



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE UNA ENZIMA
CAPAZ DE POLIMERIZAR ÓXIDOS DE SILICIO EN
*LEISHMANIA TARENTOLAE***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
ANDREA TREJO MERCADO**



CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: HOMERO HERNÁNDEZ Y MONTES
VOCAL: RUTH EDITH MARTIN FUENTES
SECRETARIO: NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG
1ER SUPLENTE: MARÍA ELENA IBARRA RUBIO
2° SUPLENTE: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 7 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM.

ASESORA DEL TEMA:

DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG _____

SUPERVISORA TÉCNICA:

DRA. PATRICIA CANO SÁNCHEZ _____

SUSTENTANTE:

ANDREA TREJO MERCADO _____

AGRADECIMIENTOS

A los apoyos recibidos de CONACYT proyectos 167359 Ciencia Básica 2011 “Estudios del reconocimiento molecular de proteínas involucradas en la maduración ribosomal” y 166472 “Estructura y termodinámica del reconocimiento biomacromolecular”.

¿Un instante de felicidad no es suficiente para toda una vida?

F. Dostoievski

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABREVIACIONES	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 SILICIO Y SU POLIMERIZACIÓN	3
1.2 BIOSILICIFICACIÓN	5
1.3 LA SILICATEÍNA	7
1.3.1 <i>Actividad de la Silicateína</i>	9
1.4 SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	11
1.4.1 <i>Sistemas de expresión procariontes</i>	13
1.4.2 <i>Sistemas de expresión eucariontes</i>	14
1.5 <i>LEISHMANIA TARENTOLAE</i>	17
1.6 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>LEISHMANIA TARENTOLAE</i>	20
1.6.1 <i>Transfección estable con episomas</i>	20
1.6.2 <i>Transfección permanente por integración al genoma</i>	21
1.7 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA SILICATEÍNA	23
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGÍAS.....	26
4.1 MATERIALES Y REACTIVOS QUÍMICOS.....	26
4.2 TRABAJO EXPERIMENTAL	28
4.2.1 <i>Metodologías para la expresión de la silicateína en células de E.coli</i>	28
4.2.2 <i>Metodologías para la expresión de silicateína en L. tarentolae</i>	30
4.2.3 <i>Métodos generales de Biología Molecular</i>	35
4.2.4 <i>Métodos generales de Bioquímica de proteínas</i>	38
4.2.5 <i>Métodos para la manipulación de Leishmania tarentolae</i>	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1 EXPRESIÓN DE LA SILICATEÍNA EN CÉLULAS PROCARIONTES	50

5.1.1	<i>Dispersión Dinámica de Luz (DLS)</i>	56
5.2	EXPRESIÓN DE LA SILICATEÍNA EN CÉLULAS EUCARIONTES.....	58
6.	CONCLUSIONES	72
7.	BIBLIOGRAFÍA	74

RESUMEN

Desde años atrás, se conoce la existencia de esponjas marinas vítreas que poseen proteínas llamadas *silicateínas* involucradas en la biosíntesis de su esqueleto interno constituido principalmente de silicio. Aun cuando se desconocen los mecanismos mediante los cuales ocurre la formación del esqueleto, se sabe que estas enzimas catalizan la polimerización de estructuras ordenadas de sílice en un proceso denominado como biosilificación. Desde el descubrimiento de las *silicateínas* ha surgido un vasto interés en su obtención y manipulación debido al extenso uso de los polímeros de silicio en una amplia variedad de disciplinas como nanoestructura, biomedicina y biomateriales. Para la elucidación de su estructura y la comprensión de su mecanismo de acción, en este trabajo se buscó obtener de forma recombinante a la silicateína- α de la esponja marina *Tethya aurantia*, mediante dos diferentes sistemas de expresión de proteínas. A su vez, para cada sistema empleado se realizaron dos construcciones distintas: 1) el propéptido de la silicateína- α que contiene tanto al dominio inhibitorio como el dominio catalítico (residuos 17-289) y, 2) el dominio catalítico (residuos 113-289). Inicialmente se probó el sistema de expresión bacteriano de *Escherichia coli*, modificado de forma tal que sobreexpresara las principales chaperonas de esta bacteria. Los resultados en este sistema para ambas construcciones revelaron la formación de cuerpos de inclusión. En el caso del dominio catalítico, parte de la proteína se encontró en la fracción soluble, sin embargo, estudios de dispersión dinámica de luz mostraron a la proteína formando agregados de gran tamaño, lo que sugirió un mal plegamiento de la proteína. Para favorecer el correcto plegamiento, se decidió continuar con el sistema de expresión eucarionte de *Leishmania tarentolae*. En la segunda parte del trabajo se construyó una cepa transgénica de este microorganismo modificada con el gen de la silicateína- α , de forma tal que la proteína fuera secretada al medio de cultivo. Los resultados obtenidos mediante geles SDS-PAGE teñidos con plata y Western Blot contra etiqueta de histidinas no lograron detectar la presencia de la silicateína- α recombinante.

ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
DO ₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
kDa	kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
PSA	Persulfato de amonio
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida
TEMED	Tetrametilendiamina
TEOS	Tetraetoxisilano

1. ANTECEDENTES

1.1 Silicio y su polimerización

El silicio (Si) es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre, y se le ha utilizado desde hace miles de años para la elaboración de vidrio empleando para ello los silicatos. Desde mediados del siglo XX se le ha utilizado en la industria electrónica y computacional para la elaboración de microchips que tienen como base el silicio. Asimismo, se sabe que algunas celdas solares son confeccionadas a partir de compuestos de este elemento. La aplicación más sobresaliente en los últimos años es la fabricación de fibras ópticas, las cuales son la base para la transmisión de información a través de haces de luz. En la actualidad se siguen desarrollando nanoestructuras a base de silicio y germanio que presentan propiedades superconductoras, ya que conducen la electricidad sin pérdida apreciable de corriente (1).

Químicamente, el silicato más sencillo es el dióxido de silicio o sílice (SiO_2). El átomo de silicio coordina cuatro átomos de oxígeno orientados en las cuatro esquinas de un tetraedro; quedando así libres cuatro valencias, una de cada de oxígeno, que se saturan por unión con otros grupos coordinados similares (Figura 1). A base de esta molécula (SiO_4^{4-}) se forma el complejo de la sílice $(\text{SiO}_2)_x$ donde la relación de silicio y oxígeno es de 1:2 por la compartición de los oxígenos (2).

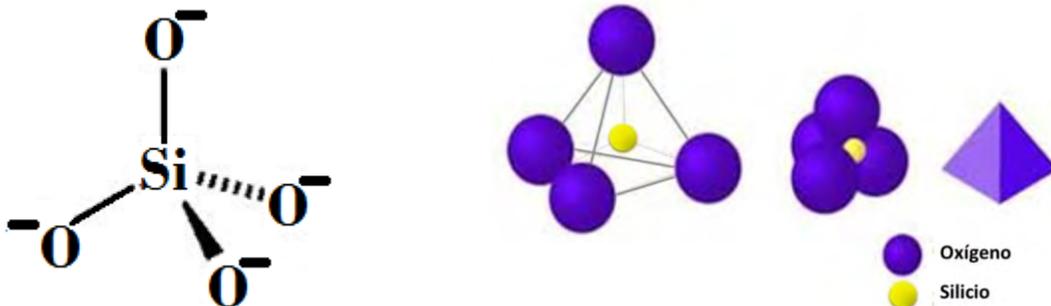


Figura 1. Representación de la estructura de la molécula SiO_4^{4-} . Se observa su forma tetraédrica conformada por un átomo de silicio y cuatro de oxígeno.

Consecuentemente, cada ion de oxígeno, O^- , puede unirse a otro ion silicio en una conformación tetraédrica en la que los grupos tetraédricos están unidos por los oxígenos compartidos (puentes de oxígeno). A la unión de tetraedros mediante la compartición de oxígeno se le denomina *polimerización*. Esta capacidad de polimerización es el origen de la gran variedad de estructuras de silicatos que existen. Un tetraedro puede compartir uno, dos, tres o sus cuatro oxígenos resultando en estructuras con diversas configuraciones (Figura 2) (3). Cerca del 90 % de todos los minerales que se conocen son silicatos combinados con otros elementos como el hierro, aluminio y calcio.

