



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

“Construcción del vector pGEX-4T-1-LYT1 para la  
expresión de LYT1p de *Trypanosoma cruzi* fusionada a  
GST”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

NORMA EDITH PADILLA MEJIA

ASESORES: DRA. REBECA G. MANNING CELA  
DRA. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTILAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005

m. 340543



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Construcción del vector pGEX-4T-1-LYT1 para la expresión de LYT1p de Trypanosoma cruzi fusionada a GST."

que presenta la pasante: Norma Edith Padilla Mejía  
con número de cuenta: 9639167-3 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

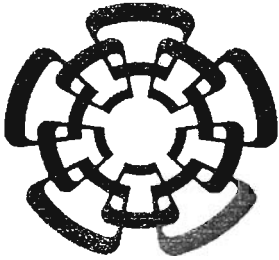
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**A T E N T A M E N T E**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de octubre de 2004.

PRESIDENTE	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>	
VOCAL	<u>Dr. Francisco Montiel Sosa</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Sandra Díaz Barriaga Arceo</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes</u>	



Centro de Investigaciones y Estudios  
Avanzados del IPN  
(CINVESTAV)

Este trabajo de tesis titulado “Construcción del vector pGEX-4T-1-LYT1 para la expresión de LYT1p de *Trypanosoma cruzi* fusionada a GST”, se realizó en su totalidad en el Departamento de Biomedicina Molecular, Laboratorio de Biología molecular y celular de parásitos bajo la dirección de la Dra. Rebeca G. Manning Cela.

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres Lucy y Carlos por todo su amor y su apoyo incondicional en todo momento, por confiar siempre en mí. Este logro es también de ustedes.*

*A mis he'manos Chass y Sandry con mucho, mucho amor; luchen siempre por alcanzar sus sueños.*

*A la Dra. Rebeca Manning C. por todas sus enseñanzas y por introducirme en el loco mundo de la ciencia. Por su confianza y todos sus consejos tanto científicos como personales.*

*A la Dra. Gilda Flores R. por sus consejos y apoyo para la revisión de este trabajo.*

*A mis Amiguis-niñas, mi Compadre, mis Comadres y Amigos por su apoyo y cariño; por escucharme, por su paciencia y por "regañarme" cuando lo he necesitado. Por estar ahí.*

*A todos mis compañeros y amigos de la generación 26 (y también de otras generaciones) por las risas y las fiestas, por su tolerancia y por compartir conmigo esta etapa de nuestras vidas: Olga L., Ruthy, Chucho, Jesús, Lillian, César, Magali, Lisina, Adriana, Carmen, Montañini, Liliana C., Yesilú, Yuritzi, Laura L., Say, Vladimir, Charly, Lalo y muchos más.*

*A la Q.F.B. Claudia Marquez Dueñas por toda su ayuda a lo largo de la parte experimental de este trabajo.*

*Al Biol. Julio García Cordero por su instrucción y su ayuda en la parte de expresión y purificación de proteínas.*

*A todos mis compañeros y amigos del "labo": Clausi, Janneth, Chucho, Gil, Luis E., Luis A., David, Julio, Marisa. Por los "chismes", las comidas y toda su ayuda. Por permitirme aprender de ustedes.*

*A todo el equipo de G.A.: Selene, David, Esme, Yadira, Fá, Jeymy, Consuelo y Frank. Por esas horas de música y brincoteos.*

*À Georgette, pour ses enseignements et ses conseils.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el orgullo de ser Universitaria.*

*A la FES Cuautitlán.*

# INDICE

I. Resumen .....	1
1. <i>Trypanosoma cruzi</i> : Generalidades	
1.1 Clasificación taxonómica.....	3
1.2 Morfología .....	3
1.3 Ciclo de vida.....	5
1.4 Mecanismos de entrada a la célula .....	7
1.4.1 Unión .....	7
1.4.2 Invasión .....	8
1.4.3 Algunas moléculas implicadas en invasión e infección .....	9
TC-TOX .....	10
Peptidil-prolil isomerasa o TcMIP .....	10
Oligopeptidasa B .....	10
LYT1p .....	11
1.5 Epidemiología .....	13
1.5.1 Transmisión .....	14
Por vectores.....	14
Transfusional .....	16
Transplacentaria .....	16
Otros mecanismos de infección .....	16
1.6 Aspectos Clínicos .....	16
1.6.1 Fase aguda .....	17
1.6.2 Fase indeterminada .....	17
1.6.3 Fase crónica .....	18
1.6.4 Forma congénita .....	19
1.7 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas .....	21
1.7.1 Métodos directos .....	21
1.7.2 Métodos indirectos .....	21
1.8 Tratamiento .....	23
1.8.1 Nifurtimox .....	24
1.8.2 Benznidazol .....	24
1.9 Prevención .....	25
2. Justificación e Hipótesis .....	26
3. Objetivos	
3.1 Objetivo general .....	27
3.2 Objetivos particulares .....	27

## 4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales	28
4.2 Estrategia experimental	30
4.3 Métodos	
4.3.1 Plásmido pGEM-T-Easy (Promega)	33
4.3.2 Plásmido pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences)	34
4.3.3 Electroforesis en geles de agarosa	34
4.3.4 PCR (Reacción en cadena de polimerasa)	35
4.3.5 Métodos de purificación de ADNp	
Lisis alcalina	37
Método de STET	38
Extracción de ADNp	38
4.3.6 Reacción de ligación	38
4.3.7 Digestión con enzimas de restricción	39
4.3.8 Transformación	40
4.3.9 Selección y detección de recombinantes	41
4.3.10 Diagrama de construcción del vector pGEX-4T-1-LYT1	42
4.3.11 Electroforesis de proteínas PAGE-SDS	43
4.3.12 Western Blot	43
5. Resultados	44
6. Discusión	56
7. Conclusiones	61
8. Bibliografía	62
9. Apéndices	
I. Metodología de las técnicas utilizadas	65
II. Reacciones enzimáticas	70
III. Mapas de los plásmidos utilizados	
A) pGEM-T-Easy	73
B) pGEX-4T-1	74



## II. Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
Ab	Anticuerpo
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNp	ADN de plásmido
amp	ampicilina
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
Da	Daltones
DTT	Ditiotreitol
GST	Glutación-S-transferasa
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IPTG	isopropil tio- $\beta$ -D-galactósido
kb	kilobases
kDa	Kilo Daltones
<i>LYT1</i>	Secuencia <i>LYT1</i>
LYT1p	Proteína LYT1
min	minutos
M	Molar
ml	mililitros
mM	Milimolar
MOPS	Acido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
nc	nucléotido
ng	nanogramos
OpB	Oligopeptidasa B
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de transcriptasa reversa y PCR
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
TA	Temperatura ambiente
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
ug ó $\mu$ g	microgramos
ul ó $\mu$ l	Microlitros
UV	Luz ultravioleta
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido

## I. Resumen

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es producida por *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* (géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*). Esta enfermedad fue descubierta por Carlos Chagas en Brasil en 1909, quien describió el ciclo de vida completo con sus hospederos, así como los aspectos parasitológicos, epidemiológicos y clínicos de este padecimiento. La enfermedad se encuentra en el continente Americano siendo endémica en ciertas áreas rurales de bajos recursos. Se estima que actualmente existen ~40 millones de personas expuestas a la enfermedad y de 18-20 millones de infectados a nivel mundial, de los cuales, alrededor del 50% es asintomático y aproximadamente el 10% muere de la enfermedad, que generalmente se vuelve crónica.

*Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular obligado que infecta una gran variedad de células de mamíferos. Durante el proceso de infección *T. cruzi* indudablemente utiliza diversas moléculas tanto del parásito como de la célula hospedera; sin embargo, muy pocas han sido demostradas experimentalmente. LYT1p, que es la proteína en estudio del presente trabajo, es la segunda molécula que por evidencias genéticas se sabe que es importante durante el proceso de infección de la célula hospedera. En parásitos mutantes nulos (*knock-out*) se demostró que *LYT1* no es esencial; sin embargo, éstos presentaron tres fenotipos sobresalientes: una infección deficiente, una actividad lítica disminuida y una diferenciación de estadio acelerada. Aparentemente las diversas funciones de LYT1p pudieran ser resultado de un *trans-splicing* alternativo, el cual es regulado diferencialmente en las diferentes etapas de desarrollo del parásito, dando lugar a dos transcritos diferentes: uno que codifica para una proteína conteniendo una posible secuencia señal que podría participar en los procesos de infección y lisis, y otra sin esta posible secuencia señal y con una secuencia nuclear que probablemente pudiera

participar en el proceso de diferenciación de estadio. También, el análisis de una posible mutante dominante negativa de *LYT1* sugirió que esta molécula pudiera ser parte de un complejo proteico.

Continuando con la caracterización de *LYT1*, en el presente trabajo se planteó la clonación de la secuencia que codifica para LYT1p en el vector pGEX-4T-1 con la finalidad de expresar el péptido de fusión GST-LYT1p que permitirá, en trabajos futuros, su purificación para la obtención de anticuerpos específicos contra LYT1p, la realización de ensayos de co-precipitación de proteínas (*Pull Down*) para la identificación de proteínas con las que pudiera estar formando complejos, así como llevar a cabo diversos proyectos subsecuentes que aporten más información acerca de su función.

# 1. *Trypanosoma cruzi*: Generalidades

## 1.1 Clasificación Taxonómica

Subreino	<i>Protozoa</i>
<i>Phylum</i>	<i>Sarcomastigophora</i>
<i>Suphylum</i>	<i>Mastigophora</i>
Clase	<i>Zoomastigophora</i>
Orden	<i>Kinetoplastida</i>
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>
Género y especie (Prescott, 1999)	<i>Trypanosoma cruzi</i>

## 1.2 Morfología

*Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, se caracteriza por la presencia de varias etapas de desarrollo, cuyas características son:

1. **Amastigote:** Forma intracelular de cuerpo esférico u oval que se encuentra en tejidos del hospedero mamífero (figura 1A). Se multiplica por fisión binaria, posee núcleo grande esférico, un cinetoplasto en forma de bastón y un flagelo muy corto que a veces no es visible; mide de 1.5-5  $\mu\text{m}$  de diámetro. El cinetoplasto se conforma por un pequeño blefaroplasto y un cuerpo basal oval.
2. **Epmastigote:** Se encuentra en el intestino del insecto vector, son formas proliferativas, móviles y no se les considera infectivas (figura 1B). De forma alargada y fusiforme mide de 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud. El cinetoplasto y el flagelo se encuentran anteriores al núcleo, que se encuentra en el centro del cuerpo.
3. **Tripomastigotes:** Miden ~25  $\mu\text{m}$  de longitud y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Es alargado, fusiforme (figura 1C). Posee un núcleo grande cerca de la parte

central y a lo largo de su cuerpo tiene una membrana ondulante bordeada por un flagelo, que se inicia en el cinetoplasto y sale por el extremo anterior, lo que le confiere gran movilidad. Los tripomastigotes pueden observarse en tejidos y sangre del hospedero vertebrado, y en el intestino posterior, heces y orina del insecto. No tienen capacidad de división y pueden verse dos formas diferentes:

- *Tripomastigotes sanguíneos*: 1) Alargada, con un núcleo alargado, un cinetoplasto subterminal y un flagelo corto, evoluciona a 2) la forma ancha, con un núcleo oval, un cinetoplasto casi terminal y un flagelo largo, esta forma es la que evoluciona a amastigote. El predominio de una u otra forma depende de la cepa de *T. cruzi* y el tiempo de infección.
- *Tripomastigotes metacíclicos*: Proviene de epimastigotes y se forman en el tracto digestivo del vector, son los responsables de iniciar la infección en el hospedero mamífero (Botero, 1992; Tyler y Engman, 2001; De Souza, 1984).

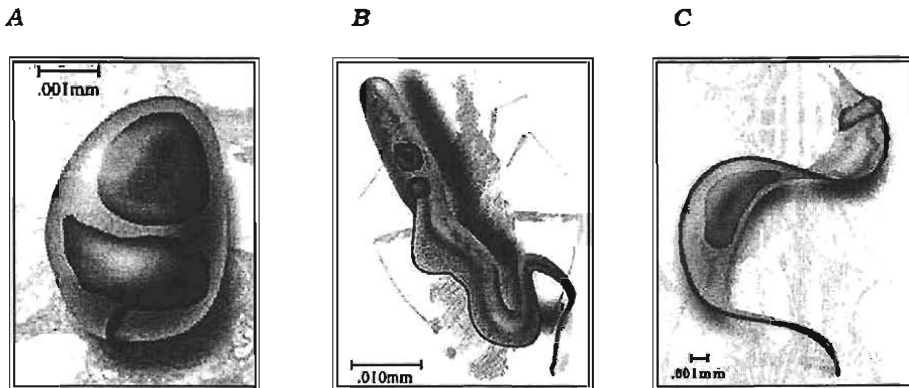


FIGURA 1. Etapas de desarrollo de *Trypanosoma cruzi*: A) Amastigote, B) Epimastigote, C) Tripomastigote.  
(tomada de [www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html](http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html))

## 1.3 Ciclo de vida

*T. cruzi* tiene un ciclo de vida bifásico que, como ya se ha mencionado, incluye cuatro estadios de desarrollo diferentes, dos en insectos reducidos y dos en el hospedero mamífero (figura 2). Durante el ciclo biológico del parásito, los vectores se infectan al ingerir sangre de mamíferos con tripomastigotes sanguíneos circulantes que sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo del vector a epimastigotes y posteriormente a tripomastigotes metacíclicos, siendo éstos últimos los infectantes para el hospedero vertebrado (i). Los triatomíneos infectados, al picar nuevamente al hombre o a los animales y después de una ingestión abundante de sangre, deyectan fácilmente sobre la superficie (a). Los parásitos infectantes (tripomastigotes metacíclicos) salen en estas deyecciones y orina del vector y pueden introducirse al organismo a través del orificio de la picadura, heridas o escoriaciones de la piel o atravesando directamente la mucosa ocular, nasal o bucal (b). Cuando los tripomastigotes metacíclicos infectantes entran al organismo, son fagocitados por los macrófagos y englobados en el fagosoma, de donde escapan y se transforman en amastigotes en el citoplasma (c) (Botero, 1992).

Los amastigotes, a su vez, comienzan a dividirse por fisión binaria y más tarde se diferencian de nuevo en tripomastigotes (llamados tripomastigotes sanguíneos), que rompen las células (d) y pueden infectar nuevas células (e) y llegar a la circulación sanguínea y linfática (f), para luego invadir diversos órganos (g). Estos parásitos liberados a la circulación pueden ser ingeridos por el vector invertebrado completando así el ciclo de vida (h) (Botero, 1992; Burleigh y Andrews, 1995).

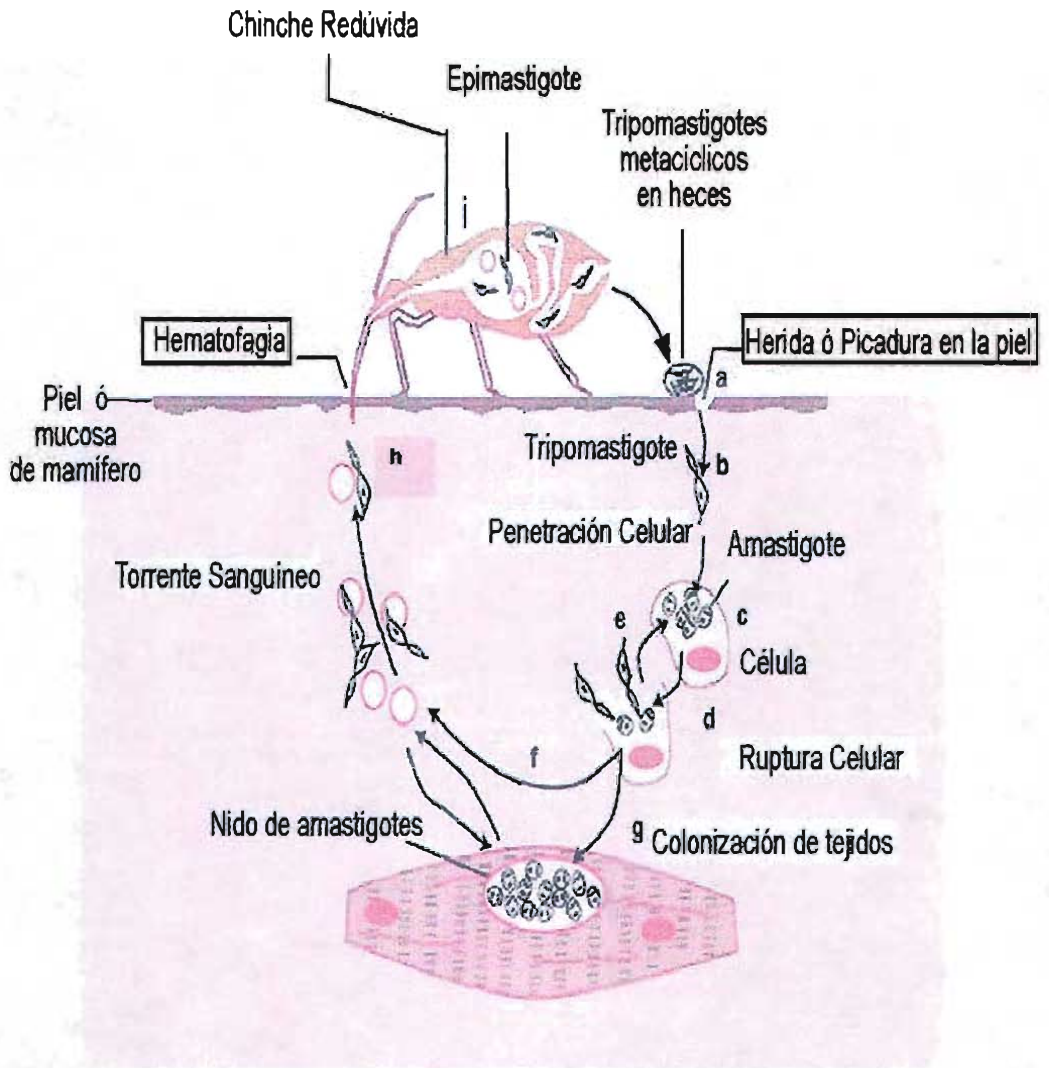


FIGURA 2. Representación del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* ([www-ermm.cbcu.cam.ac.uk](http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk)).

