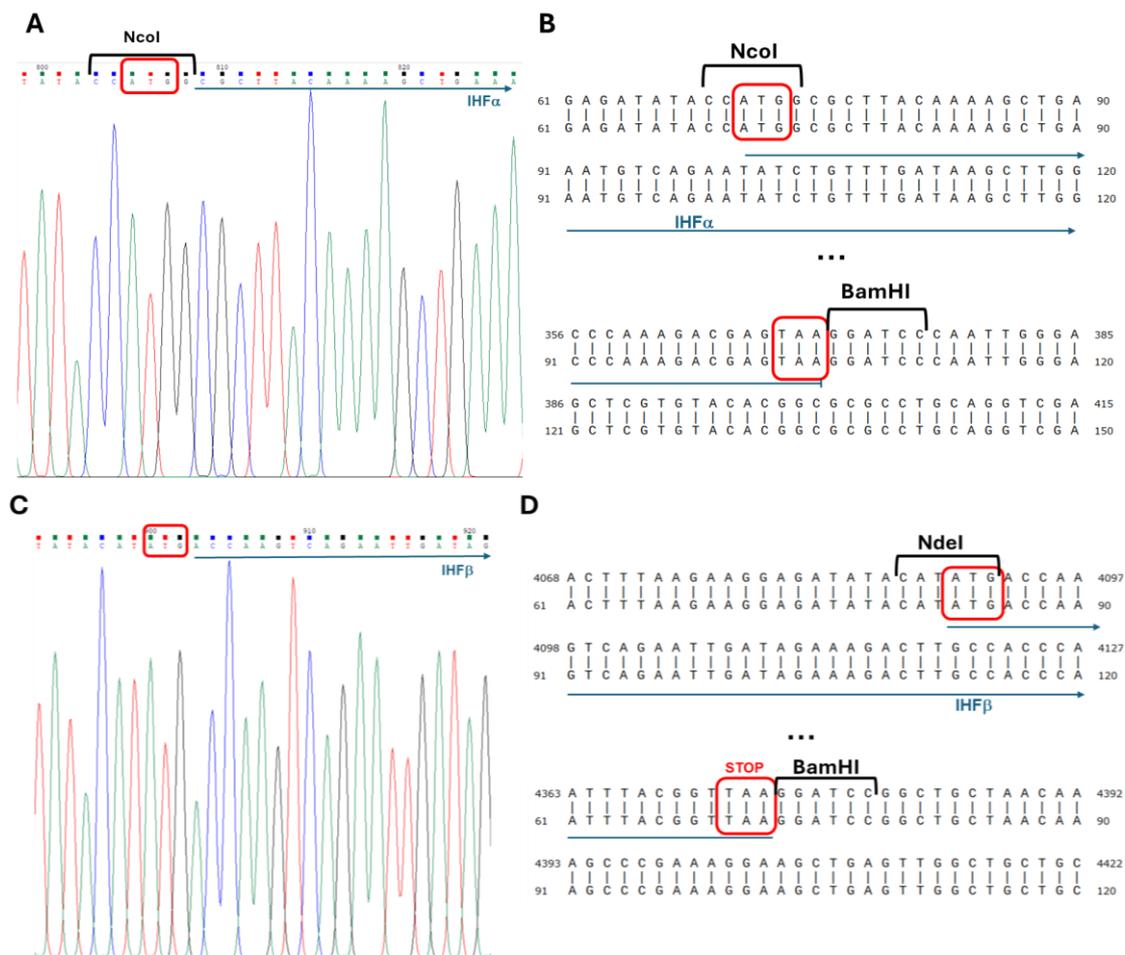


Figura S2. Análisis de los resultados de secuenciación.

(A) Resultado de la reacción de secuenciación de la colonia 3 del plásmido pCDF:*ihfA* visualizado en *Chromas*. El codón de iniciación ATG de la proteína IHF α , en el sitio de clonaje *NcoI* del plásmido, se indica en rojo. (B) Alineamiento, con la aplicación *SnapGene*, de la secuencia teórica del plásmido pCDF:*ihfA* con el resultado de la muestra enviada a secuenciar. Se representan en rojo los codones de inicio y de parada en la secuencia de la proteína. *NcoI* y *BamHI* son las enzimas de restricción empleadas para la introducción de la secuencia de IHF α en el vector pCDF. (C) Resultado de la reacción de secuenciación de la colonia 6 del plásmido pET3a::*ihfB* visualizado en *Chromas*. El codón de iniciación ATG de la proteína IHF β , en el sitio de clonaje de *NdeI* del plásmido, se indica en rojo. (D) Alineamiento, con la aplicación *SnapGene*, de la secuencia teórica del plásmido pET3a::*ihfB* con el resultado de la muestra enviada a secuenciar. Se representan en rojo los codones de inicio y de parada en la secuencia de la proteína. *NdeI* y *BamHI* son las enzimas de restricción que delimitan la secuencia de IHF β en el vector.