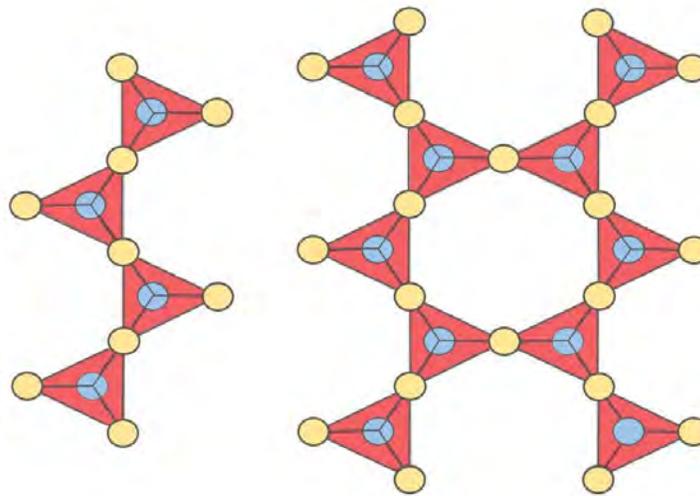


Figura 2. Diferentes estructuras de los polímeros de silicatos. En azul se muestran los átomos de silicio y en amarillo los de oxígeno, los cuales son los únicos átomos involucrados en otro enlace.

La obtención de sílice a nivel mundial se ha llevado a cabo desde hace más de un siglo, y a lo largo del tiempo se han empleado diferentes materias primas, así como distintos métodos de producción. Empero, todos los métodos sintéticos utilizados implican condiciones hostiles para el medio ambiente dado que se emplean valores extremos de pH, alta temperatura y/o presión, tiempos de reacción muy prolongados, uso de disolventes orgánicos tóxicos, así como protocolos con múltiples pasos de reacción. Por ejemplo, para la elaboración de vidrio de sílice se emplean temperaturas que pueden alcanzar hasta los 2270 K

(2). Además, aun con los recientes avances en el tema, el control preciso sobre la nanoestructura de la sílice y la morfología siguen representando un gran desafío técnico (4).

En contraste, en la naturaleza la polimerización de sílice se produce en agua, en condiciones ambientales de temperatura y presión, a valores de pH cercanos a la neutralidad, con estructuras altamente ordenadas y múltiples morfologías con control preciso de nanoescala. Este proceso es llevado a cabo por organismos unicelulares y multicelulares, incluyendo diatomeas, esponjas y animales superiores, cuyos esqueletos formados de sílice son producidos con alta fidelidad y en un gran número de copias, haciendo de este proceso natural uno de los más estudiados e inspiradores para la fabricación de nuevos materiales de biosílice con propiedades eléctricas, ópticas y catalíticas únicas.

1.2 Biosilicificación

La biomineralización es la formación de complejos a partir de materiales inorgánicos llevado a cabo en los seres vivos. Este proceso está ampliamente distribuido entre los cuatro reinos del dominio *Eukarya*, donde existen organismos capaces de formar estructuras inorgánicas a partir de moléculas biológicas. La biomineralización proporciona a los organismos soporte estructural y protección a sus órganos internos, así como protección contra posibles depredadores (5). El calcio es probablemente uno de los elementos más conocidos que participa en procesos de biomineralización, sin embargo, se ha observado que el silicio tiene un papel de importancia equivalente a la del calcio. La biosilicificación es el proceso mediante el cual el silicio inorgánico es incorporado a los seres vivos en forma de sílice con la participación de intermediarios orgánicos, principalmente proteínas. En la práctica este proceso implica la condensación de moléculas de ortosilicato $\text{Si}(\text{OH})_4$ en polímeros de silicio con la eliminación de agua (Figura 3) (6).

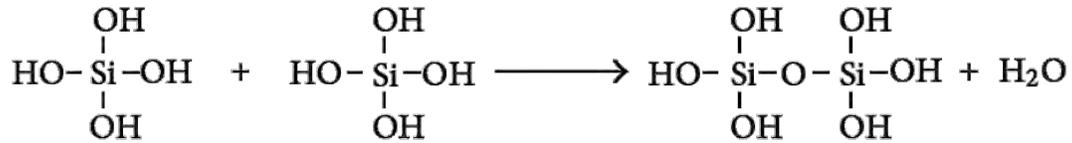


Figura 3. Ecuación de la reacción de condensación de dos moléculas de ortosilicato con eliminación de agua. Este proceso puede continuar infinitamente para crear largas cadenas ramificadas de sílice.

Entre los organismos involucrados en el proceso de biomineralización se encuentran las esponjas marinas. Estos organismos han habitado la Tierra desde hace más de 700 millones de años, siendo los animales vivos más antiguos de los cuales se tenga conocimiento. Resaltan dos clases de esponjas del *phylum* Porifera que poseen un esqueleto interno duro hecho principalmente de sílice amorfa hidratada (SiO_2), nombradas como Demosponja y Hexactinellida. Estas dos clases de esponjas contienen elementos óseos llamados espículas que constituyen la base para su clasificación. En las Demosponjas, las espículas se encuentran estructuradas en uno a cuatro ejes, mientras que en la clase Hexactinellida éstas se ordenan en seis ejes. En las esponjas, las espículas formadas a partir de sílice sirven principalmente como soporte estructural, sin embargo, fuera del organismo las espículas son capaces de conducir la luz, además de contar con extraordinarias propiedades mecánicas como alta flexibilidad, resistencia y tenacidad que pueden ser usadas en la elaboración de materiales hechos a base de vidrio. La síntesis de espículas de esponja difiere notablemente de otros procesos de biomineralización, ya que es accionado y controlado principalmente por medio de una enzima denominada *silicateína* (7).

Entre las esponjas vítreas que se han identificado, destaca la esponja marina *Tethya aurantia*, perteneciente a la clase Demosponja, en la cual las espículas de sílice constituyen el 75 % de su peso seco, convirtiéndola en un organismo excepcional para estudiar a las proteínas asociadas específicamente a la biosilificación. Cada espícula de *T. aurantia* contiene un filamento central de proteína que se observa por difracción de rayos X, y muestra una estructura altamente regular y repetitiva. Los filamentos de proteína pueden disociarse para producir tres subunidades similares llamadas: *silicateína- α* , *silicateína- β* y

silicateína-γ. Los pesos moleculares y la composición de aminoácidos de las tres subunidades son similares, lo que sugiere son isoformas y miembros de una misma familia de proteínas. Las proporciones en las que se encuentran presentes cada una de las subunidades son 12:6:1, respectivamente. Estudios experimentales mostraron que la silicateína- α , la más abundante de las silicateínas, forma dímeros y tetrámeros que son unidos por una molécula de la silicateína- β , lo cual permite la elongación de los filamentos de manera bidireccional (8). Se desconoce aún la función de la silicateína- γ .

1.3 La Silicateína

Las silicateínas constituyen una familia de proteínas con propiedades específicas: I) son capaces de formar un polímero inorgánico, biosílice, a partir de precursores monoméricos inorgánicos, II) permanecen atrapadas después de la formación del producto dentro de la biosílice formada, III) actúan como una guía en la estructura (proteína de andamio), y IV) funcionan como proteínas formadoras de estructura (7). A pesar de la importancia de estas enzimas, los mecanismos de formación y direccionamiento de la estructura de biosílice permanecen sin resolver.

Por otra parte, se ha estudiado que la silicateína¹ presente en *T. aurantia* no es específica para precursores de sílice, también actúa en óxidos metálicos relacionados, tal como el nitrato de galio y alcóxidos de titanio. Estos últimos pueden ser transformados en nanocristales hechos a base de óxidos de titanio llamados anatase, además la sal titanofluoruro de bario (BaTiF_6) da lugar a los nanocristales BaTiOF_4 . En todos los casos, es la silicateína la responsable de estas policondensaciones llevadas a cabo en soluciones acuosas, bajo temperaturas ambientales y valores de pH cercanos a la neutralidad (6).

La secuencia de ADN codificante de la silicateína revela que esta proteína es similar (45 % de identidad) a los miembros de la familia de proteasas tipo L-catepsina, una superfamilia de proteasas de cisteína tipo papaína. Sin embargo, la cisteína en el sitio activo de las proteasas es sustituida por la serina en la

¹ En adelante en el presente estudio se utilizará el término *silicateína(s)* para referirse únicamente a la *silicateína- α* .

silicateína y, por otro lado, las seis cisteínas que forman los puentes disulfuro en las proteasas se conservan, así como los otros dos aminoácidos de la triada catalítica: His y Asp. La silicateína contiene, además, disposiciones en tándem de residuos ricos en grupos hidroxilo (8).

La silicateína se encuentra localizada dentro del canal axial de la espícula, donde da lugar al filamento axial (Figura 4). La silicateína es una enzima con múltiples actividades asociadas, su proteína precursora (propéptido) tiene un peso de 35 kDa, que incluye un péptido señal de 15 aminoácidos y una secuencia asociada al propéptido de 87 aminoácidos, la cual es removida por una reacción autocatalítica mediante un mecanismo aún desconocido, que da como resultado a la proteína madura de 23 kDa.