## 1.4 Mecanismos de entrada a la célula

El proceso de invasión de las células hospederas puede dividirse en tres fases: A) la unión del parásito a la membrana plasmática de células hospederas; B) la internación a través de la vacuola parasitófora y C) la ruptura de la membrana vacuolar y la salida del parásito hacia el citoplasma donde se replica y diferencia (Burleigh y Andrews, 1995).

### 1.4.1 Unión

La unión del parásito a la célula blanco es un proceso dependiente de energía (ATP) que parece ser específico. Ya que *T. cruzi* puede invadir diferentes tipos celulares se ha sugerido que podría existir un receptor celular común, o bien, que las glicoproteínas de superficie del parásito se unen a diferentes receptores específicos con características bioquímicas similares, los cuales aún no han sido identificados. Algunas moléculas del parásito, tales como trans-sialidasas, la penetrina y glicoproteínas de superficie (gp82, gp90), han mostrado ser importantes en los procesos de unión e invasión celulares. También se ha sugerido que moléculas con carga negativa en la superficie de las células, tales como el ácido siálico pudieran promover la unión y entrada del parásito; además de que se les han relacionado con el tropismo de los tripomastigotes por tejidos específicos en el vertebrado (Burleigh y Andrews, 1995; López *et al*, 2002). Todos estos resultados parecen sugerir que la unión del parásito a la célula hospedera no es resultado de la simple unión ligando-receptor sino el resultado de la participación de diversas moléculas tanto del parásito como de la célula hospedera.



## 1.4.2 Invasión

La entrada de los tripomastigotes involucra el reclutamiento y fusión de lisosomas de la célula hospedera al sitio de invasión. Este proceso inicia con la acumulación gradual de lisosomas debajo de la membrana plasmática de la célula en el sitio de unión del tripomastigote, los lisosomas se fusionan gradualmente con la membrana plasmática, se forma una única vacuola parasitófora e inicia la invasión (figura 3) (Tan y Andrews, 2002; López *et al*, 2002).

La fuerte asociación entre las moléculas de superficie del tripomastigote (posiblemente transialidasas) y las de los lisosomas celulares (rica en ácido siálico y glicoproteínas) parece prevenir la liberación extracelular del contenido lisosomal durante la invasión de *T. cruzi*. Dichas interacciones posiblemente sellan la vacuola y faciliten la internación del parásito. Así, el ácido siálico podría requerirse no sólo para la unión inicial del tripomastigote a la célula hospedera, sino también para la formación de la vacuola parasitófora (López *et al*, 2002).

También en las primeras etapas de la invasión el contacto entre el tripomastigote y la célula hospedera desencadena eventos de señalización, lo que produce elevaciones rápidas y repetitivas del calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en la célula hospedera y en el tripomastigote. En el caso de la célula hospedera estos eventos parecen estar involucrados en el reclutamiento de los lisosomas y al parecer vuelven a las células más susceptibles a la invasión. Además, se ha sugerido que el tropismo observado *in vivo* hacia el músculo y neuronas podría basarse en esta señalización de calcio. Reportes recientes han sugerido que los lisosomas se reclutan para reparar la lesión en la membrana plasmática, siendo entonces “secuestrados” por los tripanosomas y utilizados como vehículo para la invasión celular. En el caso del tripomastigote, este aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  podría inducir la exocitosis de moléculas del parásito necesarias para el

para el proceso de invasión, aunque esto no está comprobado (Burleigh y Andrews, 1995; Tan y Andrews, 2002).

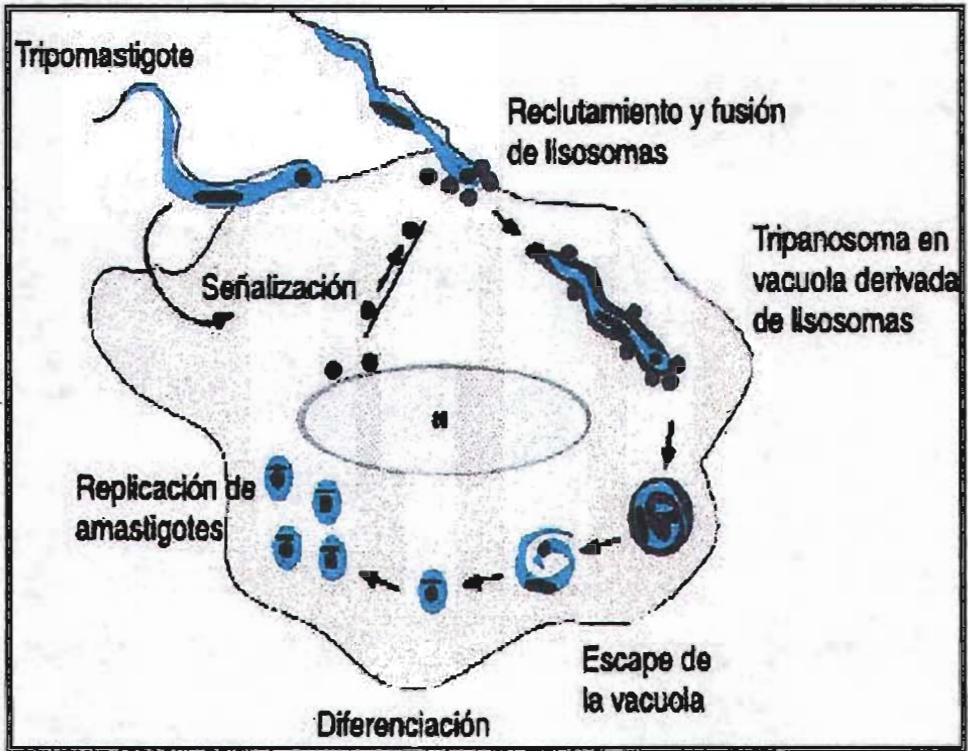


FIGURA 3. Ciclo de infección intracelular por *T. cruzi* (tomado de Burleigh y Woosley, 2002).

### 1.4.3 Algunas moléculas implicadas en invasión e infección

A la fecha, son pocas las moléculas del parásito cuya participación en el proceso de invasión e infección se hayan demostrado, entre las que se encuentran TC-TOX, una peptidil-prolil *cis* o *trans* isomerasa, Oligopeptidasa B y LYT1p, sin embargo, únicamente para estas dos últimas se cuenta con las

evidencias genéticas que demuestran su participación en el proceso de infección.

- **TC-TOX:** Es una proteína secretada por amastigotes de *T. cruzi*, activa a pH ácidos. Esta proteína presenta reacción cruzada con anticuerpos anti-C9 del sistema de complemento, y se sugiere podría intervenir en la destrucción de tejidos al ser secretada. TC-TOX genera poros en la membrana vacuolar cuando es secretada en el medio ácido del fagosoma, por lo que podría participar en el escape de *T. cruzi* del fagosoma al citosol (Andrews *et al*, 1990).

- **Peptidil-prolil isomerasa o TcMIP:** (*T. cruzi* macrophage invasion potentiator) Es uno de los principales factores de virulencia secretado por tripomastigotes de *T. cruzi*; que se sugiere es necesaria para la invasión celular (Burleigh y Andrews, 2002).

- **Oligopeptidasa B:** (OpB) Es una proteína requerida para llevar a cabo procesos de infección e invasión eficientes. Se propone que oligopeptidasa B funciona generando un agonista activo de calcio a partir de una molécula precursora en el citosol, que al ser secretado se une a un receptor en la célula hospedera y desencadena una vía de señalización que promueve incrementos del  $[Ca^{2+}]_i$ . Este flujo de  $Ca^{2+}$  contribuiría a la movilización de lisosomas necesarios para la entrada de *T. cruzi* a la célula. Evidencias genéticas demuestran la participación de OpB en la invasión e infección ya que parásitos nulos (doble *knock-out*) muestran menos infectividad comparado con los parásitos silvestres (*wild-type*) además de que su capacidad para generar incrementos de calcio disminuye. Por otro lado, los parásitos *knock out* sencillos muestran niveles intermedios de dichos eventos presentando un efecto de dosis y confirmando así su participación en el proceso de infección del parásito. Su papel en la señalización de  $Ca^{2+}$  se demostró con ensayos de reconstitución utilizando una oligopeptidasa B recombinante (Caler,

1998). Se han detectado otras moléculas como la cruzipaina y gp82 que también provocan una movilización de calcio en la célula hospedera, sin embargo, parecen llevarlo a cabo de forma diferente a OpB (Burleigh y Woolsey, 2002).

- **LYT1p:** Es la segunda molécula cuya participación en el proceso de infección del parásito se demostró mediante estrategias genéticas. Parásitos mutantes nulos (*knock-out*) mostraron que LYT1p no es esencial; sin embargo, su ausencia se refleja en tres fenotipos sobresalientes: una capacidad infectiva disminuida, una transición de estadio acelerada *in vitro* y una disminución en su actividad hemolítica. Su papel en la infectividad del parásito se comprobó al reconstituir esta actividad reintroduciendo *LYT1* en parásitos mutantes nulos (Manning-Cela *et al*, 2001).

La obtención de fenotipos tan diversos como resultado de la ausencia de *LYT1*, planteó la pregunta de cómo una proteína puede estar involucrada en procesos tanto extracelulares (infectividad y hemólisis) como intracelulares (regulación de transición de estadio). Una posibilidad es que LYT1p participara en una vía de señalización común a ambos procesos, o bien, que se expresaran diferentes formas de la proteína (Manning-Cela *et al*, 2001). Esta segunda posibilidad fue demostrada por experimentos de extensión 5' y RT-PCR en donde se observó que *LYT1* sufre un *trans-splicing* alternativo regulado en los diferentes estadios de desarrollo del parásito, dando lugar a la expresión de 3 diferentes transcritos del gen *LYT1* que podrían a su vez producir dos proteínas diferentes:

- Una conteniendo una posible secuencia señal, por lo que podría ser secretada; característica que sería consistente con la actividad hemolítica y capacidad infectiva que presenta el parásito.

- Una nuclear, carente de la posible secuencia señal y conteniendo una secuencia nuclear, consistente con el fenotipo de desarrollo de estadio del parásito (Manning-Cela *et al*, 2002).

El análisis de una clona *knock out* de *LYT1*, denominada L13, que mostró retener ambos alelos *LYT1* más un alelo adicional truncado de *LYT1*, presentó los tres fenotipos obtenidos en los mutantes nulos (capacidad infectiva y hemolítica disminuida y capacidad de transición de estadio incrementada). Este fenotipo es consistente con el comportamiento de una mutante dominante negativa en que la copia adicional truncada de *LYT1* parece estar inhibiendo la función de la proteína normal, lo que sugiere que posiblemente *LYT1p* es parte de un complejo proteico (Manning-Cela, 2003).

Cabe mencionar que *LYT1p*, al igual que TC-TOX, presenta reacción cruzada con anticuerpos específicos anti- C9 de la vía del complemento, por lo que podría estar relacionada estructuralmente con esta proteína y, ya que presentan actividad lítica similar, podrían estar involucradas en la misma vía (Manning-Cela *et al*, 2001). Además, ya que *LYT1p* es una proteína posiblemente secretada y cuya función está dada en los tiempos tempranos de la infección, la coloca como un buen candidato a ser presentada en el contexto de moléculas de clase I. Por ello fue evaluada como posible vacuna genómica contra la infección de *T. cruzi*. Los resultados mostraron que esta vacuna fue capaz de activar la respuesta inmune activando células citotóxicas CD8<sup>+</sup>, generando memoria en células T efectoras (CD4<sup>+</sup>), activando la producción de IFN- $\gamma$ , así como confiriendo inmunidad contra la infección de *T. cruzi* protegiendo al 80% de los ratones que fueron mortalmente inoculados con el parásito (Fralish y Tarleton, 2003).

Lo anterior muestra la importancia de continuar los esfuerzos dirigidos a entender el o los mecanismos que LYT1p utiliza durante el proceso de infección del parásito.

## 1.5 Epidemiología

La enfermedad de Chagas se presenta sólo en el continente Americano, siendo una zoonosis de considerable importancia tanto médica como veterinaria. En el año 2000 se estimó que existían de 18-20 millones de personas infectadas con *T. cruzi* (aunque algunos autores consideran que esta cifra ha disminuido a ~ 11 millones), mientras que el número de personas que se encuentran en riesgo latente de ser infectadas también ha disminuido de 100 a 40 millones gracias a los programas de prevención en Sudamérica. Los datos estadísticos más recientes indican que existen ~ 200 000 casos nuevos y 21 000 muertes por la enfermedad cada año (Urbina y Docampo, 2003). A nivel mundial, la enfermedad de Chagas representa la 3er enfermedad parasitaria más extendida, sólo después de la malaria y la esquistosomiasis. El Censo Nacional de Población y Vivienda 2000 estima que en México el número de individuos infectados es de más de 1.5 millones de personas (Guzmán-Bracho, 2001).

Las principales áreas de distribución de la enfermedad incluyen las zonas cálidas y húmedas de México, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Brasil, Argentina, Uruguay, el norte de Chile, etc., existiendo pocos casos en el sur de los Estados Unidos como Texas y California (figura 4) (Piekarski, 1989).



FIGURA 4. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas (tomado de [www.medscape.com](http://www.medscape.com))

### 1.5.1 Transmisión

- **Por vectores**

La tripanosomiasis americana es transmitida por insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* (figura 5). En México, existen 31 especies diferentes de vectores, siendo las más importantes por su relevancia de transmisión del parásito a humanos: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. longipennis*, *T. mazzotti*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* y *T. picturata* y, además en otros países *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Panstrongylus megistus* (Guzmán-Bracho, 2001).

La transmisión a humanos se observa principalmente en áreas rurales cuyas condiciones sanitarias y socioeconómicas son pobres y está relacionada con la naturaleza doméstica del vector, el cual vive y se multiplica dentro de las viviendas en las grietas, orificios y techos de palma de las casas de adobe. La transmisión ocurre, no por la picadura, sino por el contacto de heridas o de membranas mucosas con las heces del insecto contaminadas con tripanosomas metacíclicos; así, la transmisión a humanos depende de los hábitos de defecación del vector, pues en las áreas en las que las especies locales de insectos no defecan mientras se alimentan casi no hay infecciones en humanos (García, 1988; Piekarski, 1989).

Cabe mencionar que dentro de la población reducida la infección por tripanosoma se mantiene a través de la coprofagia y el canibalismo, y al parecer, puede ser también heredada (Piekarski, 1989). Lo anterior muestra que la enfermedad seguirá transmitiéndose siempre que la pobreza de la población permita un contacto íntimo entre los triatomas y el hospedero humano. Las chinches reducidas tienen también contacto con una gran variedad de mamíferos domésticos y selváticos: gatos, perros, roedores domésticos y salvajes, marsupiales, armadillos, mapaches, tlacuaches, etc., que sirven como reservorios de la enfermedad (OPS, 1994).

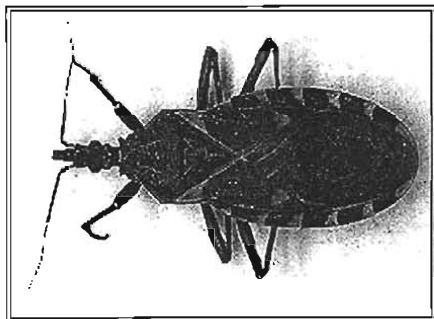


FIGURA 5 : Chinche *Triatoma* (tomado de [www.ento.okstate.edu](http://www.ento.okstate.edu)).



- **Por transfusión sanguínea:** La infección por medio de la transfusión sanguínea y/o hemoderivados se considera la segunda vía de transmisión más frecuente en zonas endémicas de la enfermedad.
- **Transplacentaria y por lactancia:** En estos casos, la transmisión puede o no presentarse dependiendo de la cepa de *T. cruzi* de la que se trate.

Estas últimas vías de transmisión parecen ser el resultado de la urbanización de la enfermedad, debido a la migración de la población de zonas rurales hacia áreas industrializadas.

- **Otros mecanismos de infección:** El trasplante de órganos, la ingestión de carne cruda o sangre de animales contaminados que favorece la entrada del parásito por las mucosas, manipulación de sangre y tejidos y manejo de animales en laboratorio, aunque menos frecuentes son también vías de infección (Botero, 1992; Piekarski, 1989; OPS, 1994).

## 1.6 Aspectos clínicos

La enfermedad se caracteriza clínicamente por la existencia de tres fases: A) aguda, B) indeterminada o latente y C) crónica. En niños menores a 5 años, la enfermedad se presenta en su forma aguda de manera más severa mientras que en niños mayores y adultos la enfermedad es más ligera y se diagnóstica comúnmente en su forma subaguda o crónica (Botero, 1992; Piekarski, 1989).

### 1.6.1 Fase aguda

Presenta un periodo de incubación de 10-30 días y generalmente dura de 1-2 meses. Inicia con la multiplicación del parásito y su diseminación en tejidos locales, lo que causa una reacción inflamatoria en el sitio de infección conocido como chagoma el cual desaparece de 2 a 3 meses después por lo que la enfermedad puede llegar a pasar desapercibida. Si la ruta de inoculación es la mucosa ocular, se presenta conjuntivitis y edema de los párpados conocido como signo de Romana (figura 6). Posteriormente, las formas infectivas se esparcen a los nódulos linfáticos regionales, que aumentan de tamaño y se endurecen. Los tripomastigotes aparecen en sangre aproximadamente 10 días después de la infección persistiendo durante la fase aguda y no en la fase crónica (Guzmán-Bracho, 2001; García, 1988; Piekarski, 1989). Algunos signos de esta fase son: anemia, fiebres altas, hepatoesplenomegalia, miocarditis aguda, irritabilidad y ansiedad, cefalea, dolores musculares, etc.

La proliferación de amastigotes dentro del músculo cardiaco lo destruye y produce pérdida de la contractibilidad cardiaca, por lo que la muerte sobreviene por insuficiencia o paro cardiaco. La fase aguda resulta fatal en pocas semanas o meses en un 5% a 10% de los pacientes dependiendo de la región (Botero, 1992; García, 1989).

### 1.6.2 Fase indeterminada

Durante esta fase es muy difícil localizar parásitos en sangre y los pacientes permanecen aparentemente asintomáticos durante prolongados periodos. Las pruebas serológicas son positivas y las pruebas como el electrocardiograma y las radiografías son normales. Durante esta fase pueden

encontrarse en el corazón infiltrados inflamatorios pequeños y cicatrices fibrosas. En ~ 30% de los pacientes, esta fase evoluciona a la fase crónica (Guzmán-Bracho, 2001; OPS, 1994).