La primera alusión del comportamiento de la silicateína como propéptido es el cambio de solubilidad, estudios inmunobioquímicos revelaron que extracelularmente y en el espacio extraespicular, la silicateína existe como una enzima inmadura con alta solubilidad en agua, que posteriormente da lugar a la proteína madura insoluble en agua (7). La escisión autocatalítica y la liberación del propéptido en N-terminal permite la exposición de los fragmentos hidrofóbicos de la superficie de la molécula, dando como resultado el autoensamblaje de los monómeros de la silicateína- α madura a dímeros y tetrámeros, y posteriormente, a pentámeros de 4:1 silicateína- α : silicateína- β , que se ensamblan a los filamentos largos. La escisión autocatalítica de la prosilicateína, bajo la liberación del propéptido N-terminal, también da como resultado el descubrimiento del sitio activo de la silicateína, permitiendo la reacción de policondensación enzimática de biosílice. El agua de reacción que se acumula durante la policondensación se ha propuesto es eliminada por las células a través de un mecanismo de transporte mediado por una acuaporina (7). El sustrato natural de la enzima es aún desconocido, sin embargo, se ha estudiado su capacidad *in vitro* de condensar sílice a partir de organosilanos tales como el tetraetoxisilano (TEOS).

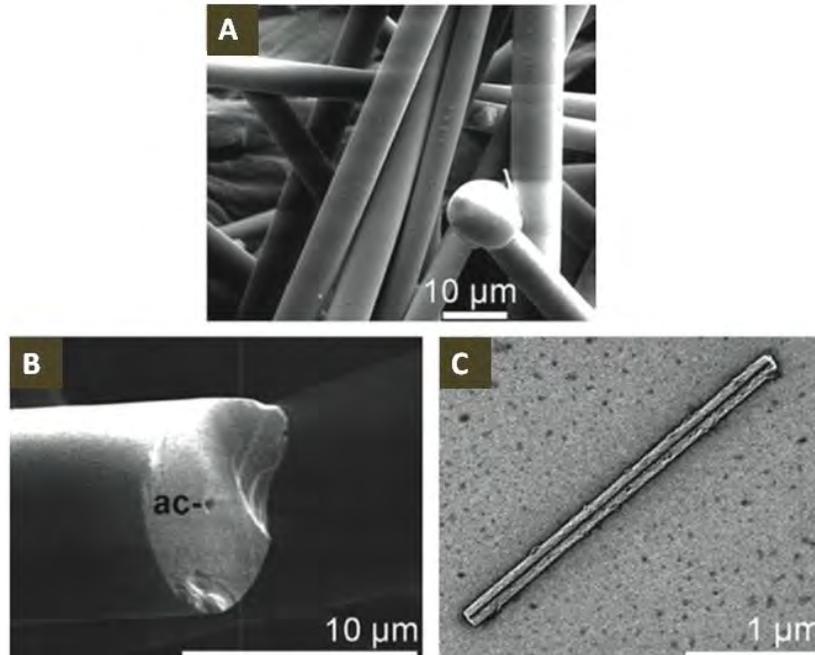


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido. A: espículas de la silicateína, B: Canal axial. C: filamento axial (7).

1.3.1 Actividad de la Silicateína

La clave para elucidar el mecanismo de acción de las silicateínas es entender cómo logran componentes orgánicos llevar a cabo un proceso inorgánico para la formación de una estructura biológica con una función definida. Para que ocurra la biosilificación, primeramente, deben de acumularse silicatos dentro de la célula a concentraciones lo suficientemente altas para su subsecuente deposición. La concentración de ácido silícico es alrededor de 3-70 μM en agua de mar, sin embargo, existen muchos factores que pueden alterar las concentraciones presentes. El primer paso es activado por transportadores de sílice, los cuales llevan a la célula a una concentración de ácido silícico aproximada de 100 mM. Esta concentración es tan alta que los silicatos se encuentran sobresaturados, lo cual revela el papel de otros componentes, proteínas entre ellos, para mantener la solubilidad de la sílice. El sitio específico donde se almacena la sílice es nombrado como *silicasoma*. Debido a la baja concentración de ácido silícico en los alrededores, se requiere que estos transportadores sean activos y especializados.

Únicamente se ha podido identificar un transportador de este tipo en la esponja *Suberites domuncula* asignado a la familia de transportadores NBC, cuya expresión es altamente regulada por el aumento del ácido silícico y cuya actividad es localizada en las áreas cercanas a las espículas (6).

Usando como modelo a la esponja *S. domuncula* se logró demostrar que la formación de las espículas comienza intracelularmente, dirigido por la elongación del filamento axial, y es completado extracelularmente por dos procesos morfogénéticos concertados. Inicialmente se lleva a cabo la invaginación de las protuberancias de las células que dirigen el crecimiento axial de las espículas, y posteriormente, un mantel orgánico formado por silicateína y colágeno permite el engrosamiento radial de las espículas (7). La condensación del etóxido de silicio, se ha propuesto, es realizado por la formación de un intermediario covalente entre el silicio y la serina del sitio activo de la silicateína (9). Para corroborar este mecanismo, el grupo de trabajo de Bawaser y Morse, introdujeron mutaciones en la silicateína donde el aminoácido de la serina en el sitio activo fue reemplazado por la cisteína para abatir la actividad de la silicateína. Los resultados mostraron que diferentes mutaciones fueron capaces de condensar sílice a partir del ácido silícico, no obstante, al someter las mutantes con el sustrato de la silicateína, TEOS, no se observó actividad por parte de estas (10). Lo anterior es un indicativo más acerca de la complejidad y especificidad de la reacción llevada a cabo por la silicateína. No se han reportado cofactores involucrados en la reacción, y si el proceso se puede llevar a cabo en soluciones amortiguadoras simples. Sin embargo, la presencia de Fe^{3+} ha sido reportada como un promotor de la reacción, sin que los iones Mg^{2+} o el EDTA tengan efecto alguno (11).

1.4 Sistemas de Expresión de Proteínas Recombinantes

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de: 1) los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente, 2) aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien, 3) sistemas de expresión que se diseñan y construyen según las necesidades específicas. Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de ADN que poseen los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero, además de contener el gen de estudio. Para la selección de un sistema de expresión adecuado en la síntesis de una proteína recombinante se tienen en consideración el origen biológico y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés, así como la aplicación posterior, y el bioproceso que se empleará para su producción (Tabla 1).

Tabla 1. Factores determinantes en la selección de un sistema de expresión de proteínas recombinantes.

Origen de la Proteína	Procariota Eucariota		
Propiedad de la Proteína	Secuencia nucleotídica	Uso preferencial de codones	
	Propiedades químicas	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño • pI • Modificaciones postraduccionales 	
	Estabilidad	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proteólisis ○ pH ○ Temperatura 	
	Toxicidad		
	Destino celular	<ul style="list-style-type: none"> • Extracelular • Intracelular 	
	Grado de pureza		
Aplicación	Biomedicina	<ul style="list-style-type: none"> ○ Agente terapéutico ○ Vacunas ○ Diagnóstico 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Humanos ○ Animales ○ Plantas
	Alimentos	<ul style="list-style-type: none"> • Procesos Industriales • Aditivos • Nutracéuticos • Suplemento alimenticio 	
	Química de la Transformación	<ul style="list-style-type: none"> ○ Industria del Papel ○ Industria Textil ○ Industria Farmacéutica 	
	Medio Ambiente	<ul style="list-style-type: none"> • Energía y combustibles • Tratamiento de residuos 	
Bioproceso	<ul style="list-style-type: none"> ○ Condiciones de cultivo ○ Escala ○ Costo 		

1.4.1 Sistemas de expresión procariontes

1.4.1.1 *Escherichia coli*

El sistema de expresión de las proteínas recombinantes más empleado es la bacteria gramnegativa *Escherichia coli*. Su genética ha sido estudiada a profundidad, y por tanto, posee mecanismos regulatorios conocidos. Su crecimiento es rápido y es fácilmente manipulable, con la ventaja adicional de crecer en medios de cultivo económicos. Se ha observado que los niveles de expresión en este sistema son altos y de fácil caracterización. Las principales desventajas de *E. coli*, y de los sistemas procariontes en la expresión de las proteínas recombinantes, están relacionadas con la activación de la proteína y el limitado tipo de modificaciones postraduccionales capaces de llevar a cabo. Aun cuando se han observado buenos niveles de expresión en *E. coli*, las proteínas que se obtienen en muchas ocasiones no son secretadas al medio, o no conllevan modificaciones postraduccionales, lo que representa una clara desventaja cuando se desea obtener una proteína activa. Se sabe que *E. coli* no es capaz de plegar correctamente a las proteínas exógenas, lo que da lugar a un conglomerado de proteínas inactivas (12).

La formación de cuerpos insolubles de proteínas se ha observado en muchos organismos huéspedes, sin embargo, es en *E. coli* donde este comportamiento se da con mayor incidencia. Estos agregados insolubles de proteínas inactivas se forman como consecuencia de la sobreexpresión de proteínas recombinantes y un inadecuado plegamiento, y son conocidos como *cuerpos de inclusión*. Entre los factores que favorecen su formación se encuentra el aumento de la velocidad de expresión, la disminución del plegamiento de la proteína y el aumento de la velocidad de agregación. Estos factores son dependientes del tipo del sistema usado, así como las propiedades intrínsecas de la proteína a expresar. Se ha planteado que la formación de cuerpos de inclusión representa una ventaja, pues en ellos se encuentra una gran cantidad de la proteína de interés, y se pueden extraer de las células de una forma relativamente sencilla. No obstante, el replegamiento de las proteínas presentes en cuerpos de inclusión no es tarea

sencilla, ya que involucra numerosas metodologías para llevarse a cabo. Otros autores han sugerido que la formación de cuerpos de inclusión no implica necesariamente una pérdida en la actividad de la proteína, si bien la actividad disminuye moderadamente, los cuerpos de inclusión pueden ser utilizados en mezclas catalíticas con resultados eficientes cuando se trata de una proteína con actividad enzimática (13). Esta nueva propuesta donde la formación de cuerpos de inclusión no implica una pérdida de actividad es reciente, y aún se conserva la idea generalizada de que este tipo de comportamiento no es una ruta viable para obtener proteínas activas, por lo que se considera indeseable en la producción de proteínas recombinantes.

1.4.1.2 Expresión de Chaperonas en *E. coli*

Una solución a la obtención de la proteína recombinante de interés en cuerpos de inclusión al ser expresada en *E. coli* es el uso de chaperonas. Las chaperonas son conocidas por asistir en el plegamiento de proteínas y, en algunos casos, su sobreexpresión junto con la proteína de interés ha permitido incrementar la producción de proteínas activas. Las chaperonas más abundantes y fisiológicamente importantes en *E. coli* son la dnaK, dnaJ, grpE, groEL y groES, cuya síntesis se encuentra regulada por el factor de transcripción σ^{32} , codificado por el gen *rpoH* (14). Se ha evidenciado que estos equipos de chaperonas juegan roles diferentes pero cooperativos en el plegamiento de proteínas *in vivo*. Resultados obtenidos por el equipo de trabajo de Yura y colaboradores, demostraron que la coexpresión de estos dos equipos de chaperonas a niveles apropiados estabiliza la producción de proteínas diana y regula su acumulación de forma plegada sin que exista la formación de agregados (14).

1.4.2 Sistemas de expresión eucariontes

1.4.2.1 Protozoarios

El gran avance que se ha tenido en el uso de protozoarios para la expresión de proteínas recombinantes se debe principalmente al interés por estudiar proteínas,

enzimas y factores de comportamiento de parásitos protozoarios que comprometen la salud pública. Por medio de la manipulación de un protozoario con afinidad filogenética al parásito objetivo se ha logrado desarrollar fármacos y vacunas contra parásitos letales mediante la interferencia en las vías metabólicas involucradas en su crecimiento.

Recientemente *Leishmania tarentolae*, un protozoario tripanosomátido aislado del gecko *Tarentolae annularis*, ha surgido como candidato para la expresión de genes heterólogos. Los tripanosomátidos son ricos en glicoproteínas, las cuales pueden representar más del 10 % de la proteína total. Además, el patrón de glicosilación de *L. tarentolae* es similar al de mamíferos, con la excepción de carecer de las enzimas necesarias para la producción de ácido siálico, es decir, es incapaz de introducir unidades de ácido N-acetil-neuramínico. Hasta la fecha varias proteínas heterólogas han sido expresadas en *Leishmania tarentolae* incluyendo tanto enzimas citoplasmáticas como receptores de membrana (15). Más adelante, este sistema de expresión se describirá detalladamente por su relevancia en el presente estudio.

1.4.2.2 Levaduras

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes basados en levaduras han demostrado ser una fuente eficiente y económica de proteínas eucariotas de gran interés. Estos sistemas ofrecen un ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucarióticas y son capaces de llevar a cabo algunas modificaciones postraduccionales, así como la secreción de la proteína al medio de cultivo. Las levaduras mantienen las ventajas de las bacterias al ser de fácil manipulación y tener un crecimiento rápido. Por otro lado, estos microorganismos cuentan con una organización celular eucariótica que permite la realización de procesos de expresión y maduración característicos de células eucariotas, lo cual les proporciona una ventaja para la producción de proteínas de origen eucarionte.

Saccharomyces cerevisiae es una de las levaduras mejor caracterizada, su genoma ha sido totalmente secuenciado, y es considerada como organismo

GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA americana (Food and Drug Administration). Otro microorganismo perteneciente a este grupo es *Pichia pastoris*, el cual posee la gran ventaja de emplear los promotores más fuertes y con mayor eficiencia de regulación de los cuales se tenga conocimiento. Las principales desventajas de estos sistemas de expresión son las glicosilaciones no deseables, ya que en ocasiones se presentan hiperglicosilaciones que limitan la actividad de la proteína, además de brindar una baja eficiencia en la secreción de proteínas (16).

1.4.2.3 Células de insecto

El cultivo de células de insecto tiene diversas aplicaciones que incluyen desde la investigación hasta la producción de insumos y vacunas veterinarias. Los baculovirus son patógenos naturales de los insectos y de otros artrópodos, con un rango de hospedero muy específico lo que los hace relativamente seguros para el hombre. A finales de la década de los 80's, se propuso el uso de baculovirus como vectores para la expresión de proteínas recombinantes utilizando como hospedero líneas celulares de insecto. De esa forma surgió el sistema de expresión de células de insecto-baculovirus (SCI-B). Una de las principales ventajas del sistema es la producción de altas concentraciones de proteína, principalmente porque utiliza el promotor del gen de la poliedrina (*polh*), uno de los promotores más fuertes que se conocen y que puede constituir hasta el 50 % de la proteína en una célula infectada por virus silvestre (17). Una de las razones primordiales para el uso de este sistema es su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales similares a aquellas presentes en proteínas humanas. Por otra parte, su desventaja reside en que estas glicosilaciones son estructuradas de manera diferente en comparación a las realizadas en células de mamífero. Además, es frecuente obtener estructuras altas en manosa, que son consecuencia de un procesamiento incompleto del glicano. Sólo algunas líneas celulares de insecto son capaces de producir glicanos complejos bajo condiciones de cultivo específicas. Una de estas líneas es la DpN1, obtenida de la mariposa monarca *Danaus plexippus* (18).

1.4.2.4 Células de mamífero

La expresión de genes heterólogos en células de mamífero es la primera opción para la producción de proteínas recombinantes cuando las modificaciones postraduccionales afectan la actividad biológica de la proteína diana. Pese a ello, la eficiencia de expresión de estas células es relativamente baja comparada con otros sistemas de expresión tales como *Escherichia coli* o células de levaduras. La principal línea celular de mamífero utilizada para expresar proteínas recombinantes son las denominadas células CHO (Chinese Hamster Ovary). Estas células han mostrado ser estables cuando se emplea como vector el adenovirus recombinante humano (rhAD). La capacidad de estas células para expresar glicoproteínas es alta, sin embargo, estas células carecen de enzimas que permiten la glicosilación terminal de proteínas observadas en las proteínas humanas. Generalmente las líneas celulares expresan mezclas heterogéneas de proteínas con patrones diferentes de glicosilación (glicoformas). Por otro lado, cabe mencionar el delicado manejo que requiere el trabajar con este sistema, ya que los medios de cultivo son complejos y el riesgo de contaminación por bacterias es muy alto (19).

1.5 *Leishmania tarentolae*

El orden Tripanosomatida incluye el género *Leishmania*, el cual es uno de los grupos eucariontes más antiguos con un amplio número de especies parásitas extra e intracelular. *Leishmania* (y otros miembros de la familia Trypanosomatidae) posee un genoma con características poco ortodoxas en su organización y expresión en comparación con la mayoría de los eucariotas. En *Leishmania* y *Trypanosoma* muchos genes se encuentran agrupados en unidades de transcripción policistrónicas que hacen que cada transcrito primario sea un ARNm precursor policistrónico (Figura 5) (20). Los ARNm individuales son escindidos del precursor por medio de una reacción de trans-empalme, durante la cual una secuencia líder de 39 nucleótidos (miniexón, ME) se une a cada uno de los transcritos en el extremo 5', donándoles la estructura cap (residuo 7-

metilguanosa) al mismo tiempo que el extremo 3'- de cada ARNm es poliadenilado generando así los ARNm maduros (21). Las unidades policistrónicas pueden contener múltiples copias de un gen en tándem, así como genes relacionados o no, entre sí (20).