### 1.6.3 Fase crónica

Puede ser inicialmente asintomática y tiene una evolución lenta y progresiva. Un porcentaje variable de personas, dependiendo de la zona geográfica, presenta las manifestaciones cardíacas (figura 7) o digestivas (figura 8) que caracterizan esta fase. En México, las manifestaciones cardíacas aparecen en ~20% de personas infectadas, mientras que en otros países como Brasil se ha reportado hasta un 43% (Guzmán-Bracho, 2001; García, 1988; OPS, 1994).

Las visceromegalias: megaesófago, megaestómago y megacolon, parecen ser resultado de la destrucción neuronal del tracto digestivo, de un proceso inflamatorio y/o de una posible respuesta autoinmune por la probable reacción cruzada entre antígenos de *T. cruzi* y células de mamífero. Estos signos (tabla 1) parecen depender de la cepa del parásito y, por lo tanto, están relacionados con la región geográfica en donde se presentan. Las lesiones digestivas son poco comunes en México, Centroamérica y Venezuela; pero muy comunes en Brasil, Chile y Argentina. La fase crónica puede desarrollarse por años o décadas tras una infección no detectada o tras el diagnóstico de la enfermedad aguda (Guzmán-Bracho, 2001; García, 1988; OPS, 1994).

Tabla 1. Síntomas y signos de la fase crónica.

Problemas cardiacos	Tracto Gastrointestinal		Otros órganos afectados
Cardiomegalia	Disfagia	Constipación	S. Nervioso
Arritmia	Malnutrición	Meteorismo	Tiroides Uréteres
Cambios en la conducción	Dilatación	Dolor abdominal	Glándulas adranles
Tromboembolia	Pérdida de la contractibilidad	Incapacidad para eliminar heces	Bazo, Hígado
Posible ruptura ventricular	Regurgitación	Estreñimiento	Médula ósea, pulmón
	Aumento de glándulas salivales		Gónadas

(tomado de Guzmán-Bracho, 2001; García, 1988; OPS, 1994).

#### 1.6.4 Forma congénita

La transmisión congénita se puede presentar tanto en la fase aguda o crónica de la enfermedad y se caracteriza por la muerte del producto, bajo peso al nacer, anemia, desnutrición, miocarditis, alteraciones neurológicas, muerte prematura tras el nacimiento, así como hepato y esplenomegalia (Botero, 1992). La infección por lactancia es posible, sin embargo, ambas rutas de transmisión dependen mucho de la cepa de *T. cruzi* (Piekarski, 1989).



Figura 6. Signo de Romã  
([www.members.tripod.com](http://www.members.tripod.com))

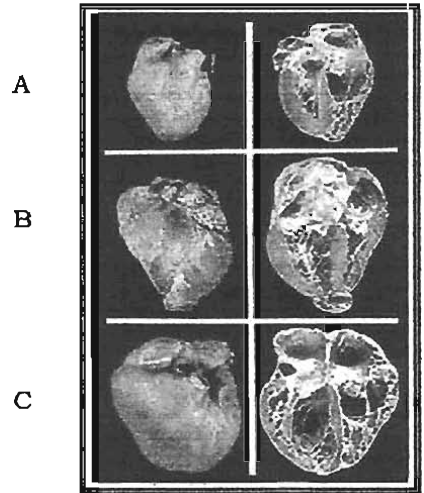


Figura 7. A) Coraz3n normal  
B y C) Cardiomegalia  
([www.ovpr.ugu.edu](http://www.ovpr.ugu.edu))



Figura 8. Megavisceras  
([www.health.gov.mt/impaedcard](http://www.health.gov.mt/impaedcard))

## 1.7 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es diagnosticada utilizando técnicas directas -detectan al parásito- o indirectas -detectando anticuerpos específicos contra *T. cruzi*-. La selección de la prueba depende de la fase clínica en la se encuentre el paciente y de su especificidad y precisión. Debe tomarse en cuenta que las infecciones con *Trypanosoma rangeli* (especie no patógena) se presentan en humanos y pueden confundirse con *T. cruzi* (Guzmán-Bracho, 2001; Piekarski, 1989).

### 1.7.1 Métodos Directos

Se utilizan generalmente durante la fase aguda en la que la parasitemia es alta y la detección puede realizarse por:

- Identificación de tripomastigotes en sangre o amastigotes en tejidos por raspado del chagoma en el sitio de picadura, utilizando la tinción de Giemsa.
- Biopsia, observación de nidos de amastigotes en ganglios, bazo, músculo (*postmortem*).
- Métodos de concentración de parásitos, como el método Strout o el microhematocrito para determinar el grado de parasitemia (Botero, 1992; Gulh *et al*, 2002).

### 1.7.2 Métodos Indirectos

Se utilizan en la fase crónica de la enfermedad que es de baja parasitemia, sugiriéndose utilizar dos o tres métodos para confirmar los resultados.

- **XENODIAGNOSTICO:** Se permite que chinches libres de infección piquen a los pacientes con sospecha de estar infectados y después de un periodo de incubación se buscan parásitos en las heces de los insectos por examen microscópico. Su efectividad en la enfermedad aguda es del 85%, en la congénita del 80% y del 49% en la crónica (Botero, 1992).

- **CULTIVO:** Para la siembra se utiliza sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), macerado de tejidos o raspado del chagoma. Se utilizan medios tales como: LIT (Liver-Infusion-Tryptose), NNN (Novy-MacNeal-Nicolle a veces complementado con 30% de sangre de conejo), Noeller, Packchanian, Davis, etc. (Botero, 1992).

- **INOCULACIONES EN ANIMALES:** Ratones, cobayos y perros jóvenes, que se inoculan con sangre, contenido intestinal, deyecciones o macerado de insectos vectores. Se recurre a esto principalmente para el estudio de la virulencia de las cepas de tripanosomas o diferenciar las especies visualizadas en las deyecciones de los redúvidos (Botero, 1992).

- **PRUEBAS SEROLÓGICAS CONVENCIONALES:** ELISA, IFA (inmunofluorescencia indirecta), IHA (hemaglutinación indirecta), RIA (radioinmunoensayo) y fijación del complemento. Un problema de éstas pruebas es que pueden dar reacción cruzada con otros antígenos. Pueden ser utilizadas para llevar a cabo el seguimiento del paciente sometido a quimioterapia como tratamiento de la enfermedad (Guhl *et al*, 2002).

- **PRUEBAS NO CONVENCIONALES:** Son pruebas utilizadas generalmente en la investigación, basadas en pruebas serológicas y empleando proteínas recombinantes, antígenos purificados, anticuerpos monoclonales o péptidos sintéticos que incrementan la especificidad del diagnóstico y evitan reacciones cruzadas. Aunque la mayoría de estas pruebas son altamente específicas, su

sensibilidad puede ser menor que la de la serología convencional (Guhl *et al*, 2002).

- PCR : Detecta al parásito por medio de la amplificación de un fragmento de ADN del kinetoplasto, de regiones repetidas nucleares específicas o de la detección de la secuencia del mini exón. La prueba de PCR ha reportado una alta sensibilidad y 100% de especificidad siendo útil para diferenciar entre *T.cruzi* y *T.rangeli*. (Guhl *et al*, 2002).

- OTROS: Pruebas de gabinete, principalmente electrocardiogramas y radiografías de corazón, esófago y colon. El diagnóstico epidemiológico es importante: lugar de procedencia, tipo de habitación, conocimiento de los triatomíneos, picadura por triatomíneos (OPS, 1994).

## 1.8 Tratamiento

El nifurtimox y el benznidazol son dos fármacos efectivos contra los tripomastigotes, sin embargo, no garantizan la curación completa aunque pueden reducir la parasitemia. Ambos medicamentos producen serios efectos adversos si se usan por largo tiempo, siendo otro problema la sensibilidad entre diferentes cepas del parásito (Maya *et al*, 2003; Urbina y Docampo, 2003). El tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica (tabla 2) está dirigido también hacia los síntomas que se presentan en los órganos afectados; usando antiarrítmicos, anticoagulantes, marcapasos y tratamientos quirúrgicos en caso de megavisceras (OPS, 1994).

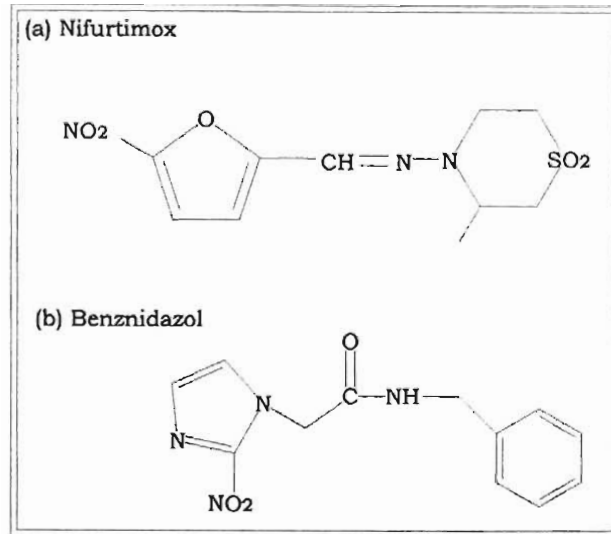


### 1.8.1 Nifurtimox

Nitrofurano que se reduce intracelularmente en su grupo nitro a un anión inestable que produce  $O_2^{\bullet}$  y  $H_2O_2$  y otros radicales libres altamente tóxicos, cuyos metabolitos reaccionan con macromoléculas celulares produciendo daños en la célula tales como: peroxidación de lípidos, daños en la membrana y en el ADN, inactivación de enzimas y de la síntesis proteica. Lo anterior constituye su modo de acción contra *T. cruzi* y la razón de sus efectos tóxicos en tejidos (figura 9) (Maya *et al*, 2003; Urbina y Docampo, 2003). Las manifestaciones adversas que produce: anorexia, trastornos neuropsiquiátricos y afectivos, convulsiones, daño cerebral, alergias, cefalea, vértigo, excitación mental, síntomas gastrointestinales, pérdida de sueño, inmunosupresión, leucopenia, disminución del conteo espermático, debilidad, mutagénesis (Botero, 1992; OPS, 1994).

### 1.8.2 Benznidazol

Del grupo de los nitroimidazoles, este fármaco no parece generar radicales oxidativos, sino que probablemente sus metabolitos reducidos actúan uniéndose covalentemente a macromoléculas, causando así sus efectos tripanocidas y tóxicos (figura 9) (Maya *et al*, 2003; Urbina y Docampo, 2003). Produce manifestaciones cutáneas y neuropatía, náuseas, granulocitopenia, cefalea, anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, mareos, vómito, trombocitopenia (Botero, 1992).



**FIGURA 9.** Estructura química del nifurtimox y benznidazol.  
(tomada de Urbina y Docampo, 2003).

## 1.9 Prevención

En las áreas endémicas, las medidas profilácticas para el control de la enfermedad de Chagas incluyen:

- Mejora de las viviendas y de las condiciones de vida (OPS, 1994)
- Uso de insecticidas para eliminar el vector de las viviendas (OPS, 1994)
- Educación al público en general sobre las formas de transmisión de la enfermedad (OPS, 1994)
- Monitoreo obligatorio de los donadores de sangre y educación del personal de salud (OPS, 1994)
- Implantar programas de control de calidad de las pruebas serológicas para la detección eficaz de la infección (OPS, 1994)

## 2. Justificación e hipótesis

### Justificación

*Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular obligado que infecta una gran variedad de células de mamíferos. Durante este proceso *T. cruzi* indudablemente utiliza diversas moléculas tanto del parásito como de la célula hospedera; sin embargo, muy pocas han sido demostradas experimentalmente. LYT1p, proteína en estudio del presente trabajo, es la segunda molécula cuya importancia durante el proceso de infección de la célula hospedera se demostró por evidencias genéticas (Manning-Cela *et al*, 2001). El análisis de parásitos mutantes nulos (*knock-out*) demostró que *LYT1* no es esencial y que esta molécula participa tanto en procesos extracelulares (infectividad y hemólisis) como intracelulares (regulación de transición de estadio). Además, el análisis de una posible mutante dominante negativa de *LYT1* sugirió que esta molécula pudiera ser parte de un complejo proteico (Manning-Cela, 2003).

Para continuar con la caracterización de LYT1p es necesaria la identificación de las proteínas con las que pudiera estar formando dichos complejos, saber si la unión con éstas es necesaria para su función o modificación, determinar si más de una forma de la proteína es producida, así como la localización de las mismas dentro del parásito. Por esto, en el presente trabajo planteamos la siguiente hipótesis y objetivos para continuar con la caracterización de LYT1p.

### Hipótesis

Si logramos insertar en fase la secuencia LYT1 en el vector pGEX-4T-1, entonces podremos inducir la expresión de la proteína de fusión GST-LYT1p, la cual podrá ser obtenida tras su purificación con perlas de Glutación-Sepharosa.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Clonación de la secuencia que codifica a LYT1p en el vector de expresión pGEX4T-1 para la expresión, purificación y detección de la proteína de fusión GST-LYT1p.

### 3.2 Objetivos Particulares

- Amplificación de *LYT1* por la técnica de PCR y su clonación en el vector pGEX-4T-1.
- Expresar e identificar la proteína de fusión GST-LYT1p.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Materiales

#### Reactivos

Ac. acético glacial  
Acetato de sodio y potasio  
Agar bacteriológico  
Agarosa  
Agua miliQ  
Ampicilina  
Azul de Coomassie  
Bis-acrilamida  
Bromuro de Etidio  
CaCl<sub>2</sub>  
EDTA  
Etanol  
Fenol:cloroformo:isoamilico  
Fijador fotográfico  
Glicerol  
Glucosa  
IPTG  
Isopropanol  
KCl  
Leche Svelty  
Medio LB  
Metanol  
MOPS  
NaCl  
NaOH  
Persulfato de amonio  
Revelador fotográfico  
SDS  
TEMED  
Tris-Cl  
Tritón X-100  
X-gal

#### Material

Cajas de Petri  
Cristalería  
Gradillas  
Mecheros  
Micropipetas  
Papel de nitrocelulosa  
Papel Whatmann  
Perlas de vidrio  
Placas radiográficas  
Puntas para micropipetas  
Termómetro  
Tripiés  
Tubos eppendorf 1 y 0.600 ml  
Tubos para PCR

#### Equipo

Agitador con temperatura  
Balanza analítica  
Baño de agua  
Cámara para fotografía de geles  
Cámaras de electroforesis  
Centrifuga  
Cronómetro  
Espectofotómetro UV y visible  
Incubadoras  
Microcentrifuga  
Termociclador  
Termómetro  
Transiluminador UV-Vis  
Vortex

**ENZIMAS**

*EcoR* I (Biolabs)\*

Lisozima

RNAasa

T4 ligasa (Biolabs)\*

Platinum Taq DNA polimerasa HIFI (Gibco)\*

GoTaq Taq DNA polimerasa (Promega)\*

*Xho* I (Biolabs)\*

\*con buffer respectivo

**OTROS**

Anticuerpo policlonal anti-GST

Anticuerpo anti-ratón peroxidado

Células *E. coli* calcio competentes

Glutación-Sepharosa 4B (Amersham)

Marcadores de peso molecular de ADN y proteínas

Plásmido pGEM-T-Easy (Promega)

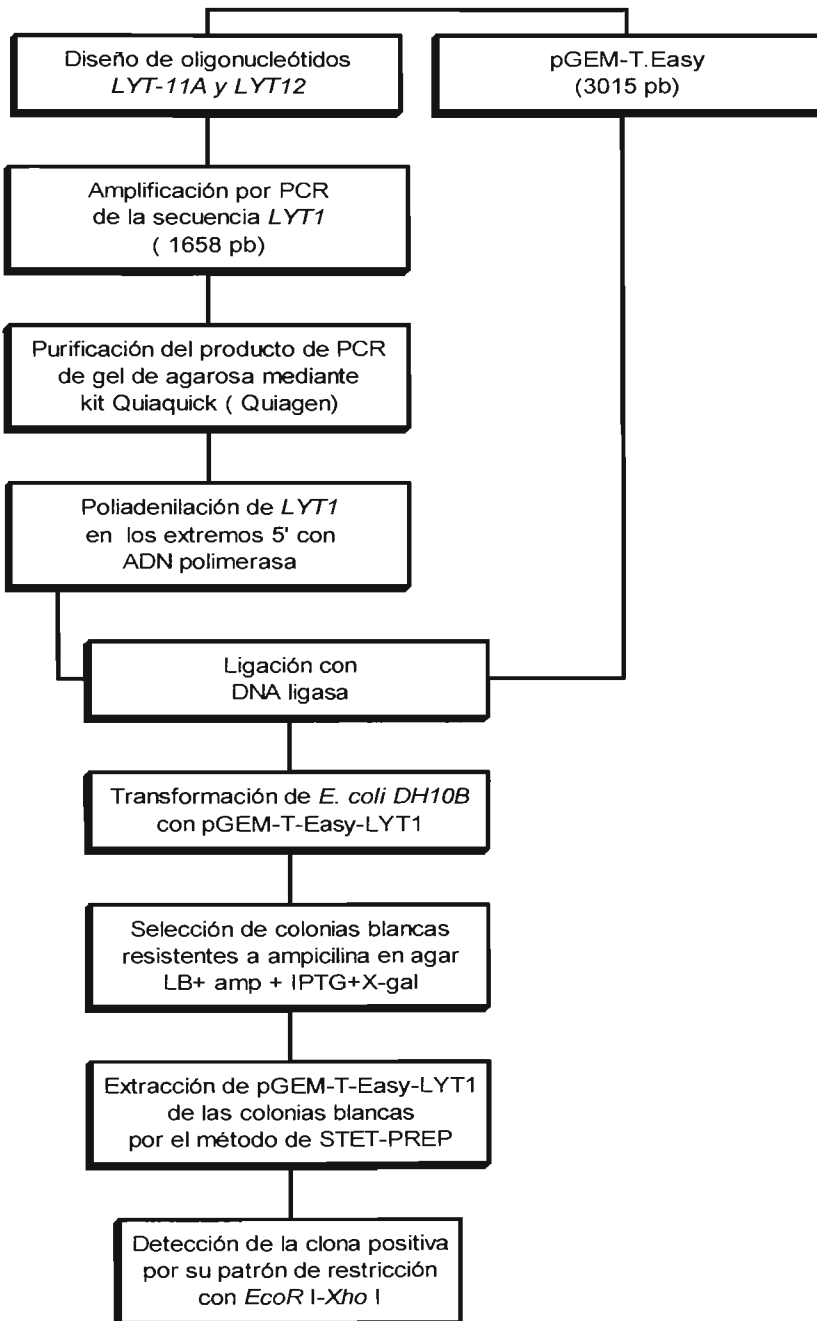
Plásmido pGEX 4T-1 (Amersham)