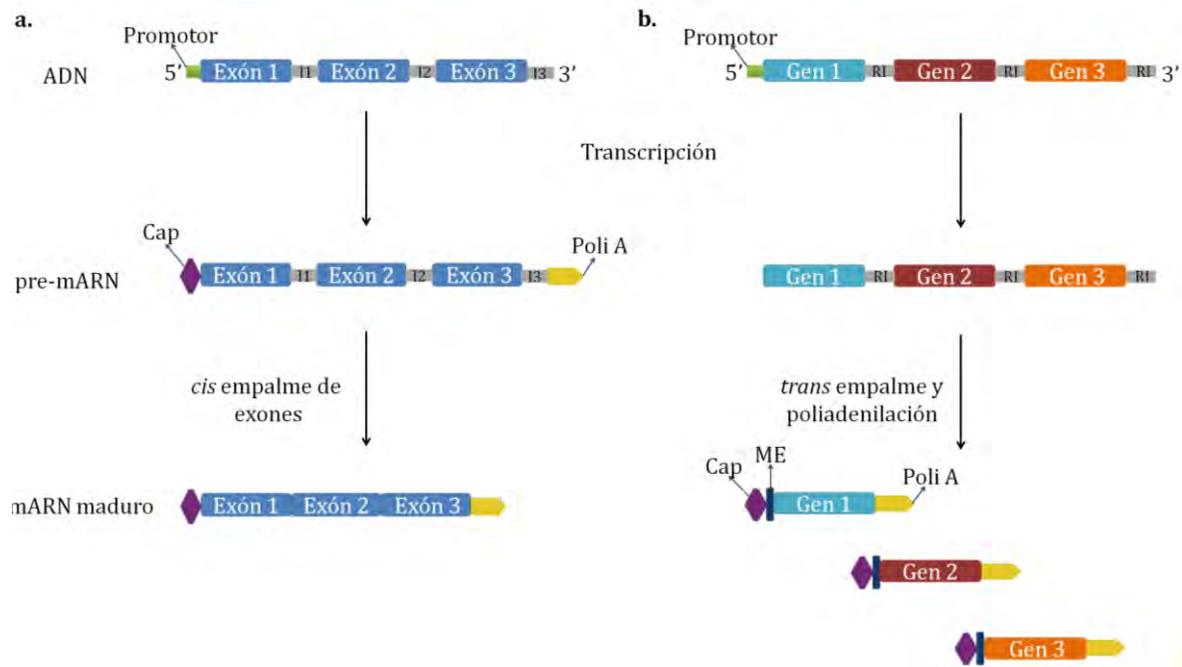


Figura 5. Diferencias entre la biogénesis del ARNm en *Leishmania* y otras eucariotas: **a.** biogénesis del ARNm en la mayoría de los organismos eucariotes mediante *cis*-empalme para eliminar las secuencias no codificadoras (intrones) de los transcritos primarios y, **b.** los tripanosomátidos generan transcritos monocistrónicos a partir del *trans*-empalme de las unidades de transcripción policistrónicas. En los tripanosomátidos la estructura cap es donada por un miniexón.

I: intrón, cap: residuo de 7-metilguanosa, poli A: sitio para la poliadenilación en el extremo 3' del transcrito; RI: región intergénica; ME: miniexón.

Modificado de Cortázar & Walker, 2004 (21).

Los procesos de *trans*-empalme y poliadenilación están mecánicamente acoplados y poseen señales reguladoras comunes ricas en polipirimidinas, dentro de las regiones intergénicas. La región intergénica 5' (5'-RI) posee un sitio AG que actúa como aceptor de la señal líder (SL), además, a pesar de la ausencia de las señales consenso específicas que aseguren la poliadenilación del ARNm en *Leishmania*, el extremo 3' de cada ARNm está poliadenilado a una distancia fija (100-400 nucleótidos) río arriba de las señales para el *trans*-empalme del ME del siguiente gen (22).

En la mayoría de los eucariontes los genes que codifican para proteínas son transcritos por la ARN polimerasa II (Pol II) (23), en contraste, en cepas de *Leishmania* no se ha identificado ningún promotor específico para Pol II. Es por tanto que en *Leishmania* los genes exógenos son integrados en el locus del ARNr río abajo del promotor ribosomal de la subunidad 18S para ser transcritos por la ARN polimerasa I (Pol I). El promotor de ARNr de la subunidad 18S de *L. chagasi* ha dirigido la sobreexpresión de proteínas funcionales con distintos grados de actividad entre las especies *L. donovani*, *L. major* y *L. mexicana*, pero carece de actividad en *T. cruzi*, sustentando una actividad especie-específica (24). Además, se ha estudiado que la transcripción de los genes a partir de vectores tampoco requiere de promotores para la Pol II (25). Los genes del ARNr de *Leishmania*, pueden ser inducidos constitutivamente y mostrar altos niveles de expresión de genes integrados exógenos, ya que se encuentran en múltiples *loci* y son repetidos en tándem en gran cantidad.

En comparación con otros eucariontes, los genes en tripanosomátidos carecen de intrones, sin embargo, se ha observado una dependencia importante sobre la presencia de las regiones intergénicas para la expresión de genes, lo cual sugiere que el rol de estas regiones se centra en la regulación de la transcripción y la maduración del ARNm (26). Es por esta razón, que cuando se desea la expresión transitoria de genes en *Leishmania* se emplean vectores de expresión circulares que contengan la secuencia del gen reportero flanqueado por regiones intergénicas endógenas del parásito (Figura 6). En los estudios de transfección de células de *Leishmania* reportados hasta la fecha, el producto génico se muestra activo y, en ocasiones, es necesario para la expresión del gen (27).

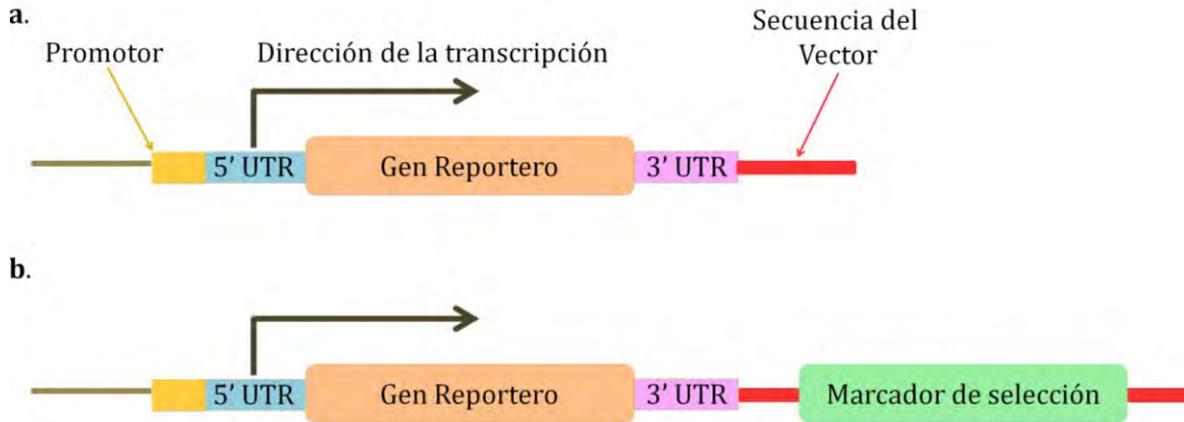


Figura 6. Vectores de expresión usados en la transfección de *Leishmania*. **a.** Vector de expresión con gen reportero y secuencias 5'- y 3'-UTR de *Leishmania* para transfecciones transitorias. La 3'-UTR de los genes de *Leishmania* posee las secuencias reguladoras de la expresión génica. **b.** Vector con marcador de selección para transfecciones permanentes. Modificado de Cortázar & Walker (2004).

Durante su ciclo de vida, *Leishmania* se mueve entre el tracto alimenticio de un insecto y en los fagolisosomas ácidos de los macrófagos de mamíferos. La habilidad para sobrevivir en ambientes diferentes depende de la regulación de una variación de genes. La regulación de los niveles de ARNm durante el desarrollo en *Leishmania* está determinada de manera postranscripcional y depende del procesamiento diferencial del ARNm en las 3'UTR (28). Es por tanto que se han encontrado secuencias que regulan la expresión génica en los diferentes estadios.