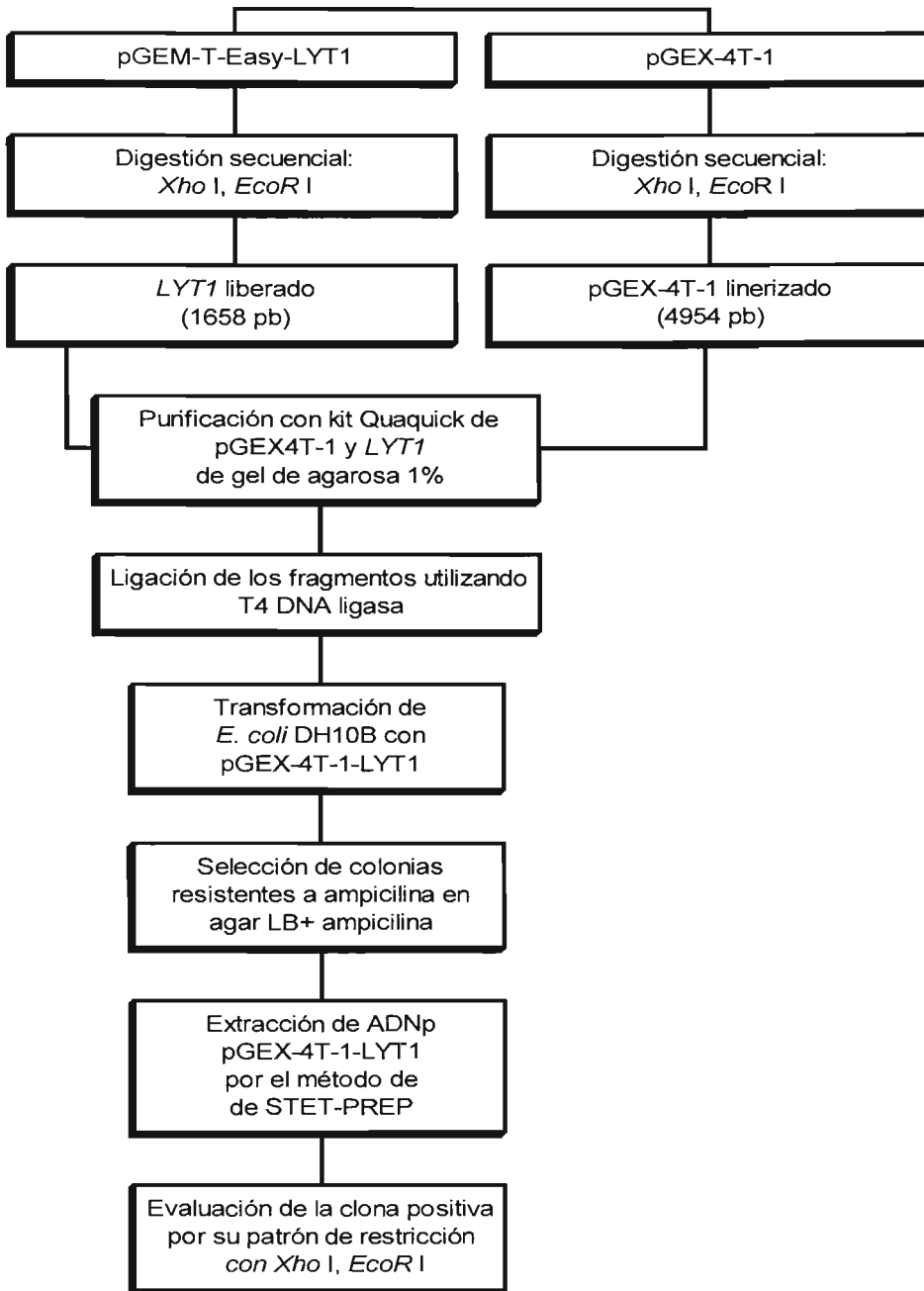
Primers: LYT11-A, LYT12, POR2

Inhibidor de proteasas “Complete” (Roche)

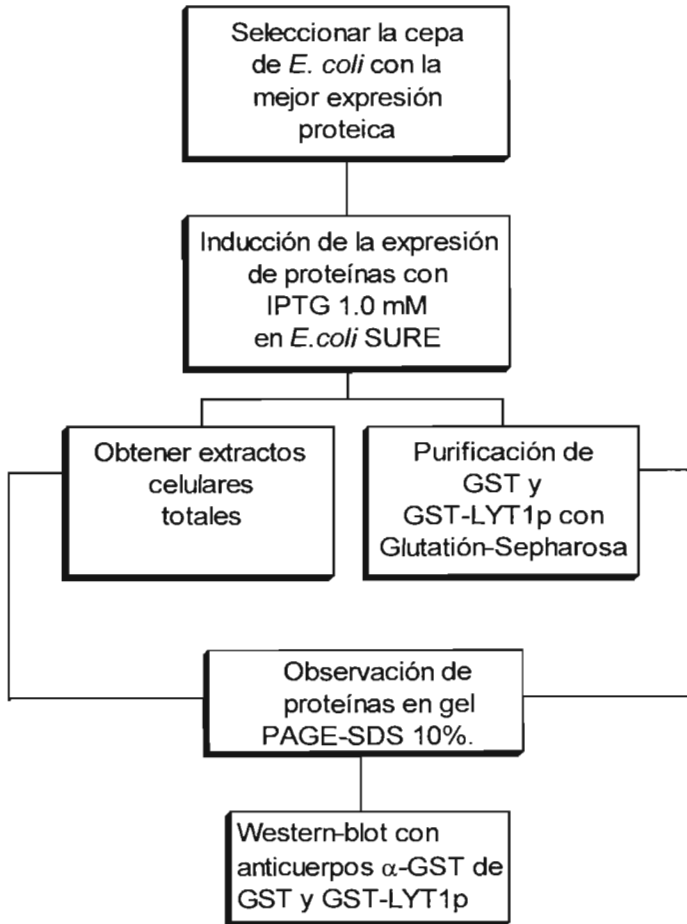
Quia quick kit (Quiagen)

## 4.2 Estrategia Experimental









## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Plásmido pGEM-T-Easy (Promega)

El vector pGEM-T-Easy está diseñado para facilitar la clonación de productos de PCR. Este vector contiene en los extremos 3' colas de politimidina que facilitan la clonación de fragmentos de PCR a los que se le añaden colas de poliadenina en el extremo 5' mejorando la eficiencia de la ligación del producto de PCR en el plásmido y evitando la recircularización del vector.

Este vector contiene un sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante para el péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, sitio donde será insertado *LYT1*, lo que producirá una inactivación de dicha enzima. Así, las colonias en las que sólo está el plásmido sin el inserto son azules ya que la  $\beta$ -galactosidasa transforma el sustrato X-gal en un producto de color azul, mientras que la clonación exitosa de un inserto en el pGEM-T-Easy interrumpe la secuencia que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa dando lugar a colonias blancas al no poder utilizar X-gal.

El vector pGEM-T-Easy posee sitios de reconocimiento para varias enzimas de restricción, que se encuentran flanqueando el sitio de clonación del inserto, por lo que éste puede ser liberado tras el tratamiento con *EcoR* I y *Xho* I. El objetivo de utilizar el vector pGEM-T-Easy es como ya se mencionó, facilitar la clonación de nuestro inserto *LYT1*, para posteriormente, retirarlo de este vector y clonarlo de nuevo en nuestro vector de interés, el pGEX-4T-1 (Promega, 2003).

### 4.3.2 Plásmido pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences)

Es un sistema diseñado para la expresión, purificación y detección de proteínas de fusión producidas en *Escherichia coli*. La expresión en *E. coli* produce una proteína de fusión con la GST (glutación-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*, que es una proteína de 26 kDa con actividad enzimática) en la parte amino terminal y la proteína de interés (en este caso LYT-1p de 61.4 kDa) en el carboxilo terminal, acumulándose esta proteína de fusión en el citoplasma de la bacteria. Las proteínas de fusión GST se construyen insertando un gen (*LYT-1*) en el sitio de clonación múltiple de los vectores pGEX. La expresión se controla con el promotor *tac*, que se induce con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) que es un análogo de la lactosa. Una vez expresadas, las proteínas de fusión GST se purificaron del lisado bacteriano utilizando glutatión inmovilizado en perlas de Glutatión-Sepharosa 4B (GS-4B), que capturan la proteína de fusión mientras que los demás componentes son removidos. Después, las proteínas de fusión fueron eluidas de la matriz utilizando el buffer de elución que contiene glutatión reducido. De requerirse, la proteína de interés puede separarse de GST utilizando trombina, cuyo sitio de corte específico se localiza entre las dos proteínas (Amersham, 2002). Los mapas de ambos plásmidos se incluyen en el Apéndice III.

### 4.3.3 Electroforesis en geles de agarosa

Consiste en el desplazamiento de los ácidos nucleicos en una matriz porosa (de agarosa) al imponer un campo eléctrico. Los factores que afectan la migración del ADN son: el voltaje aplicado, el buffer de corrimiento, la conformación del ácido nucleico y el tamaño del poro de la matriz. A igualdad de todos estos parámetros, el tamaño de la molécula de ADN definirá su mayor o menor migración durante la electroforesis. Las moléculas de ADN poseen a pH alcalino, una carga negativa uniforme lo que hace que se movilizan hacia el

ánodo (Sambrook *et al*, 2001). Para este trabajo, todos los geles de agarosa fueron utilizados a una concentración de 1.0 %, lo que da un rango efectivo de resolución de 10 - 0.5 kb. Una vez separadas, las moléculas de ADN se visualizaron con bromuro de etidio, que se intercala entre las bases de ADN y, al iluminarse con UV, da un color naranja detectable fotográficamente.

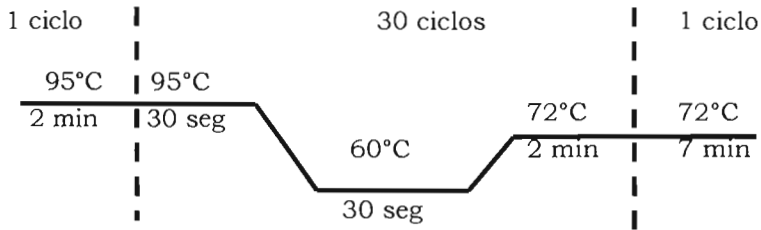
#### 4.3.4 PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN. Las cadenas individuales del ADN blanco son duplicadas por la Taq ADN polimerasa en cada uno de los ciclos de la reacción, lográndose una producción exponencial de millones de copias del ADN blanco. Los componentes requeridos para una PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el segmento que sirve como blanco, mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's), buffer de reacción y Taq ADN polimerasa. La reacción consta de tres pasos:

- 1) Desnaturalización (92-98°C, 30-90 segundos) en el cual se desnaturalizan las dos cadenas complementarias de ADN blanco; 2) Alineamiento (50-60°C, 30-60 segundos), en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado; 3) Extensión (70-74 °C, 30-90 segundos), en el que la Taq ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas originales (Barrera-Saldaña *et al*, 1993).

La secuencia completa de *LYT1* puede consultarse en el GenBank ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)) con los códigos AF263616 y AF320626 para los alelos *LYT1a* y *LYT1b* respectivamente, cuyo marco de lectura abierto es de 1658 pb

que codifica para una proteína de 552 aminoácidos con un peso molecular de 61,400 Da (Manning-Cela *et al*, 2001). Esta secuencia fue amplificada utilizando los oligonucleótidos LYT11A y LYT12 (tabla 2) y las condiciones de reacción fueron:



Por otra parte, la presencia de *LYT1* en el vector pGEX-4T-1 se verificó utilizando los oligonucleótidos LYT11A y POR2 (tabla 2) para amplificar un fragmento de 258 pb de *LYT1* con las siguientes condiciones:

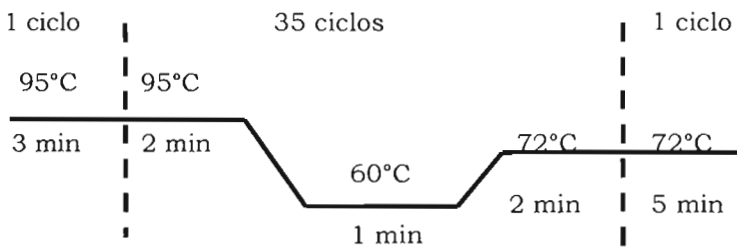


Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>
<b>LYT-12</b>	Xho I
Antisentido, 28 nucleótidos	5' GCC <u>CTC GAG</u> <b>TCA ATC AGC TGC CAG CAT</b> G 3' Secuencia del nc 1935 al nc 1917 de <i>LYT1</i>
<b>LYT-11A</b>	EcoR I
Sentido, 29 nucleótidos	5' GCG <u>GAA TTC</u> <b>ATG CGG AAG AAA GCC GCA GC</b> 3' Secuencia del nc 276 al nc 296 de <i>LYT1</i>
<b>POR 2</b>	
Sentido, 20 nucleótidos	5' <b>CGT GCG ACT GAG ATG TCA CC</b> 3' Secuencia del nc 238 al nc 258de <i>LYT1</i>

#### 4.3.5 Métodos de purificación del ADN de plásmido

- Lisis Alcalina

Se basa en la lisis de bacteria bajo condiciones en las que el pH básico lisa la pared celular, el SDS desnatura las proteínas y el NaOH desnatura el ADN cromosómico mientras que el ADN de plásmido (ADN<sub>p</sub>) se libera al sobrenadante. A continuación se equilibra con acetato de potasio, de manera que el ADN<sub>p</sub> re-naturaliza mientras que el ADN cromosómico junto con la mayoría de las proteínas bacterianas forman complejos con el SDS y precipitan con los iones potasio. El precipitado se elimina por centrifugación y el ADN<sub>p</sub> que queda en el sobrenadante se extrae con disolventes orgánicos y se concentra por precipitación con alcohol (Sambrook *et al*, 2001). Para consultar la metodología de todas las técnicas utilizadas véase el Apéndice I.

- Método de STET-PREP

Se basa en la triple acción, del calor, de la lisozima (que degrada la pared bacteriana y proteínas) y el detergente Tritón X100, los cuales producen roturas en la debilitada pared bacteriana de manera que escapan ARN y ADN de bajo peso molecular pero no moléculas grandes como el ADN cromosómico y proteínas que quedan atrapados dentro de la pared bacteriana y son fácilmente eliminados tras una centrifugación breve, mientras que el plásmido puede recuperarse por precipitación con alcohol y centrifugación (Sambrook *et al*, 2001).

- Extracción de ADNp con disolventes orgánicos

Se realizó utilizando una mezcla de disolventes orgánicos (fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1). Las proteínas se desnaturalizan por el cloroformo y el fenol y se sitúan en la interfase, en la fase acuosa superior quedan disueltos ADN y ARN y en la fase orgánica quedan los lípidos de membrana. El alcohol isoamílico favorece la separación nítida de las fases (Sambrook *et al*, 2001).

#### 4.3.6 Reacción de Ligación

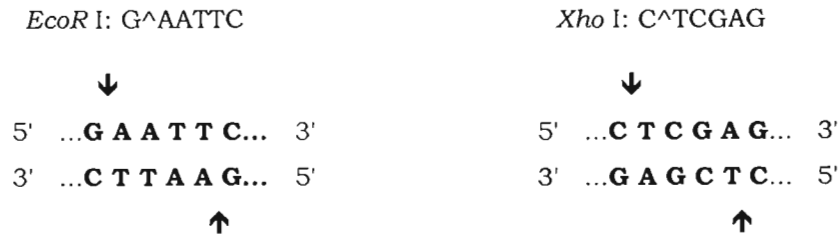
Es la unión de dos fragmentos de ADN (uno del inserto y otro del plásmido) para formar una nueva molécula recombinante, reacción que lleva a cabo la T4-ADN-ligasa. Esta enzima crea enlaces entre los ADN en los extremos 5'-fosfato y 3'-OH en una reacción dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$ , formando un puente fosfodiéster que une covalentemente las cadenas de ADN. Se requiere que los extremos del ADN sean compatibles, romos con romos o cohesivos con cohesivos, como lo fueron en este caso. Tanto *LYT-1* como pGEX-4T-1 se trataron con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Xho* I para favorecer la

asociación de los extremos complementarios *EcoR* I y *Xho* I vector-inserto, lo cual se conoce como clonación dirigida (Sambrook *et al*, 2001).

### 4.3.7 Digestión con enzimas de restricción

Es la escisión del ADN en fragmentos más pequeños con enzimas de restricción que cortan los enlaces fosfodiéster del ADN de doble cadena en sitios específicos dentro de una secuencia de reconocimiento o en un sitio adyacente a ésta. Estos cortes producen un extremo 5'-fosfato y otro 3'-OH dejando como resultado extremos romos (si se corta el ADN exactamente en el eje de simetría de su secuencia de reconocimiento), o bien, “pegajosos” o cohesivos (si se cortan las cadenas en lugares similares según el eje de simetría) (Perera *et al*, 2002; Sambrook *et al*, 2001).

En el presente trabajo, las enzimas de restricción utilizadas fueron *EcoR* I y *Xho* I, las cuales pertenecen al tipo II y producen extremos cohesivos, sus secuencias de reconocimiento son:



Los componentes de éstas y otras reacciones enzimáticas pueden consultarse en el Apéndice II.



### 4.3.8 Transformación

Es la transferencia de una molécula de ADN al interior de una célula bacteriana receptora. Este proceso introduce el ADN recombinante (de la unión *in vitro* del ADN vector-inserto) en las células bacterianas para llevar a cabo su replicación o clonación y obtener así un gran número de células portadoras de la misma molécula recombinante. En este proceso se utilizan células competentes, es decir, que han sido tratadas previamente con  $\text{Ca}^{2+}$  para aumentar la permeabilidad de sus membranas al ADN y volverlas capaces de captar el ADN extraño y ser transformadas. Dicho tratamiento y la elevación momentánea de la temperatura del cultivo durante el proceso parecen ser la causa de que la célula permita el paso de la molécula de ADN a su interior (Perera *et al*, 2002; Prescott *et al*, 1999).

En este trabajo se utilizaron tres cepas diferentes de *E. coli* calcio-competentes: a) DH10B, cepa deficiente en eventos de recombinación y sistemas de restricción, diseñada para obtener altas cantidades de ADNp y construcción de bibliotecas genómicas (Invitrogene), b) cepa SURE, que carece de sistemas que catalizen el rearrreglo y delección en ADN eucariota, así mismo es deficiente en endonucleasas, enzimas de restricción y eventos de recombinación. Es una cepa diseñada para mantener ADNp inestables y producirlos en grandes cantidades, además, son resistentes a la kanamicina y tetraciclina (Stratagene) y c) BL21, ideal para la expresión de proteínas recombinantes pues posee una delección en los genes *ompT* y *lon* que codifican para proteasas de membrana y de citoplasma, respectivamente. También es deficiente en enzimas de restricción, lo que evita la degradación de ADNp transformante (Amersham). Los genotipos de estas cepas pueden verse en la tabla 3.

Tabla 3: Genotipo de las cepas de *E. coli* utilizadas.

Cepa <i>E.coli</i>	Genotipo
<b>DH10B</b>	F' <i>mcrA</i> $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1 endA1 ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta(ara, leu)$ 7697 <i>galU galK</i> $\lambda$ - <i>rpsL (Str<sup>R</sup>) nupG</i>
<b>SURE</b>	<i>e14-(McrA-)</i> $\Delta(mcrCB\text{-}hsdSMR\text{-}mrr\text{-})$ 171 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC</i> <i>umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' proAB lacI<sup>q</sup> Z <math>\Delta</math> M15</i> <i>Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i> .
<b>BL21</b>	F <sup>-</sup> , <i>ompT, hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal, dcm</i>

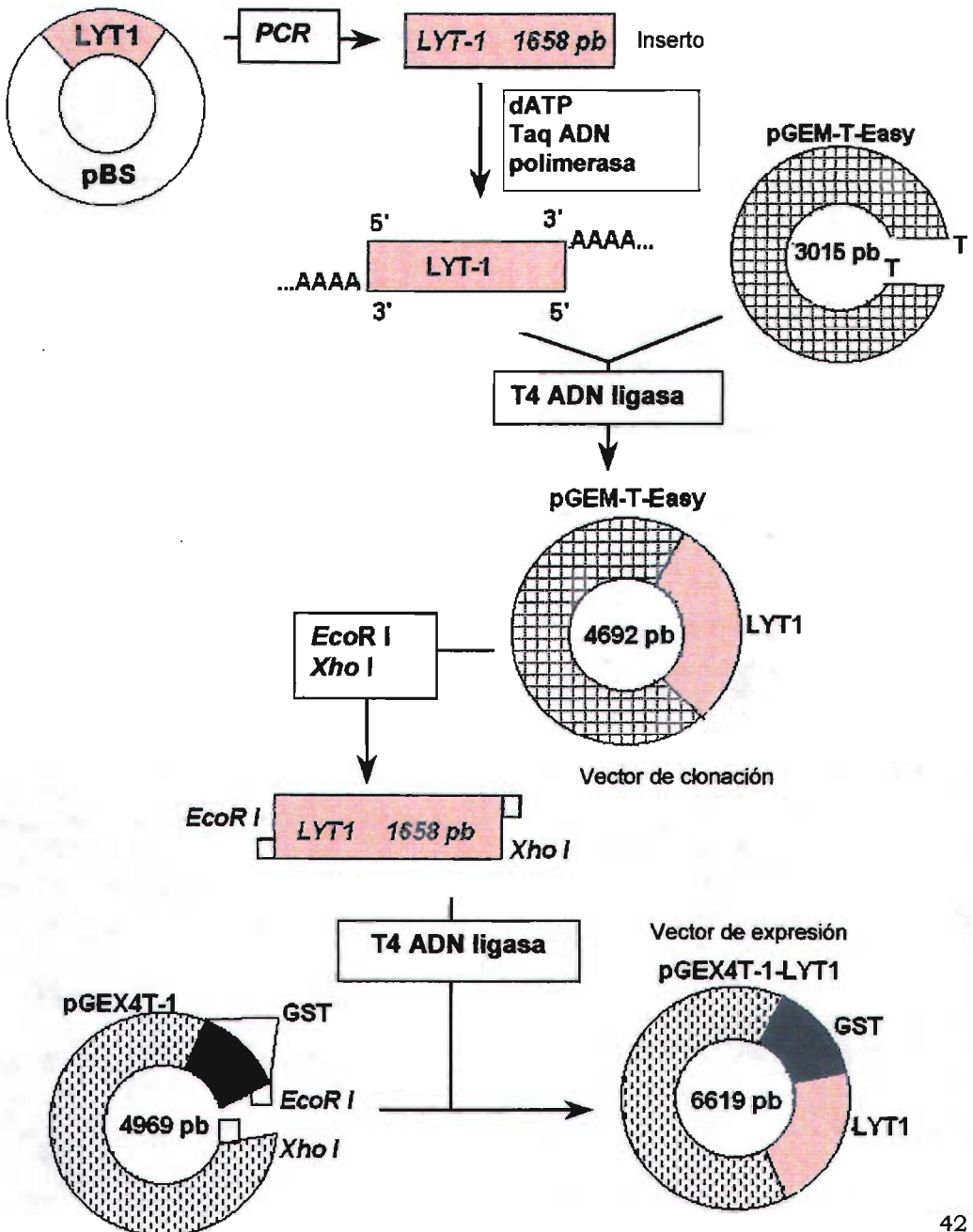
#### 4.3.9 Selección y detección de recombinantes

Los plásmidos ya mencionados otorgan resistencia a ampicilina, por lo que todas las células transformadas fueron resistentes a este antibiótico y seleccionadas en el cultivo haciéndolas crecer en presencia de dicho agente, obligando a las células no transformadas a morir.

Sin embargo, la producción del ADN recombinante (vector + inserto) puede generar además dos subproductos tales como plásmido recircularizado sin inserto y con inserto por lo que hay que distinguir entre ambos tipos de transformantes (Perera *et al*, 2002); para lo que se aisló el ADNp y se analizó su patrón de restricción en gel de agarosa 1% para confirmar las colonias positivas.

Los pasos experimentales seguidos para lograr la construcción de nuestro vector de interés pGEX-4T-1-LYT1, que nos permitiría llevar a cabo la expresión de la proteína de fusión GST-LYT1p, se muestran en el diagrama 4.3.10.

### 4.3.10 Diagrama de la construcción del vector pGEX-4T-1-LYT1



### 4.3.11 Electroforesis de proteínas PAGE-SDS

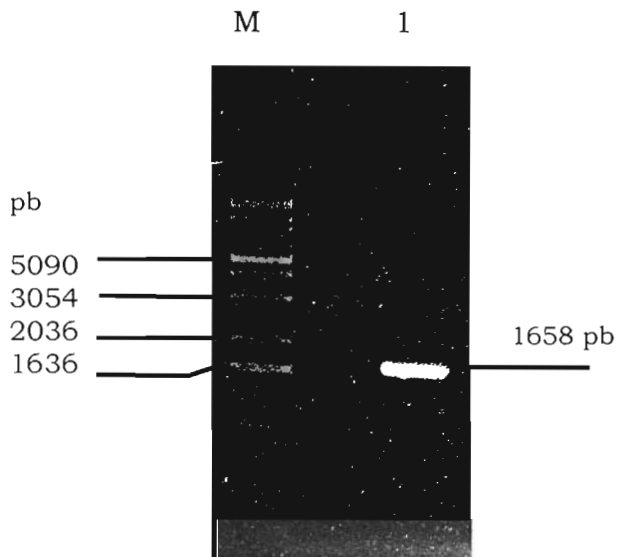
La matriz de gel de poliacrilamida se prepara por una polimerización iniciada por radicales libres generados por persulfato de amonio y TEMED; la acrilamida se polimeriza linealmente mientras que la bisacrilamida sirve como agente de unión para formar una matriz tridimensional. Las proteínas a analizar son hervidas a 100°C en presencia de SDS (desdobla la proteína en sus péptidos constitutivos y los carga negativamente) y  $\beta$ -mercaptoetanol (que rompe los puentes disulfuro). El desplazamiento de las proteínas a través del gel de poliacrilamida en un campo eléctrico, dependerá de su tamaño molecular (Sambrook, 2001; Wilson, 2000). En este trabajo se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% que fueron teñidos con Azul Brillante Coomassie.

### 4.3.12 Western Blot

Una vez que las proteínas se separaron por electroforesis en PAGE-SDS según su tamaño molecular; se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a unas membranas de nitrocelulosa. Las proteínas se detectaron inmunológicamente incubando la membrana, primero, con un anticuerpo primario específico contra la proteína de interés, en este caso, anti-GST. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y contra la especie en la que se ha producido el primero (anti-ratón en este caso). Este segundo anticuerpo se pega al primero y el conjugado enzimático permitirá visualizar todo el complejo *proteína- Ab primario - Ab secundario - enzima*; cuya localización se reveló al incubarlo con el reactivo comercial ECL (Amersham Biosciences), el cual contiene luminol que al ser oxidado por la peroxidasa produce una señal de color visible que puede detectarse sobre una película radiográfica. La presencia de bandas coloreadas nos indicó la posición de la proteína de interés (Amersham, 2002; Sambrook, 2001; Wilson, 2000).

## 5. Resultados Experimentales

**5.1** Amplificación por PCR de la secuencia que codifica para LYT1p usando como templado pBS+LYT1b (4.3 kb) y los oligonucleótidos LYT-11-A y LYT-12. Como se muestra en la figura 10 se obtuvo el producto de PCR esperado de 1658 pb. Este producto de PCR se utilizó posteriormente para su clonación en el vector pGEM-T-Easy.



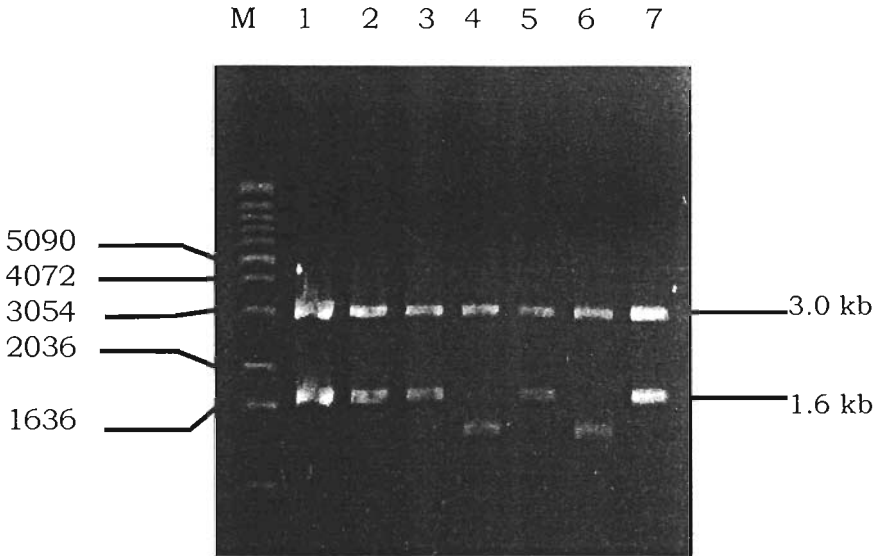
**FIGURA 10.** Amplificación por PCR de la secuencia que codifica para LYT1p. M, marcador de peso molecular de 1 kb (Gibco); 1, producto de amplificación de PCR de *LYT-1* (1658 pb).

**5.2** El producto de PCR anterior se ligó al vector comercial pGEM-T-Easy como se describe en Materiales y métodos. Una vez realizada la ligación pGEM-T-Easy-LYT1, ésta se utilizó para transformar células calcio competentes *E. coli* DH10B, obteniéndose colonias blancas (que contienen el inserto) y azules (que poseen sólo el vector) al ser seleccionadas en agar LB + amp+ IPTG + X-gal. Los resultados se muestran en la tabla 4 en donde se observa que el 5% de las colonias resistentes a ampicilina fueron blancas y por lo tanto conteniendo el inserto.

**TABLA 4.** Número de colonias obtenidas de la ligación pGEM-T-Easy-LYT1

<b>Colonias</b>	<b>No.colonias</b>	<b>%</b>
<b>Azules</b>	480	95.0%
<b>Blancas</b>	24	5.0 %
<b>Total</b>	504	100 %

**5.3** Para verificar si las colonias resistentes a ampicilina blancas obtenidas anteriormente efectivamente contenían el inserto de interés, se analizó su patrón de restricción. Para ello se realizó la extracción de ADNp por el método de STET de las colonias seleccionadas y su digestión con *Xho* I y *EcoR* I para liberar la secuencia de *LYT1*. En la figura 11 se muestra el resultado en donde se aprecian dos bandas: una de 3015 pb correspondiente al vector pGEM-T-Easy y la otra de 1658 pb correspondiente a *LYT1*. Se analizaron 16 colonias blancas, de las cuales sólo 5 fueron positivas, correspondiendo esto a una eficiencia de clonación del 31% (tabla 5). Dos de las colonias liberaron una banda de un tamaño no esperado de aproximadamente 1400 pb (figura 11 carriles 4 y 6) posiblemente como resultado de una recombinación.

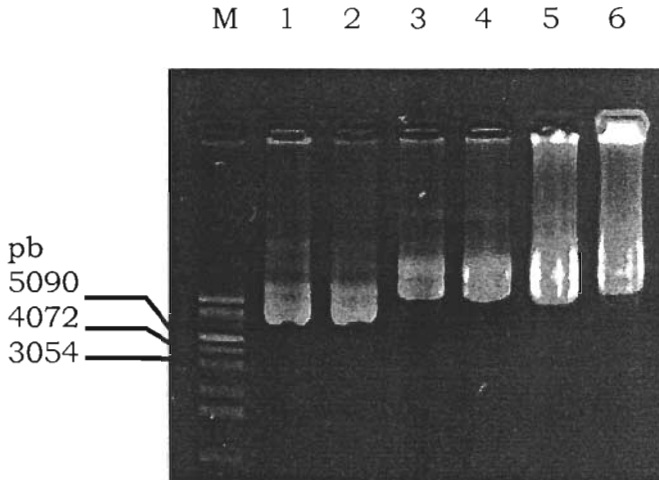


**FIGURA 11.** Extracción de ADNp de las colonias blancas resistentes a ampicilina y su digestión con *Xho* I y *EcoR* I. Como se puede observar todas son positivas a excepción de las clonas 13 y 16 (pozos 4 y 6 respectivamente), que exhiben un patrón de restricción diferente al esperado. M, marcador de 1 kb (Biolabs); 1, clona 3; 2, clona 4; 3, clona 5; 4, clona 13; 5, clona 14; 6, clona 16; 7, clona 17.

**TABLA 5.** Número de colonias blancas obtenidas de la misma ligación.

Colonias blancas	No. colonias	%	% colonias analizadas
<b>Totales</b>	24	100%	--
<b>Analizadas</b>	16	67 %	100 %
<b>Positivas</b>	5	21 %	31 %

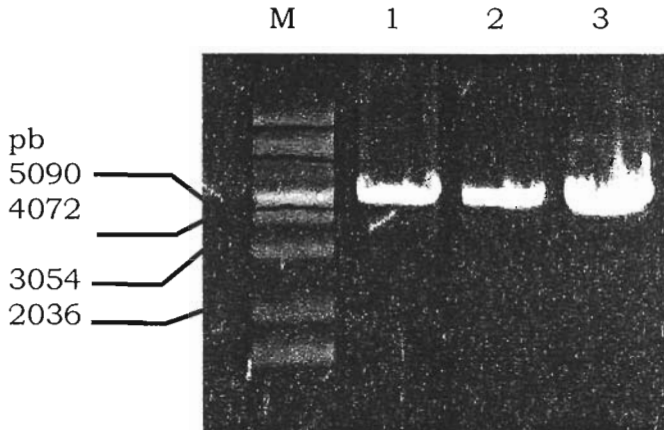
**5.4** Una vez que se obtuvo la clonación exitosa de la secuencia que codifica a LYT1p (pGEM-T-Easy-LYT1) se realizó su subclonación al vector de expresión pGEX-4T-1 con la finalidad de obtener el péptido de fusión GST-LYT1p. Para ello, primero se realizó la extracción de ADNp por lisis alcalina de los plásmidos pGEX-4T-1, pGEX-4T-2 y pGEM-T-Easy-LYT1 (figura 12). Como se puede ver por análisis en gel de agarosa el ADNp se extrajo exitosamente observándose el peso molecular y patrón de corrimiento esperados.



**FIGURA 12.** Lisis alcalina de pGEX-4T-1, pGEX-4T-2 y pGEM-T-Easy-LYT1. M, marcador 1 kb (Biolabs); 1 y 2, pGEX4T-1; 3 y 4, pGEX-4T-2; 5 y 6, pGEM-T-Easy-LYT1 clona 5.

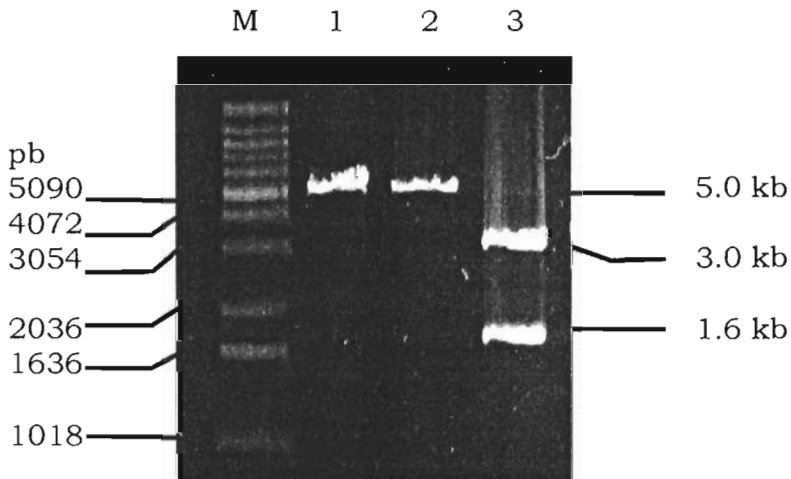
**5.5** Para preparar el vector e inserto para la construcción de pGEX-4T-1-LYT1 primero se realizó la digestión de los plásmidos pGEX-4T-1 y pGEM-T-Easy-LYT1 con la enzima *Xho* I (figura 13). Como puede verse en los resultados el vector pGEX-4T-1 (4969 pb) se linealizó ya que sólo contiene un sitio de reconocimiento para la enzima. En el caso de pGEM-T-Easy-LYT1 también se obtuvo una sola banda de 4692 pb como se esperaba ya que el sitio para *Xho* I se encuentra en una de las secuencias flanqueantes de *LYT1*, confirmando que pGEM-T-Easy-LYT1 efectivamente contiene *LYT1* ya que el esqueleto del vector no posee dicho sitio.