1.6 Expresión de Proteínas Recombinantes en *Leishmania tarentolae*

La transfección estable de genes exógenos en *Leishmania* se logra mediante la introducción de episomas o bien, por integración al genoma.

1.6.1 Transfección estable con episomas

Los episomas son vectores circulares de ADN autorreplicativos que contienen el gen de resistencia (marcador de selección), las secuencias intergénicas y el gen de interés o reportero. Las células transfectadas son seleccionadas basándose en la resistencia conferida por el marcador de selección, lo cual resulta en el aumento del número de copias del vector y del nivel de la expresión del gen reportero. Entre

los marcadores de selección más utilizados se encuentran los genes *neo*, *hyg*, y *nagt*, que codifican para las fosfotransferasas que confieren resistencia a los aminoglicósidos geneticina, higromicina B y tunikamicina, respectivamente. Otros marcadores como *sat*, que codifica estreptomicina acetiltransferasa, *pac* y *phleo* que confieren resistencia al antibiótico glicopéptido puromicina y fleomicina, respectivamente, han sido empleados en transfecciones de promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (29).

1.6.2 Transfección permanente por integración al genoma

Para realizar una transfección permanente por integración al genoma, el vector de expresión es linearizado con enzimas de restricción dentro de secuencias idénticas a las del sitio propuesto para la integración en el genoma. El vector es integrado en una región muda del genoma como los espaciadores del ARNr y del ME, o en el sitio correspondiente al gen a eliminar o complementar. Durante la integración de vectores en el genoma se deben tener en cuenta factores que influyen en la frecuencia de recombinación homóloga entre el vector introducido y las secuencias de ADN cromosómico, como son: la cantidad y naturaleza de secuencias homólogas, el locus genético, el número de copias del blanco y el diseño del vector. La divergencia entre las secuencias del ADN donador y el blanco reduce la eficiencia de la integración de genes en *Leishmania*.

El sistema de expresión reportado originalmente basado en *L. tarentolae* utilizó a la RNA Polimerasa I para la transcripción constitutiva de genes heterólogos integrados en el locus del gen 18S ARNr. Además, se describió un sistema de expresión inducible basado en la cepa transgénica *L. tarentolae* mediante los genes para la polimerasa T7 RNA y represión por tetraciclina (15). El vector comercial más utilizado en la expresión estable de proteínas recombinantes en *Leishmania* es el pLEXY-2 (Jena Bioscience®). Este vector permite la expresión de proteínas dianas con o sin péptido señal, permitiendo que el mismo vector pueda ser empleado para producir proteínas que permanecen en el citosol de la célula o para proteínas que deban ser secretadas al medio. Si la proteína se diseña con péptido señal, entonces se estimulará su salida de la célula, de lo

contrario, permanecerá en ella (30). La principal ventaja de *L. tarentolae* para expresar proteínas heterólogas es su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales en las proteínas dianas, tales como glicosilación (Figura 7) o fosforilación. *L. tarentolae* es el primer huésped eucariótico unicelular descrito para el uso biotecnológico que produce N-glicanos totalmente galactosilados (31).

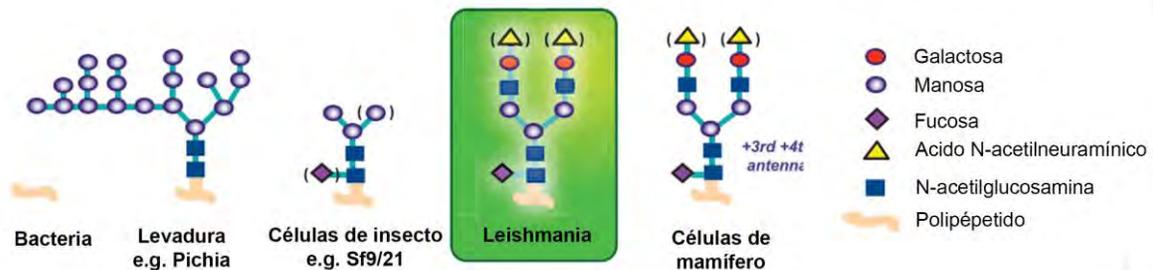


Figura 7. N-glicosilación de proteínas en *Leishmania* comparado con la glicosilación en otros sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Nótese que los patrones de glicosilación obtenidos en células de mamíferos y en *Leishmania* sólo difieren entre sí por la presencia de N-ácido acetilneuramínico en el extremo de las cadenas de azúcares terminales.

Hasta la fecha no existen trabajos publicados en México sobre la expresión de proteínas recombinantes en el sistema heterólogo de *L. tarentolae*, el cual es un sistema que tiene pocos años de emplearse como sistema de expresión, pero que ha mostrado buenos resultados cuando se manipula. Por ejemplo, es mediante este sistema que se han logrado obtener proteínas recombinantes como la proteína sAPP α , precursora del agente etiológico en la enfermedad de Alzheimer. En el estudio referido, se consiguió producir la proteína biológicamente activa y glicosilada cuando se expresó en *L. tarentolae*, en contraste con su expresión en *E. coli*, donde no se obtuvo una proteína activa ni con glicosilaciones (30).

1.7 Expresión Recombinante de la Silicateína

Hasta la fecha ha resultado difícil la obtención de la silicateína activa cuando ésta se ha expresado de forma recombinante o purificado del organismo nativo, debido a los bajos niveles de expresión de la proteína y a la formación de cuerpos de inclusión difíciles de replegar cuando la proteína se expresa en un sistema procarionte como lo es *Escherichia coli* (32). El problema se debe a la incapacidad de las células de *E. coli*, y de otras ya probadas (*P. pastoris*), a plegar correctamente la proteína.

El presente estudio se enfocó en la clonación del gen de la silicateína en sistemas de expresión que favorecieran el correcto plegamiento, y por ende, la expresión de la silicateína en forma activa y soluble. La introducción del sistema novedoso de expresión *L. tarentolae* para la obtención de la silicateína fue pensada debido a los éxitos ya documentados de este sistema sobre proteínas que también habían presentado dificultades para su expresión en los sistemas de expresión convencionales. El efecto que supone contar con la silicateína activa es de gran trascendencia, ya que esta enzima podrá ser parte fundamental para el desarrollo de proyectos que busquen implementar rutas alternas para la producción y aplicación de tecnologías más limpias en múltiples disciplinas. De esta manera, el propósito último de este trabajo es promover el desarrollo de biomateriales que reemplacen poco a poco los materiales sintéticos, los cuales se han convertido en un problema mayoritario en cuanto a su fabricación, deposición, desecho y reciclaje.

2. HIPÓTESIS

Si se expresa a la silicateína en un sistema de expresión heterólogo que cuente con componentes capaces de asistir el plegamiento correcto de la proteína, se obtendrá a la silicateína en su conformación nativa para realizar ensayos estructurales y funcionales. Para ello, se dispondrá de dos sistemas de expresión, siendo uno de ellos una cepa de *Escherichia coli* capaz de sobreexpresar chaperonas y, por otro lado, la cepa P10 de *Leishmania tarentolae*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Desarrollar cepas transgénicas capaces de expresar a la silicateína- α de la esponja marina *Tethya aurantia* mediante técnicas de Ingeniería Genética y de ADN recombinante.

3.2 Objetivos Específicos

1. Sobreexpresar la silicateína- α como propéptido (enzima no madura) y como enzima madura en células de *Escherichia coli* capaces de sobreexpresar simultáneamente chaperonas.
2. Generar cepas transgénicas de *Leishmania tarentolae* capaces de sobreexpresar tanto al dominio catalítico como al propéptido de la enzima silicateína- α .

4. METODOLOGÍAS

4.1 Materiales y reactivos químicos

Las enzimas de restricción empleadas se obtuvieron de New England BioLabs® y Fermentas®. En los casos en donde se realizaron reacciones de doble digestión, ambas enzimas provinieron de la misma compañía utilizando el amortiguador compatible sugerido por el proveedor. La ADN ligasa T4 y su amortiguador correspondiente se obtuvo de New England BioLabs. La mezcla ADN *Taq* Polimerasa lista para usar se obtuvo de Fermentas. El conjunto de soluciones para extracción de ADN: ADN miniprep, purificación de PCR y extracción de gel se adquirieron de la compañía QIAGEN®. Las soluciones utilizadas a lo largo de este trabajo se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Soluciones y amortiguadores de pH.