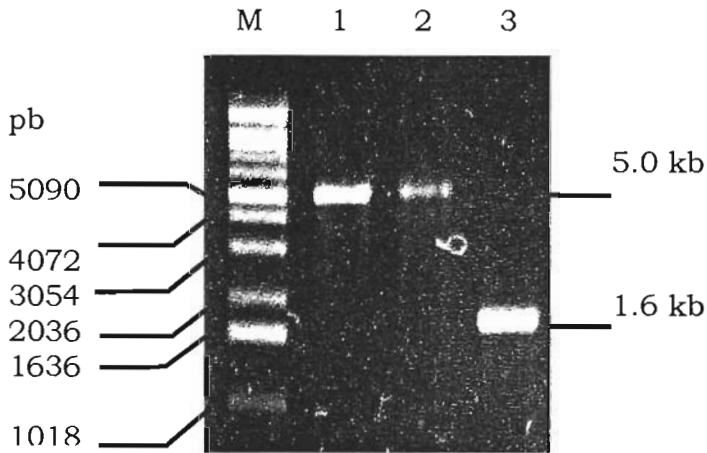
**FIGURA 13.** Reacción de digestión con la enzima *Xho* I de pGEX-4T-1 y pGEM-T-Easy-LYT1. M, marcador 1 kb (Biolabs); 1, pGEX-4T-1; 2, pGEX-4T-2; 3, pGEM-T-Easy-LYT1.

**5.6** Posteriormente las digestiones anteriores se sometieron a una segunda reacción de digestión con la enzima *Eco*R I (figura 14). Los vectores pGEX se observan como una banda de aproximadamente 5.0 kb ya que los sitios *Eco*R I y *Xho* I se encuentran muy cercanos (carriles 1 y 2). En el caso de pGEM-T-Easy-LYT1 se observan 2 bandas: una de 3.0 kb correspondiente al vector pGEM-T-Easy, y otra de 1.6 kb correspondiente a *LYT1* (carril 3).



**FIGURA 14.** Reacción de digestión con la enzima *Eco*R I. M, Marcador 1 kb (Biolabs); 1, pGEX-4T-1; 2, pGEX-4T-2; 3, pGEM-T-Easy-LYT1.

**5.7** Los ADN de interés anteriores correspondientes al vector linearizado (pGEX4T-1 y pGEX-4T-2) y al inserto (*LYT1*) se purificaron con el kit Quia quick de Quiagen con el fin de eliminar contaminantes de reacciones anteriores y prepararlos para la siguiente ligación. Como se observa en la figura 15, en el caso de los vectores pGEX puede observarse una banda de 5.0 kb como se esperaba (carriles 1 y 2); mientras que *LYT1* se observa como una banda de 1658 pb (carril 3) ya totalmente separada del vector pGEM-T-Easy.



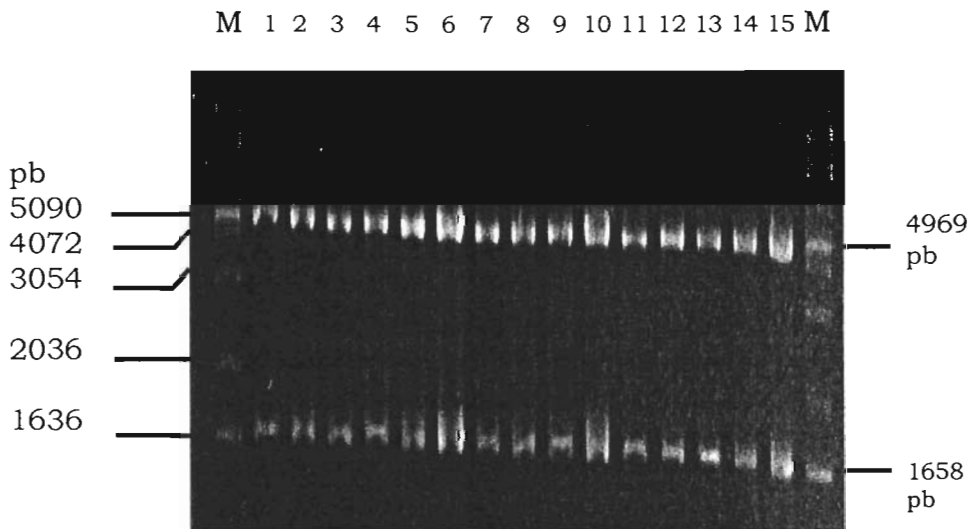
**FIGURA 15.** Purificación de los ADN de la figura anterior con el kit Quia quick de Quiagen. M, marcador 1 kb; 1, pGEX-4T-1 (4969 pb); 2, pGEX-4T-2 (4966 pb); 3, *LYT-1* (1658 pb).

**5.8** Una vez que se obtuvieron el vector e inserto digeridos y purificados se realizó la ligación como se describió en Materiales y métodos. Posteriormente, la ligación pGEX-4T-1-*LYT1* se utilizó para transformar células calcio competentes *E. coli* DH10B sembradas después en agar LB + ampicilina. Como se muestra en la tabla 6 se obtuvo una eficiencia de clonación del 100% ya que de las 20 colonias analizadas resistentes al antibiótico, las 20 contenían el inserto como se muestra en el siguiente inciso (figura 16-A y 16-B).

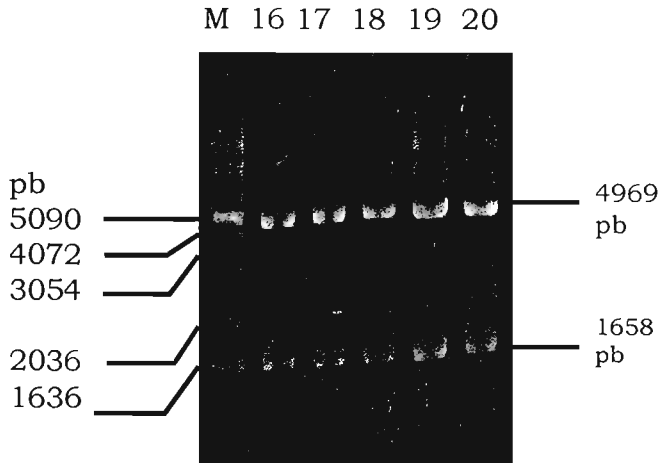
**Tabla 6.** Eficiencia de la transformación con la ligación pGEX-4T-1-LYT1

Colonias	No. colonias	%	% de colonias positivas
<b>Colonias seleccionadas</b>	20	1.84%	100%
<b>Colonias positivas</b>	20	1.84%	100%
<b>Colonias totales</b>	1085	100%	----

**5.9** Se realizó una doble digestión con las enzimas *Xho* I y *Eco*R I del ADNp de 20 colonias resistentes a ampicilina, extraído por el método de STET-PREP para identificar las clonas positivas (conteniendo pGEX-4T-1-LYT1). Tras esta reacción se obtuvieron 2 bandas: una de ~5.0 kb correspondiente a pGEX-4T-1 y otra de 1.6 kb correspondiente a *LYT1*, tal como se muestra en las figuras 16-A (clonas 1-15) y 16-B (clonas 16-20), indicando que se obtuvo exitosamente la construcción deseada de pGEX-4T-1-LYT1.

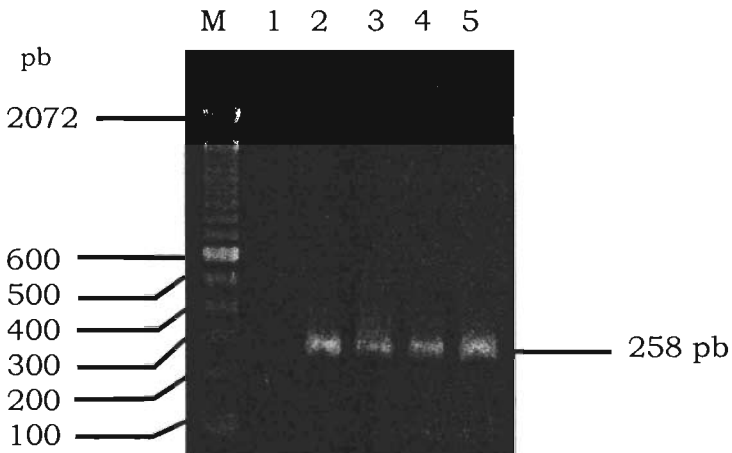


**FIGURA 16-A.** Doble digestión con las enzimas *Eco*R I y *Xho* I de las colonias positivas obtenido por STET-PREP. M, marcador 1 kb; 1-15, ADNp de pGEX-4T-1-LYT1 de las clonas 1-15.



**FIGURA 16-B.** Doble digestión con las enzimas *Xho* I y *Eco*R I del ADNp de las colonias positivas obtenido por STET-PREP. M, marcador 1 kb; 16-20, ADNp de pGEX4T-1-LYT1 de las clonas 16-20.

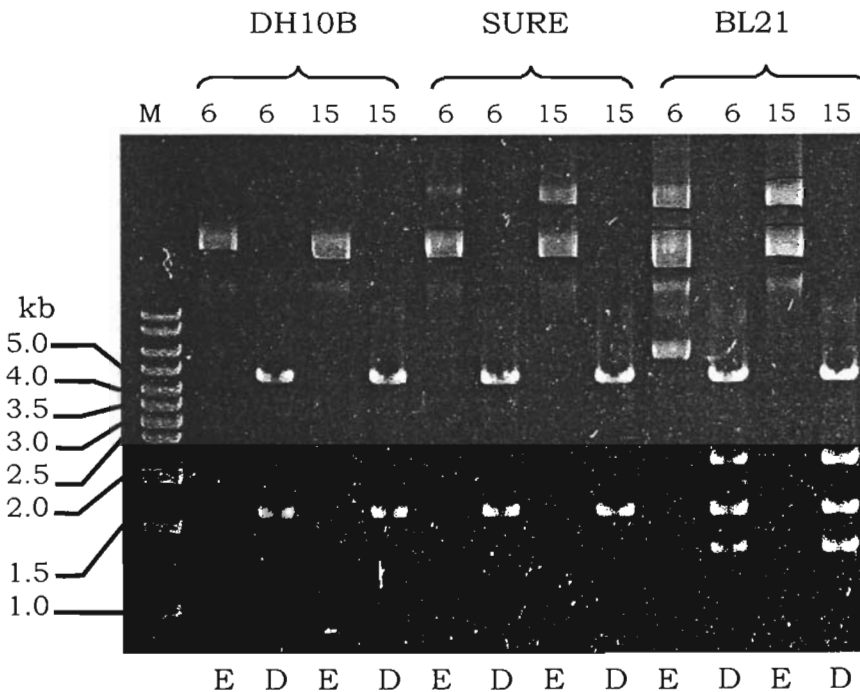
**5.10** De manera simultánea, las muestras de ADN de las colonias positivas se analizaron por PCR amplificando un segmento de 258 pb de *LYT1* utilizando los oligonucleótidos LYT11A y POR2, confirmándose así la presencia de *LYT1* en el vector. En la figura 17 se muestra el ADN amplificado de 3 de las colonias positivas con la construcción pGEX-4T-1-LYT1 (no. 6, 10 y 15).



**FIGURA 17.** ADN de las colonias positivas pGEX4T-1-LYT1 no. 6, 10 y 15, en las que se amplificó un segmento de 258 pb por PCR. M, marcador 100 pb; 1, pGEX-4T-1; 2, pGEM-T-Easy-LYT1 clona 5; 3, pGEX-4T-1-LYT1 clona 6; 4, pGEX-4T-1-LYT1 clona 10; 5, pGEX-4T-1-LYT1 clona 15.

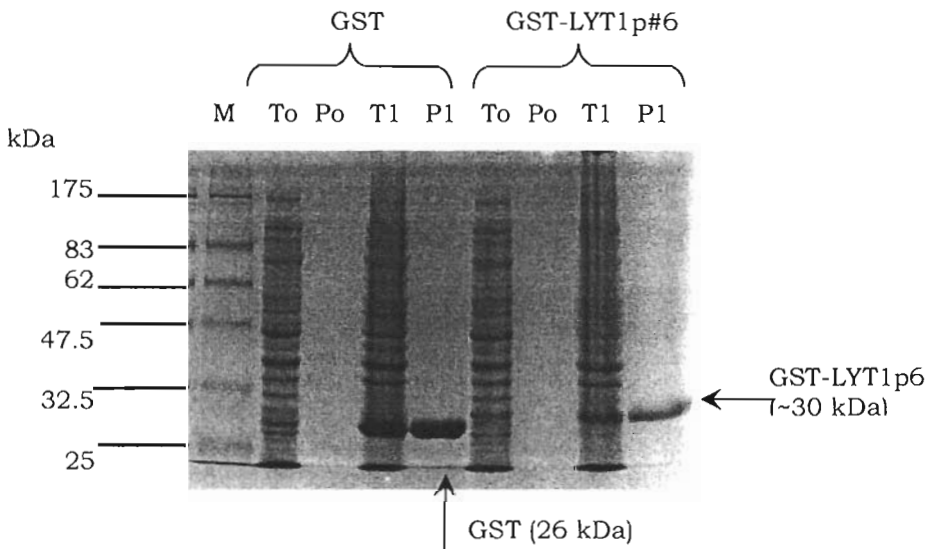
**5.11** Para seleccionar la cepa de *E. coli* más conveniente para la expresión de la proteína de fusión GST-LYT1p se transformaron 3 cepas diferentes con las construcciones pGEX-4T-1-LYT1 no. 6 y no. 10: *E. coli* DH10B, SURE y BL21.

Tras la extracción del ADNp por medio de lisis alcalina y su digestión con *EcoRI* y *XhoI* (figura 18) se pudo observar que el ADNp extraído de las cepas DH10B y SURE presentan el patrón característico observado anteriormente (2 bandas, una de 5.0 kb y otra de 1.6 kb); sin embargo no ocurre así con el ADNp extraído de la cepa BL21, en el que se observa un patrón de restricción diferente, lo que nos sugiere que se llevaron a cabo eventos de recombinación.

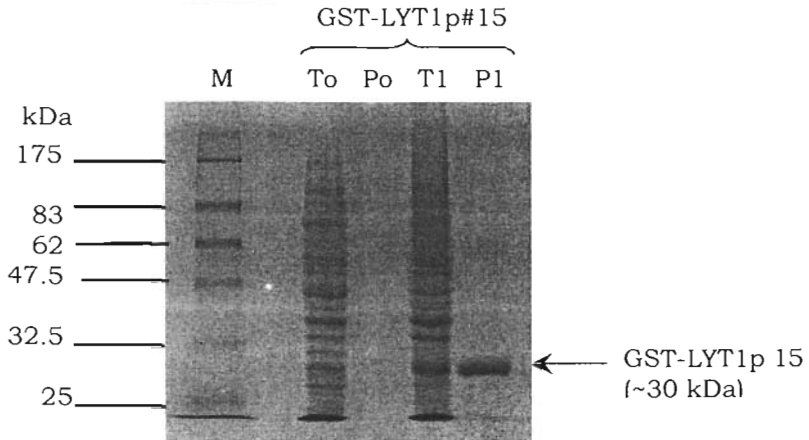


**FIGURA 18.** Extracción de ADNp por medio de lisis alcalina y su digestión con *EcoRI* y *XhoI* de 2 colonias bacterianas: pGEX-4T-1-LYT1 no. 6 y 10 introducidos cada uno en 3 cepas diferentes de *E. coli*: DH10B, SURE y BL21. M, marcador de peso molecular; E, ADNp extraído sin digerir; D, ADNp digerido; 6, pGEX4T1-LYT1 clona 6; 15, pGEX4T1-LYT1 clona 15.

**5.12** Para realizar el análisis de expresión de la proteína de fusión, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de proteínas, se puede apreciar la proteína GST con un peso molecular esperado de 26 kDa (figura 19-A); mientras que las proteínas GST-LYT1p no. 6 (figura 19-A) y no. 15 (figura 19-B) aparecen como proteínas menores (~30 kDa) al peso molecular esperado de 87 kDa; sin embargo, son de mayor tamaño que GST sola (26 kDa), como se muestran tanto en los extractos totales de proteínas de la bacteria, como las proteínas purificadas mediante las perlas de Glutación-Sepharosa 4B (GS-4B).

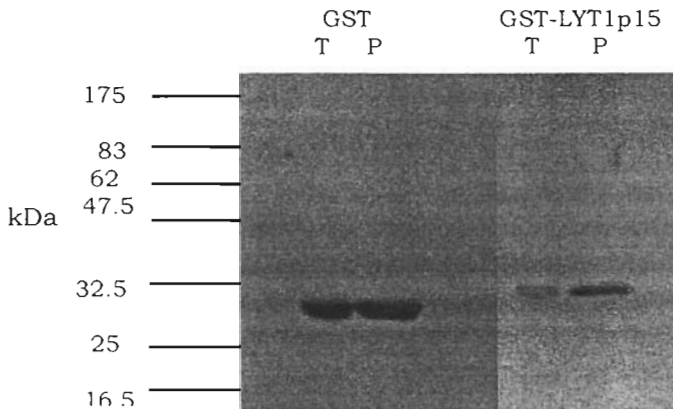


**FIGURA 19-A.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas GST y GST-LYT1p6. M, marcador de peso molecular (Biolabs); To, extracto celular total antes la inducción con IPTG; Po, purificación de proteínas con GS-4B antes de la inducción; T1, extracto celular total después de la inducción con IPTG; P1, purificación de proteínas con GS-4B después de la inducción.



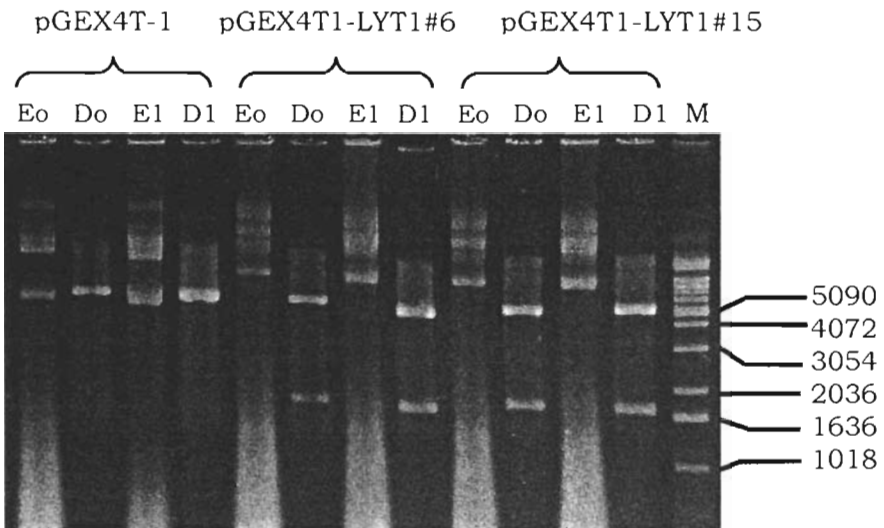
**FIGURA 19-B.** Electroforesis en poliacrilamida de la proteína GST-LYT1p15. M, marcador de peso molecular (Biolabs); To, extracto celular total antes la inducción con IPTG; Po, purificación de proteínas con GS-4B antes de la inducción; T1, extracto celular total después de la inducción con IPTG; P1, purificación de proteínas con GS-4B después de la inducción.

**5.13** Para corroborar nuestro resultado anterior se realizó un análisis por Western-Blot con anticuerpos anti-GST de las proteínas GST y GST-LYT1p 15 (figura 20). Las bandas correspondientes a 26 kDa se identificaron como GST, mientras que las bandas de aproximadamente 30 kDa corresponden a la proteína de fusión.



**FIGURA 20.** Western-Blot de las proteínas GST y GST-LYT1p 15; indicándose la posición de los marcadores de peso molecular. T, extracto total celular; P, purificación de proteínas con GS-4B.

**5.14** Para evaluar si el resultado anterior es consecuencia de algún evento de recombinación como el observado previamente (figura 18), se analizó el patrón de restricción con *EcoR* I y *Xho* I de pGEX-4T-1 y pGEX-4T-1-LYT1 (figura 21), el cual nos indica que aparentemente no volvieron a presentarse eventos de recombinación ni antes ni después de la inducción con IPTG comprobando la estabilidad del inserto en la cepa *E. coli* SURE.



**FIGURA 21.** Extracción de pGEX4T-1-LYT1 de los cultivos bacterianos utilizados para la expresión de proteínas y su digestión con las enzimas antes utilizadas. M, marcador de peso molecular; Eo, ADNp extraído (antes de la inducción); Do, ADNp digerido (antes de la inducción); E1, ADNp extraído (después de la inducción); D1, ADNp digerido (después de la inducción).



## 6. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo fue el de insertar la secuencia *LYT1* en el plásmido pGEX-4T-1, lo cual nos permitiría expresar la proteína de fusión GST-LYT-1p. Con el fin de aumentar las probabilidades de éxito de la clonación de *LYT-1* en dicho vector se recurrió al vector para clonación de productos de PCR pGEM-T-Easy. El análisis de las colonias positivas al antibiótico y a la utilización de X-gal indicó una eficiencia de clonación del 31% (tabla 5). Posteriormente la subclonación del fragmento de *LYT1* a pGEX4T-1 dio una eficiencia del 100% (tabla 6).

Para confirmar que obtuvimos la construcción deseada, las clonas positivas de pGEM-T-Easy-LYT1 fueron analizadas por su patrón de digestión con la enzima *Xho* I, y la combinación *Xho* I y *Eco*R I. Ya que el vector pGEM-T-Easy no contiene sitios de restricción para *Xho* I únicamente aquellas colonias conteniendo el inserto (pGEM-T-Easy-LYT1) liberaron el fragmento de 1658 pb correspondientes a la secuencia de *LYT1* (figura 11). De igual manera la sub-clonación de la secuencia de *LYT1* a pGEX4T-1 se identificó por el patrón de restricción de las colonias (figura 16 A y B) y se corroboró por PCR amplificando un fragmento de 258 pb de la secuencia de *LYT1* utilizando como templado el ADNp de 3 clonas positivas escogidas al azar y los oligonucleótidos LYT11A y POR2 (figura 17).

La construcción anterior fue utilizada para expresar el péptido de fusión GST-LYT1p en células *E. coli* BL21. Esta cepa bacteriana es la de elección para la expresión de proteínas recombinantes ya que es capaz de minimizar eventos de degradación proteica. Sin embargo, nuestros resultados mostraron la expresión únicamente de GST. Al analizar la estabilidad de nuestro inserto en esta cepa bacteriana encontramos que el plásmido pGEX-4T-1-LYT1 recombinó. Este resultado no es sorprendente ya que en trabajos previos hemos encontrado que LYT1p parece tener un

efecto tóxico en la bacteria ya que no sólo afecta la curva de crecimiento sino también tiende a recombinar frecuentemente. Por lo anterior otro de nuestros objetivos fue el de determinar la cepa de *E. coli* más conveniente para la expresión de la proteína de fusión GST-LYT1p, así que se probaron 3 cepas: DH10B, SURE y BL21. *E. coli* BL21 no está diseñada para disminuir eventos de recombinación a diferencia de las otras dos cepas utilizadas. Nuestros resultados indicaron que *E. coli* BL21 fue la única cepa bacteriana en donde recombinó el plásmido pGEX-4T-1-LYT1 como se evidencia por su patrón de restricción con las enzimas *EcoR* I y *Xho* I (figura 18). Este resultado sugiere que posiblemente la recombinación de la secuencia de *LYT1* se deba a un intento de la bacteria por eliminar el daño que podría producirle el producto de su expresión (LYT1p).

En las figuras 19-A y 19-B se aprecian las proteínas GST, GST-LYT1p clona 6 y GST-LYT1p clona 15 antes y después de la inducción con IPTG en la cepa SURE. Tal y como se esperaba, podemos ver el enriquecimiento de las bandas de dichas proteínas tras la inducción de la expresión. En ningún caso observamos una banda especialmente enriquecida antes de agregar el IPTG, ni en los extractos totales de proteínas de la bacteria ni en las muestras purificadas con perlas Glutación-Sepharosa 4B (GS-4B). En el caso de GST, se aprecia una proteína de 26 kDa correspondiente al peso molecular reportado; sin embargo, en el caso de las proteínas de fusión GST-LYT1p obtuvimos una banda de aproximadamente 30 kDa que no corresponde al peso esperado de 87 kDa. Con el ensayo de Western-Blot de GST y GST-LYT1p de la clona 15 se verificó la identidad de las mismas y las observaciones ya realizadas en los geles PAGE-SDS: la banda de 26 kDa corresponde a GST, mientras que la banda de ~30 kDa corresponde a una proteína de fusión de menor tamaño al esperado (figura 20).

Para verificar que esto no fue resultado de un evento de recombinación del plásmido, como lo observado anteriormente en BL21,

evaluamos la estabilidad de nuestro inserto. Los resultados demostraron una estabilidad de nuestro inserto en las clonas analizadas de manera paralela a los experimentos de expresión (figura 21). Existen varias explicaciones posibles al resultado obtenido las cuales se describen y discuten a continuación:

(i) Que el marco de lectura de traducción de *LYT-1* no se encuentre en fase, lo que daría lugar a codones de paro en la parte inicial de la secuencia clonada de *LYT-1* y que causarían una terminación prematura del producto. Por supuesto es necesario secuenciar en un futuro cercano las construcciones pGEX4T-1-LYT1 para poder descartar o verificar esta posibilidad.

(ii) Que la proteína de fusión sufra un efecto proteolítico que se lleve a cabo por proteasas bacterianas (recordando que *E.coli* SURE no es deficiente en las mismas) que sirven como un mecanismo de protección contra proteínas ajenas a la célula sobre todo si la proteína de fusión es tóxica, ya sea por sí misma, o debido a su intercalación en las membranas bacterianas como ocurre en el caso de proteínas grandes como GST-LYT1p (Sambrook *et al*, 2001; Halbhuber *et al*, 2003). Existen algunos reportes (De Marco *et al*, 2004; Ménard *et al*, 2004) en los que también se obtienen proteínas de fusión truncadas y con el fin de detener esta degradación se recurre en conjunto a diferentes inhibidores de proteasas y cepas deficientes en las mismas, aunque por causas desconocidas, estas estrategias no fueron suficientes para detener los efectos proteolíticos.

(iii) Que al igual que otras proteínas de fusión, GST-LYT1p sufra un proceso de proteólisis espontánea, ya que por trabajos previos del laboratorio se sabe que LYT1p es una molécula altamente inestable y lábil.

Aunque existe gran discrepancia al respecto, algunos autores consideran que el sitio de reconocimiento para trombina que une a GST con LYT1p es un sitio sumamente frágil que puede romperse con gran

facilidad produciendo una proteína de fusión truncada (De Marco *et al*, 2004). Como se ha propuesto en algunos reportes (De Marco *et al*, 2004; Ménard *et al*, 2004), la alta sensibilidad a la degradación de las proteínas de fusión podría también deberse a la existencia de otros sitios altamente susceptibles de proteólisis dentro de la secuencia de las proteínas de interés fusionadas a GST, tal como LYT1p.

(iv) Otro de los problemas al expresar proteínas eucariotas en bacterias es la estabilidad de las mismas. Además, se sabe que en muchas ocasiones las proteínas de fusión > 100 residuos son generalmente tóxicas e inestables dentro de la bacteria y forman cuerpos de inclusión (agregados insolubles de la proteína de fusión) (Sambrook *et al*, 2001). Esta inestabilidad puede deberse entre otras causas: a) al plegamiento incorrecto del polipéptido en un ambiente intracelular más reducido, existiendo casos en los que sólo la parte correspondiente a GST se pliega no así la parte correspondiente a la proteína de interés, que es degradada al ser más accesible a las proteasas; b) a la ausencia de modificaciones postraduccionales dentro de la bacteria que modifican la polaridad de la proteína (Mercado-Pimentel *et al*, 2002; Ausubel, 1999), o c) a que LYT1p, como otras proteínas que interactúan con membranas (De Marco *et al*, 2004), necesita estas interacciones con otras proteínas o membranas para estabilizarse y que no encuentra en la célula procariota. Por otra parte, la unión inestable del ARNm de fusión a los ribosomas se ha considerado también como una causa de la obtención de proteínas truncadas (Ausubel, 1999).

Aún no existe un método infalible para incrementar la eficiencia de producción de proteínas de fusión en *E. coli* o bien, para mejorar el plegamiento de las mismas o prevenir su agregación, desnaturalización o degradación en un ambiente que no es el propio, por lo que existen numerosos obstáculos para una producción y purificación exitosas de la proteína de interés (Sambrook *et al*, 2001). Así mismo, existen varios

parámetros experimentales que deben ser determinados de forma empírica para cada proteína de fusión en particular, tales como: a) la temperatura de cultivo óptima, b) tiempo de inducción, c) densidad celular a la hora de la inducción, d) la cepa bacteriana más adecuada, e) cantidad de IPTG para la inducción, etc., los cuales influyen notablemente en la producción de la proteína de fusión (Saluta y Bell, 1998).

Como se discute anteriormente son varias las posibles causas para obtener una proteína de fusión truncada en un sistema bacteriano, sin embargo, es necesario primero verificar la secuencia de nuestras clonas para evaluar y descartar la posibilidad de un error en la construcción y así entonces poder abordar las otras posibles causas o estrategias alternas para la exitosa expresión de nuestra proteína de fusión y continuar con los experimentos posteriores que nos lleven a continuar con la caracterización de LYT1p.

Continuando con estas investigaciones sobre LYT1p, una de las perspectivas es la de identificar la localización de esta proteína dentro del parásito mediante anticuerpos  $\alpha$ -LYT1p, así como, identificar las moléculas que pudieran interactuar con ella formando complejos que posiblemente sean necesarios para realizar sus funciones en el proceso de infección y cambio de estadio del parásito. Para tal fin, el péptido truncado obtenido una vez separado de la proteína GST podría ser utilizado como antígeno para la producción de dichos anticuerpos. Por otra parte, para realizar los ensayos de coprecipitación de proteínas (*Pull-Down*) no sería posible utilizar el péptido truncado ya que para formar complejos proteicos generalmente se requiere de la proteína completa. En el caso de que esto no sea posible en un sistema de expresión en bacterias una estrategia alternativa sería realizar la transcripción y traducción *in vitro* de *LYT1* a partir de la construcción pGEM-T-Easy-LYT1.

## 7. CONCLUSIONES

- La clonación de la secuencia *LYT1* en el vector de expresión pGEX4T-1 se realizó de manera exitosa y con una alta eficiencia.
- Las cepas de *E. coli* DH10B y SURE fueron capaces de mantener la estabilidad del inserto *LYT1* y de llevar a cabo la expresión incompleta de la proteína de fusión GST-LYT1p a diferencia de la cepa BL21.
- Se logró la producción de una proteína de fusión GST-LYT1p incompleta, que presenta el peso molecular de 30 kDa a diferencia de el peso molecular esperado de 87kDa.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Amersham Biosciences. 2002. *ECL Western Blotting. Detection Reagents and Analysis System*
- Amersham Biosciences. 2002. *Gene Fusion System Handbook*.
- Andrews, N.; Abrams, C.; Slatin, S. y Griffiths, G. 1990. A *T. cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence of membrane pore forming activity at low pH. *Cell* **61**: 1277-1287.
- Ausubel, F. 1999. *Short protocols in Molecular Biology*. 4ª edición. John Wiley and Sons, Inc., USA.
- Barrera-Saldaña, H.; Ortiz, R.; Rojas, A. y Reséndez, D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo* **19**: 50-60.
- Botero, D. 1992. *Parasitosis Humanas*. 2ª edición. Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia.
- Burleigh, B. y Andrews, N. 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Reviews of Microbiology* **49**: 175-200.
- Burleigh, B. y Woolsey, A. 2002. Cell signalling and *T. cruzi* invasion. *Cellular Microbiology* **4** (11): 701-711.
- Caler, E.; Vaena, S.; Haynes, P.; Andrews, N. y Burleigh, B. 1998. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *The EMBO Journal* **17**: 4975-4986.
- De Marco, V. ; Stier, G.; Blandia, S. y de Marco, A. 2004. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322**: 766-771.
- De Souza, W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology* **86**: 197-270.
- Fralish, B.H. y Tarleton, R.L. 2003. Genetic immunization with *LYT1* or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* **21**: 3070-3080.

- García, L. y Bruckner, D. 1988. *Diagnostic of Medical Parasitology*. ELSEVIER, USA.
- Guhl, F.; Jaramillo, C.; Carranza, J.C. y Vallejo, G. 2002. Molecular Characterization and Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Archives of Medical Research* **33**: 362-370.
- Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *TRENDS in Parasitology* **17** (8): 372-376.
- Halbhuber, Z.; Petrnochová, Z.; Alexciev, K.; Thulin, E. y Stys, D. 2003. Overexpression and purification of recombinant membrane PsbH protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **32**:18-27.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1994. *La enfermedad de Chagas y el Sistema Nervioso*. Publicación Científica # 547. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, Washington D.C., USA.
- López, M.; Huynh, C.; Andrade, L.; Pypaert, M. y Andrews, N. 2002. Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology* **119**: 141-145.
- Manning-Cela, R. 2003. Obtención y análisis de una mutante dominante negativa de *LYT1* de *Trypanosoma cruzi*. *SIIC Salud, Sección de expertos invitados*.
- Manning-Cela R.; Cortés, A.; González-Rey, E.; Van-Voorhis, W.; Swindle, J. y González, A. 2001. *LYT1* Protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* **69**(6): 3916-3923.
- Manning-Cela, R.; González, A. y Swindle, J. 2002. Alternative Splicing of *LYT1* Transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* **70**(8): 4726-4728.
- Maya, J.D.; Bollo, S.; Nuñez-Vergara, L.; Squella, J.; Repetto, Y.; Morello, A.; Périé, J. y Chauvière, G. 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochemical Pharmacology* **64**: 999-1006.
- MÉNARD, L-P.; Lussier, J.; Lépine, F.; Paiva de Sousa, C. y Dubreuil, J. 2004. Expression, purification, and biochemical characterization of



enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expression and Purification* **33**: 223-231.

- Mercado-Pimentel, M.; Jordan, N. y Aisemberg, G. 2002. Affinity purification of GST fusion proteins for immunohistochemical studies of gene expression. *Protein Expression and Purification* **26**: 260-265.
- Perera-González, J.; Tormo, A. y García, J. 2002. *Ingeniería Genética*. Vol I. Editorial Síntesis, España.
- Piekarski, G. 1989. *Medical Parasitology*. 3ª edición. Springer-Verlag, USA.
- Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. 1999. *Microbiología*. 4ª edición. Mc Graw Hill-Interamericana, España.
- Promega Corporation. 2003. *pGEM-T and pGEM-T-Easy Vector Systems Protocol*.
- SALUTA, M. y BELL, P. 1998. Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. Life Science News I, *Amersham Biosciences* 1-3.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3ª ed, Vol 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Tan, H. y Andrews, N.W. 2002. Don't bother to knock – the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *TRENDS in Parasitology* **18**: 427-428.
- Tyler, K.M. y Engman, D.M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* **31**: 472-480.
- Urbina, J.A. y Docampo, R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas Disease. *TRENDS in Parasitology* **19** (11): 495-500.
- Wilson, K. y Walker, J. 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. 5ª edición. Cambridge University Press, UK.

#### Páginas Web consultadas:

- <http://www.invitrogene.com>
- <http://www.stratagene.com>
- <http://www.amershambiosciences.com>

## Apéndice I: Metodología de las técnicas utilizadas

### I. Lisis Alcalina

1. Cultivar en 10 ml de medio Luria Broth + ampicilina (100 µg/ml) la cepa de interés a 37°C, agitando a ~200 rpm toda la noche
2. Centrifugar los 10 ml de cultivo a 4,000 rpm por 10 minutos
3. Con los tubos dentro de hielo, resuspender la pastilla de bacterias en 200 µl de la solución I, agitar en vórtex
4. Agregar la solución II (400 µl), invertir 5 veces
5. Rápidamente agregar la solución III (300 µl), incubar de 3-5 min en hielo
6. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min a 4°C
7. Pasar el sobrenadante a otro tubo y agregar 2 µl de RNAsa 10 mg/ml por 2 horas
8. Extraer con fenol-cloroformo-isoamílico y centrifugar como en 6
9. Recuperar la fase superior y adicionar 600 µl de isopropanol e incubar 10 minutos a TA
10. Centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm a 4°C
11. Lavar la pastilla de ADN con etanol frío al 70%, centrifugar como en 10
12. Resuspender la pastilla en 25-50 µl de buffer TE

#### SOLUCIONES (concentraciones finales)

SOL I: glucosa 50 mM, Tris-Cl (pH 8.0) 25 mM, EDTA 10 mM.