Solución	Componentes
Amortiguador de carga Naranja G 6X (Electroforesis Agarosa)	0.1 % Naranja G, 40 % sacarosa.
Amortiguador de corrida SDS-PAGE	25 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM glicina, 0.1 % SDS (dodecil sulfato de sodio).
Amortiguador de corrida TBE (Electroforesis de agarosa)	89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA.
Amortiguador de lisis <i>E. coli</i>	50 mM Tris-HCl pH 7.4, 30 mM NaCl, 10 mM β-mercapto etanol, 20 mM imidazol, cóctel de inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche®).
Buffer de carga SDS-PAGE reductor	50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 12.5 mM EDTA, 0.02 % azul de bromofenol.
Buffer de transferencia	25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.1 % SDS (dodecil sulfato de sodio), 10% (v/v) metanol.
Buffer TBS	100 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 8

Buffer TBST	100 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05 % Tween, pH 8
IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido)	1 M IPTG, esterilizado por filtración.
Solución de trabajo de ampicilina 1000X	100 mg/ml de ampicilina, solución esterilizada por filtración.
Solución de trabajo de cloranfenicol 1000X	50 mg/ml de cloranfenicol, solución esterilizada por filtración.
Solución de trabajo de kanamicina 1000X	50 mg/ml de kanamicina, solución esterilizada por filtración.
Solución de trabajo de tetraciclina 1000X	100 mg/ml de tetraciclina, solución esterilizada por filtración.
Solución fijadora PAGE	10 % ácido acético, 40 % etanol.
Solución teñidora PAGE	1 % Azul de Coomassie R-250, 89 mM ácido acético, 40 % etanol.

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se encuentra descrita en la Tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los medios de cultivos empleados.

Medio	Componentes
BHI (LEXSY® KIT)	Medio de cultivo complejo en polvo con infusión cerebro y corazón para <i>L. tarentolae</i> .
LB (Luria-Bertani)	Medio de cultivo con: 1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.5 % NaCl para <i>E. coli</i> .
LB (Luria-Bertani) agar	Medio de cultivo con: 1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.5 % NaCl, 2 % agar para <i>E. coli</i> en caja petri.

Para la expresión constitutiva de la silicateína en *Leishmania tarentolae* se adquirió el kit comercial de Jena Bioscience que contenía: cepa LEXSY P10, LEXSY BHI Medio en Polvo (medio rico de cultivo de infusión cerebro corazón),

Hemina 500X (esencial para el crecimiento de *L. tarentolae*), Pen-Strep 200X (mezcla de antibióticos de penicilina y estreptomicina, para evitar contaminación por bacterias), NTC 1000X (nourseotricina, antibiótico de selección para clonas transformantes de *L. tarentolae*).

4.2 Trabajo Experimental

4.2.1 Metodologías para la Expresión de la Silicateína en células de *E. coli*

La obtención de la silicateína se inició con la expresión en células de *E. coli* capaces de sobreexpresar chaperonas (14).

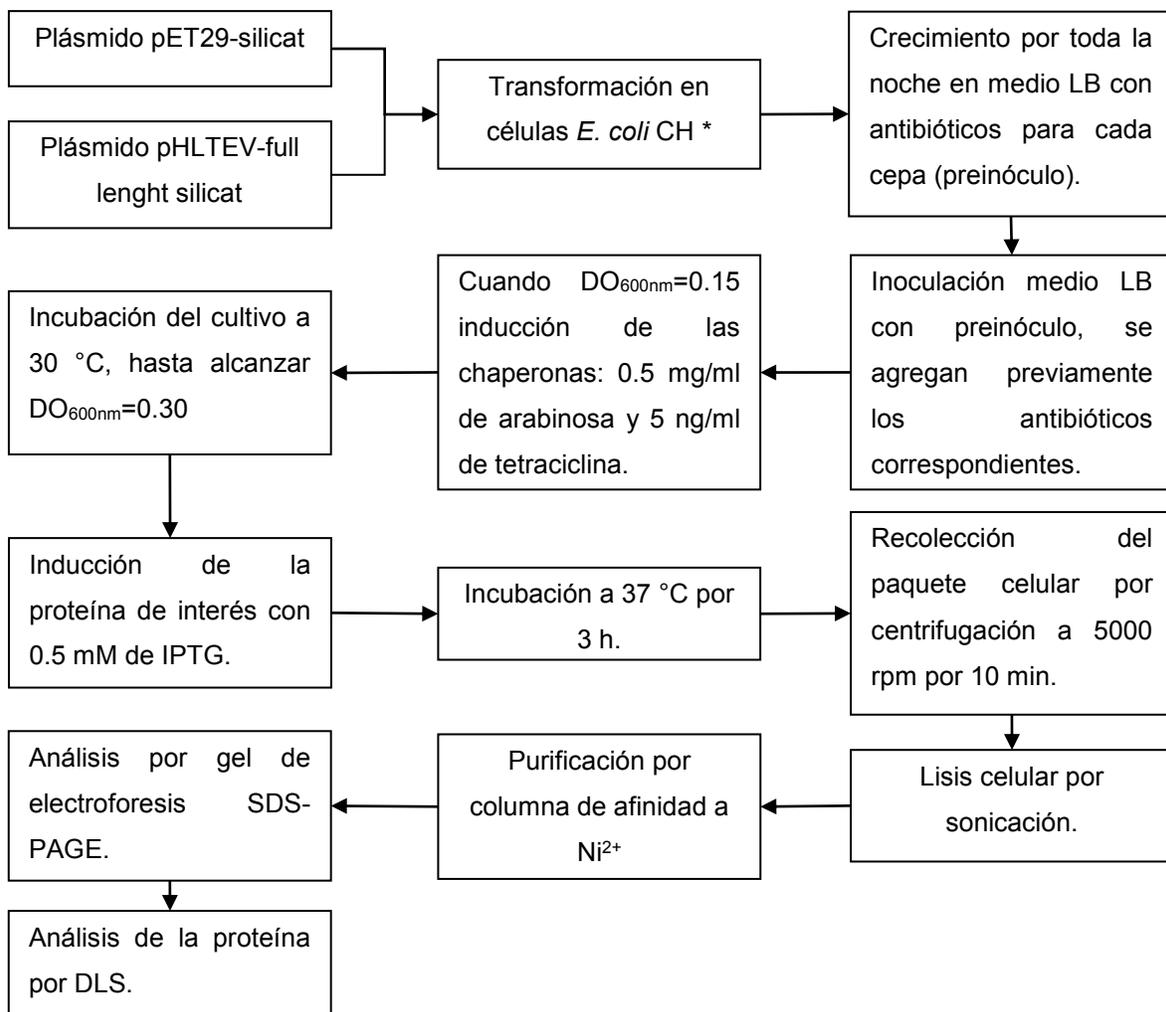


Diagrama 1. Panorama general de la metodología llevada a cabo para expresar a la silicateína- α en células de *E. coli* capaces de sobre-expresar simultáneamente chaperonas.

* *E. coli* CH: células competentes de *Escherichia coli* con el plásmido pG-KJE6 para la expresión de los dos grupos de chaperonas: dnaK –dnaJ –grpE y groES –groEL.

Para la expresión de la silicateína en sus dos diferentes formas: como propéptido (inactiva) y como la enzima madura (activa), se emplearon dos diferentes plásmidos, el plásmido pHLTEV se ocupó para la expresión de la prosilicateína y el plásmido pET29 se destinó para la silicateína dominio catalítico, las denominaciones de cada plásmido se adaptaron al gen contenido.

Para el plásmido pET29-silicat se empleó kanamicina como antibiótico de selección, y ampicilina para el plásmido pHLTEV-prosilicat. Estos plásmidos fueron transformados en células competentes de *E. coli*, que ya contenían el plásmido pG-KJE6 para la expresión de los dos diferentes grupos de chaperonas de *E. coli* (Tabla 4 y Figura 8). El plásmido pG-KJE6 contiene como marcador de selección la resistencia al antibiótico cloranfenicol, por lo que para la selección de transformantes se utilizó la resistencia a los antibióticos: cloranfenicol–kanamicina y cloranfenicol–ampicilina, según el caso. Los tiempos de inducción y los reactivos empleados para la expresión de los dos grupos de chaperonas se realizaron conforme a lo reportado por Nishihara *et al.*, donde la adición de arabinosa se llevó a cabo para el grupo de chaperonas dnaK-dnaJ-grpE, y para el caso del grupo groES-groEL, se adicionó el antibiótico tetraciclina (14) (Tabla 4).

Tabla 4. Regiones relevantes para la selección y control de la expresión presentes en el plásmido pG-KJE6.