SOL II: NaOH 0.2 N, SDS 1%

SOL III: KAcO 5 mM, ac. acético glacial

Buffer TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM

Mezcla fenol: cloroformo: isoamílico 25:24:1

### II. Transformación de Células Competentes

1. Colocar en un tubo de vidrio estéril 100 µl de solución TFB II y 10-20 µl de la ligación
2. Añadir 50 µl de células calcio competentes
3. Mezclar muy cuidadosamente y colocar en hielo por 20 minutos sin mover
4. Dar un choque térmico a las células por 90 seg en baño de agua a exactamente 42°C
5. Dejar enfriar y añadir 1 ml de medio LB, incubar 1 hora a con agitación a ~200 rpm a 30- 37°C
6. Plaquear toda la transformación en cajas Petri de agar Luria-ampicilina (o bien, en Luria + amp + IPTG + X-gal) según sea el caso
7. Incubar las cajas Petri toda la noche a 37°C

Los pasos 1-2 realizar en cuarto frío con material y soluciones frías  
TFB II: 10mM MOPS (pH 7.0); 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15% glicerol.

### III. STET-PREP

1. Colocar 5 ml de LB + amp (100 µg/ml) en un tubo estéril e inocular con la colonia a analizar
2. Incubar a 37°C, con agitación a 200 rpm, toda la noche
3. Centrifugar 1.5 ml de cada cultivo en un tubo eppendorf y centrifugar a 12,000 rpm 1 min a TA
4. Retirar sobrenadante, y repetir paso 3
5. Resuspender la pastilla en 350 µl de solución STET
6. Añadir 25 µl de lisozima recién preparada (10 mg/ml, resuspendida en Tris 10 mM pH 8.0)
7. Colocar los tubos en baño de agua hirviendo por 40 segundos exactos
8. Dejar enfriar y centrifugar a 12 000 rpm, 10 minutos a TA
9. Recuperar sobrenadante en otro tubo y añadir: 40 µl de NaAcO 2.5 M (pH 5.2) + 400 µl de isopropanol. Mezclar bien e incubar 5 min a TA
10. Centrifugar la pastilla de ADN a 12,000 rpm, a 4°C por 5 minutos
11. Retirar el sobrenadante y desechar
12. Añadir 1 ml de etanol 70% frío y centrifugar como en 10
13. Retirar sobrenadante y desechar
14. Resuspender en 20-50 µl de TE pH 8.0

Solución STET (conc. final): NaCl 0.1 M, Tris-Cl (pH 8.0) 10 mM, EDTA 1 mM y Tritón X100 5%.

### IV. Electroforesis en agarosa

1. Preparar la agarosa 1% en Buffer TBE o TAE (0.5X)
2. Colocar el gel en el molde y esperar a que gelifique
3. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y añadir buffer TBE o TAE según se requiera
4. Cargar el gel con las muestras
5. Correr 30 – 45 minutos a 100 V
6. Teñir el gel con Bromuro de etidio por 6 minutos, lavar con agua por 20 minutos
7. Observar en el transiluminador con luz UV

TAE 1X: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM

TBE 1X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM

## V. Extracción de ADN de geles de agarosa

1. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa (corrido en buffer TAE a 50 Volts)
2. Pesar el gel en un tubo. Añadir 3 volúmenes de Buffer QG por 1 volumen de gel (100 mg~100 ul)
3. Incubar a 50°C por 10 minutos
4. Tras la disolución completa del gel, checar que el color de la mezcla sea amarillo
5. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol y mezclar
6. Colocar una columna de separación en un tubo colector de 2 ml
7. Colocar la muestra en la columna y centrifugar por 1 minuto a 12 000 rpm
8. Descartar el colectado en el tubo y colocar la columna en el tubo de nuevo
9. Para lavar, añadir 0.75 ml de buffer PE a la columna y centrifugar 1 minuto
10. Descartar lo colectado y volver a centrifugar la columna 1 minuto más
11. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml
12. Para eluir el ADN, añadir 30-50 ul de Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o H<sub>2</sub>O y centrifugar 1 minuto

## VI. Inducción y purificación de la proteína de fusión

1. Inocular ~ 5 ml de medio LB + Amp (100 ug/ml) + Inhibidor de proteasas Complete 1X (Roche) con la bacteria transformada con el ADN recombinante (pGEX-4T-1-LYT1). Colocar también como control bacteria con pGEX-4T-1. Incubar toda la noche a 30°C en agitación
2. A 30 ml de medio + Amp + Inhibidor de proteasas Complete 1X agregar 100 ul del cultivo anterior por cada 5 ml. Incubar a 30°C con agitación constante
3. Tomar una muestra del cultivo al llegar a una DO<sub>600</sub>= 0.5
4. Agregar IPTG a una concentración final de 1 mM y seguir incubando por 8 horas
5. A la pastilla de bacterias adicionar (para 1 L de cultivo) 60 ml de STE frío + lisozima a una concentración final de 100 ug/ml + Complete 1X, resuspender
6. Incubar 15 minutos a 4°C
7. Adicionar 3 ml de DTT-STE 100 mM
8. Adicionar 9 ml de sarcosil-STE al 10%
9. Agitar con vórtex 5 seg
10. Sonicar hasta que desaparezca la turbidez
11. Centrifugar 30 min a 10 000 rpm, 4°C

12. Recuperar el sobrenadante y adicionar Tritón X100-STE 10% para una concentración final de 2-4 %
13. Agregar las perlas Glutación-Sepharosa (50% según instrucciones del fabricante, 2 ml por cada 100 ml de cultivo) y dejar interaccionar 2 horas a TA en agitación constante
14. Centrifugar a 500g por 5 min a 4°C
15. Retirar sobrenadante y agregar 10 volúmenes de PBS 1X frío y mezclar
16. Centrifugar 5 minutos a 500g y 4°C, retirar sobrenadante
17. Repetir 2 veces pasos 15 y 16
18. Agregar 1 volumen de perlas de buffer de elución con glutación
19. Interaccionar con agitación constante 20 min a TA
20. Centrifugar 500g, transferir sobrenadante a un tubo limpio
21. Adicionar nuevamente buffer de elución y repetir pasos 19 y 20 para obtener un total de 3 eluciones conteniendo la proteína de interés
22. Tomar una alícuota, agregar Buffer para corrimiento de proteínas y checar la muestra en gel PAGE-SDS

STE: Tris-Cl 10 mM pH8.0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8.0  
Buffer elución: Tris 50 mM pH 8.0 y glutación reducido 5-10 mM  
Complete: 1 tableta disuelta en 2 ml H<sub>2</sub>O pH 7.0  
PBS 1X: NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM,  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM. pH 7.4

## VII. PREPARACIÓN DEL GEL PAGE-SDS

1. Preparar la mezcla del gel separador de poliacrilamida a la concentración deseada (10% en este caso)
2. Verter en los vidrios para gel la mezcla de PAGE-SDS
3. Agregar ~1 ml de isopropanol para sellar el gel
4. Retirar el isopropanol una vez polimerizado el gel y colocar el gel concentrador y dejar polimerizar
5. Se adiciona el buffer de corrida 1X a -4°C
6. Se carga el gel con las muestras. Se corre a 100 V por ~2 horas
7. Lavar el gel con agua destilada y se tiñe con azul de Coomassie
8. Se retira el colorante y se sumerge ahora en solución desteñidora

Solución Acrilamida-Bisacrilamida 30% (92% Acrilamida)  
Buffer de corrida: Glicina 250 mM, Tris 25 mM, SDS 0.1%  
Solución desteñidora: Ácido acético 10%, Metanol 30%  
Buffer de muestra: SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM,  
Tris pH 6.8 60 mM, Azul de bromofenol 0.001%

### VIII. WESTERN-BLOT

#### *a) Transferencia del gel a una membrana*

Una vez que el gel de poliacrilamida está listo:

1. Se equilibra el gel y el papel de nitrocelulosa 15 – 20 minutos con el buffer de transferencia 1X
2. Se coloca el sándwich de la siguiente manera: una esponja sobre la parte negra/papel Whatmann/ el gel/ la membrana nitrocelulosa /otro papel Whatman/otra esponja
3. Todo el sándwich se realiza sumergido en el buffer de transferencia 1X (a  $-4^{\circ}\text{C}$ ) para proteínas de alto peso molecular
4. Se corre a 100 V por 2:00 hrs en la cámara sumergida en hielo.
5. Teñir el papel de nitrocelulosa con rojo de Ponceau por 5 minutos. (para verificar que sí se haya transferido)
6. Lavar con agua o con PBS 1X para desteñir
7. Una vez borradas la bandas se bloquea el papel con leche Svelty al 6% (disuelta en PBS 1x) toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$

Buffer Transferencia: Tris 50 mM, Glicina 380 mM, SDS 0.1%, Metanol 20%.

#### *b) Incubación de las membranas con los anticuerpos*

1. Incubar el primer anticuerpo  $\alpha$ -GST 1:10,000 disuelto en leche Svelty 6% (en PBS) toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación o 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$
2. Lavar así: 2 lavados 10 min con PBS 1X/2 veces 10 min con PBS-Tween 0.05%/2 veces 10 min PBS 1X
3. Incubar con el segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa 1:5000 en leche Svelty 6% 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$
4. Lavar como en 2

*c) Revelado con el reactivo de detección ECL® (Amersham Biosciences ): se realiza en cuarto oscuro.*

1. Se sacan las membranas del 2do lavado con PBS y se colocan en el cartucho para revelar
2. Se prepara el ECL 50% de la solución 1 y 50% de la solución 2
3. Se agita suavemente y se coloca sobre las membranas a revelar
4. Se coloca una placa radiográfica y se deja el tiempo necesario (30 seg a 2 min)
5. Se saca la placa y se coloca en el revelador hasta que aparezca la señal
6. Se mete la placa al agua e inmediatamente después al fijador 3 minutos Posteriormente, se pasa de nuevo al agua y se dejan secar

## Apéndice II: Reacciones Enzimáticas

### I. PCR

#### A) Amplificación de la secuencia *LYT1*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Buffer 10X	5.0 ul
MgSO <sub>4</sub>	2.0 ul
dNTP 1.25 mM	8.0 ul
LYT11-A 0.1 ug/ul	0.5 ul
LYT12 0.1 ug/ul	0.5 ul
ADN	~ 20 ng
Taq DNA polimerasa HIFI	0.5 ul
H <sub>2</sub> O	32.5 ul
TOTAL	50.0 ul

#### B) Comprobación de la presencia de *LYT1* en el vector pGEX-4T-1.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Buffer 10X	5.0 ul
DNTP 1.25 mM	8.0 ul
ADN	~ 25 ng
LYT-11a 0.1 ug/ul	0.5 ul
POR-2 0.1 ug/ul	0.5 ul
Taq polimerasa	5.0 ul
MgCl <sub>2</sub> 20X	2.5 ul
H <sub>2</sub> O	27.5 ul
TOTAL	50.0 ul

### II. REACCIÓN DE POLIADENILACIÓN

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Producto PCR	5.0 ul (~500 ng)
Buffer 5X	2.0 ul
dATP 1.25 mM	2.0 ul
Go Taq DNA polimerasa	1.0 ul
TOTAL	10.0 ul

*Incubar 30 min a 70°C.*

### III. LIGACIONES

#### A) pGEM-T-LYT1

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
pGEM-T-Easy	1.0 ul (50 ng)
LYT1 (tras poliA)	3.0 ul (~100 ng)
Buffer 2X	4.5 ul
Ligasa	1.5 ul
Total	10.0 ul

*Incubar 16 horas a 4°C. La proporción utilizada fue de 3:1 inserto:vector.*

#### B) pGEX-4T-1-LYT1

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
pGEX-4T-1 y LYT1	1:12
Buffer 10X	2.0 ul
ATP 5mM	1.0 ul
T4 DNA ligasa	1.0 ul
Total	20.0 ul

*IMPORTANTE: Aplicar choque térmico de 50°C por 30 segundos antes de agregar la enzima. Incubar 16 -24 horas a 16°C.*

### IV. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

#### a) Digestiones dobles *EcoR* I y *Xho* I

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>
ADN	*
Buffer 10X	1X
<i>EcoR</i> I	
BSA 10X	1X
<i>EcoR</i> I (20 U/ul)	2-20 U*
<i>Xho</i> I (20 U/ul)	2-20 U*
H <sub>2</sub> O	*
Total	10-20 ul



b) Digestiones con *Xho* I

<b>Componentes</b>	<b>Con. final</b>
ADNp	*
Buffer 2 10X	1X
BSA 10X	1X
<i>Xho</i> I (20 U/ul)	2-20 U*
H <sub>2</sub> O	*
Total	10-20 ul

c) Digestiones con *EcoR* I

<b>Componentes</b>	<b>Conc. final</b>
ADNp	*
Buffer 10X <i>EcoR</i> I	1X
<i>EcoR</i> I (20 U/ul)	2-20 U*
H <sub>2</sub> O	*
Total	10-20 ul

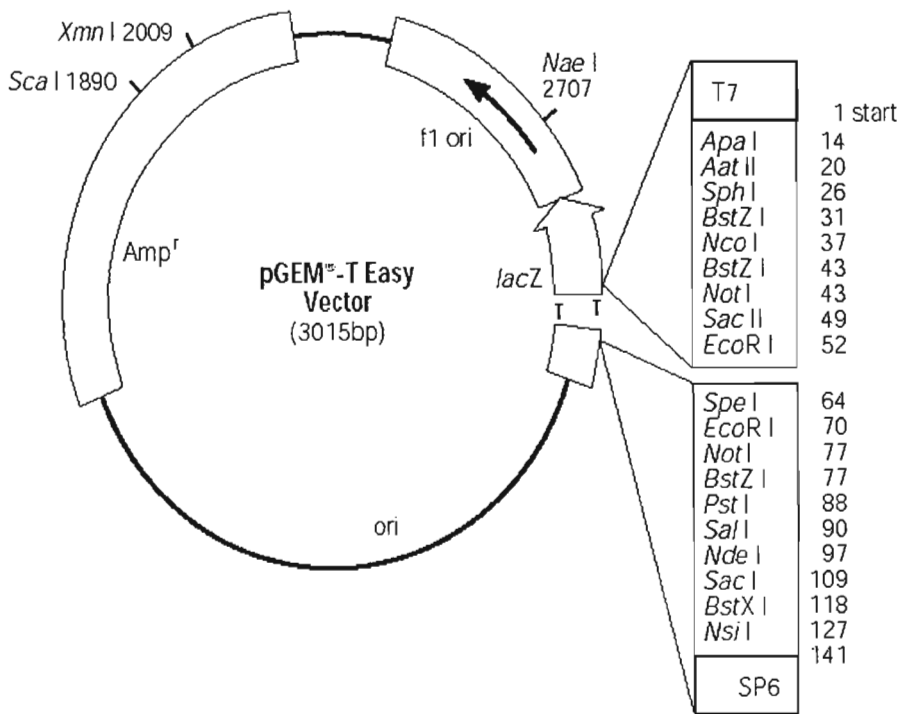
*Nota: Todas las reacciones de digestión incubar 16 hrs a 37°C.*

*\*componentes variables, las cantidades de ADN y enzimas se ajustan según se necesite.*

*Unidad de enzima de restricción: Es la cantidad de enzima requerida para digerir completamente 1 microgramo de ADN en 1 hora en un volumen de 50 ul.*

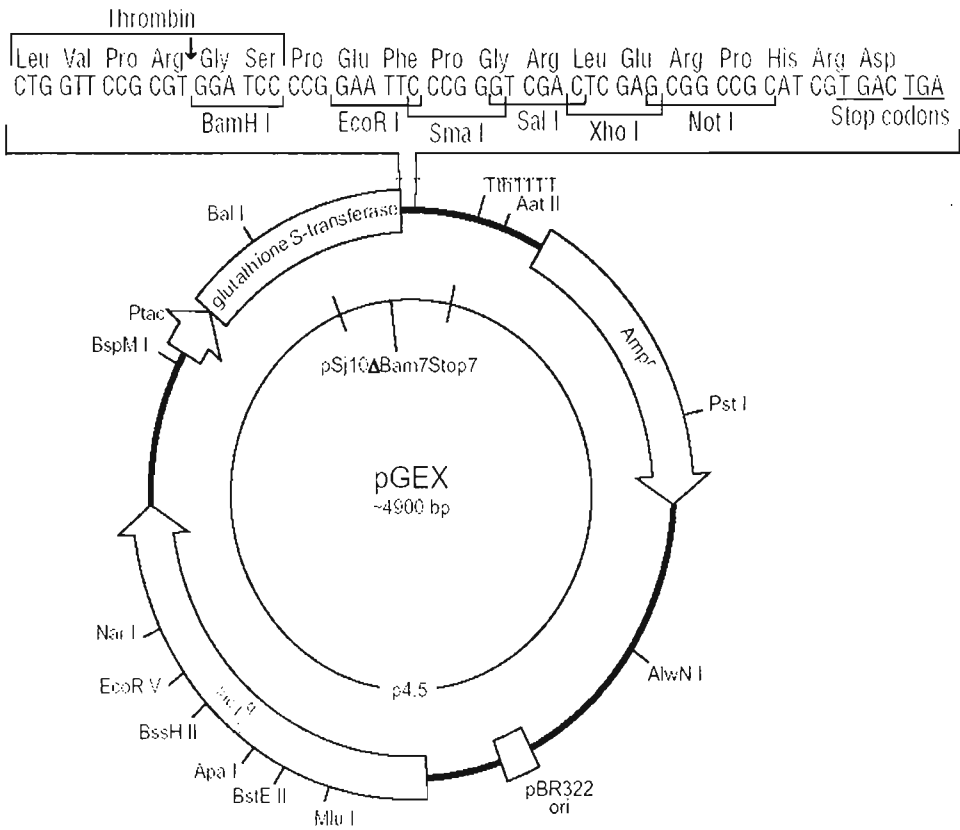
### Apéndice III: Mapas de los plásmidos utilizados.

#### A) Vector pGEM-T-Easy



Para mayor información y la secuencia completa del vector consultar [www.promega.com](http://www.promega.com)

B) pGEX-4T-1



Para mayor información visitar [www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com)

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Norma Edith

Padilla Mejía

FECHA: 24-NOV-04

FIRMA: Norma Edith

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

2

342043 . m