Plásmido	Promotor	Genes Codificadores	Gen Regulador	Antibiótico de Resistencia
pG-KJE6	araB _p	dnaK – dnaJ – grpE	araC	Kanamicina
	Pzt-1 _p	groES – groEL	tetR	

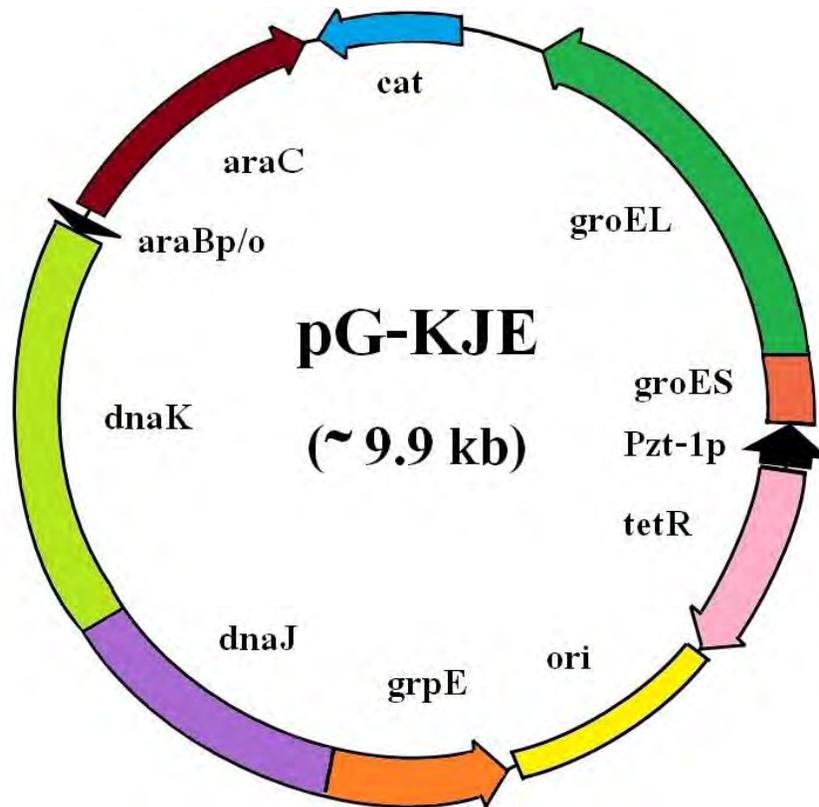


Figura 8. Representación del plásmido pG-KJE6 para la expresión de chaperonas de *E. coli* (14).

Posterior a la adición de los inductores de chaperonas, se incubaron ambas cepas a 30 °C, a 180 rpm. Esto se realizó para cada uno de los cultivos, hasta que alcanzaron una $O.D._{600nm}=0.3$. A continuación se indujo la proteína de interés mediante la adición de IPTG y se incubó a 37 °C, a partir de ese momento se tomó muestra cada hora del cultivo para la detección de proteína por geles SDS- PAGE, hasta las tres horas transcurridas. Por último, se realizó la detección de proteína mediante geles SDS-PAGE de poliacrilamida, con y sin purificación del lisado por columna de afinidad de níquel. Asimismo, se realizó el análisis por Western blot, y finalmente, se llevó a cabo el estudio de la proteína por DLS.

4.2.2 Metodologías para la Expresión de la Silicateína en *L. tarentolae*

En la construcción de la cepa transgénica de *Leishmania tarentolae* para la sobreexpresión de la silicateína se realizó el procedimiento descrito en el Diagrama 2.

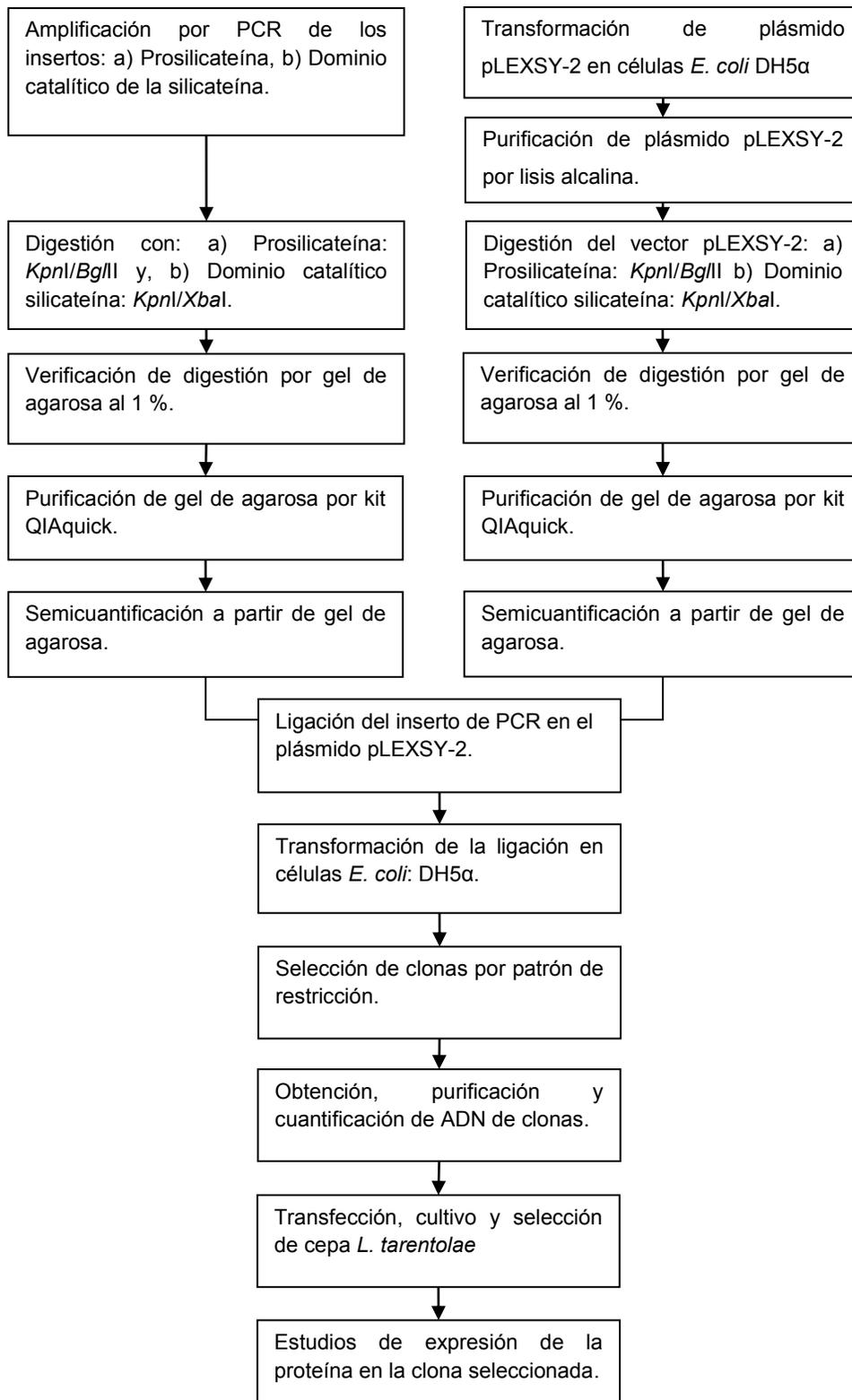


Diagrama 2. Esquema general para la construcción de una cepa transgénica de *Leishmania tarentolae* para la expresión de la silicateína- α .

Se obtuvieron los amplicones con las secuencias codificantes del propéptido y el dominio catalítico de la silicateína mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuya composición se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidades de los reactivos y enzimas empleados para la reacción en cadena de la polimerasa.

Reactivo	Prosilicateína	Dominio Catalítico
Oligo Silicateína-5 (10 μ M)	1 μ l	–
Oligo Silicateína-6 (10 μ M)	1 μ l	1 μ l
Oligo-Silicateína-7 (10 μ M)	–	1 μ l
Plásmido pBSK-G5S0116 (20 ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l
Master Mix 2X (Fermentas)	22 μ l	22 μ l
H ₂ O	22 μ l	22 μ l
Volumen Final	50 μ l	50 μ l
Amplicón esperado	950 pb	663 pb

El termociclador para realizar la PCR se programó con las condiciones mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones para realizar la PCR correspondiente a la amplificación de los insertos del propéptido y el dominio catalítico de la silicateína.

	Temperatura (°C)	Tiempo
30 ciclos	95	5 min
	95	30 s
	60	30 s
	72	1 min

Una vez obtenidos los insertos, estos se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes a cada uno de ellos y, consecutivamente, se purificaron a partir de gel de agarosa (Tabla 7).

A la par de estos experimentos, se realizó la transformación del plásmido pLEXSY-sat2 en células de *E. coli* DH5 α para su obtención (Figura 9) mediante lisis alcalina. El ADN plasmídico también fue digerido con el par de enzimas correspondientes descritas en la Tabla 7.

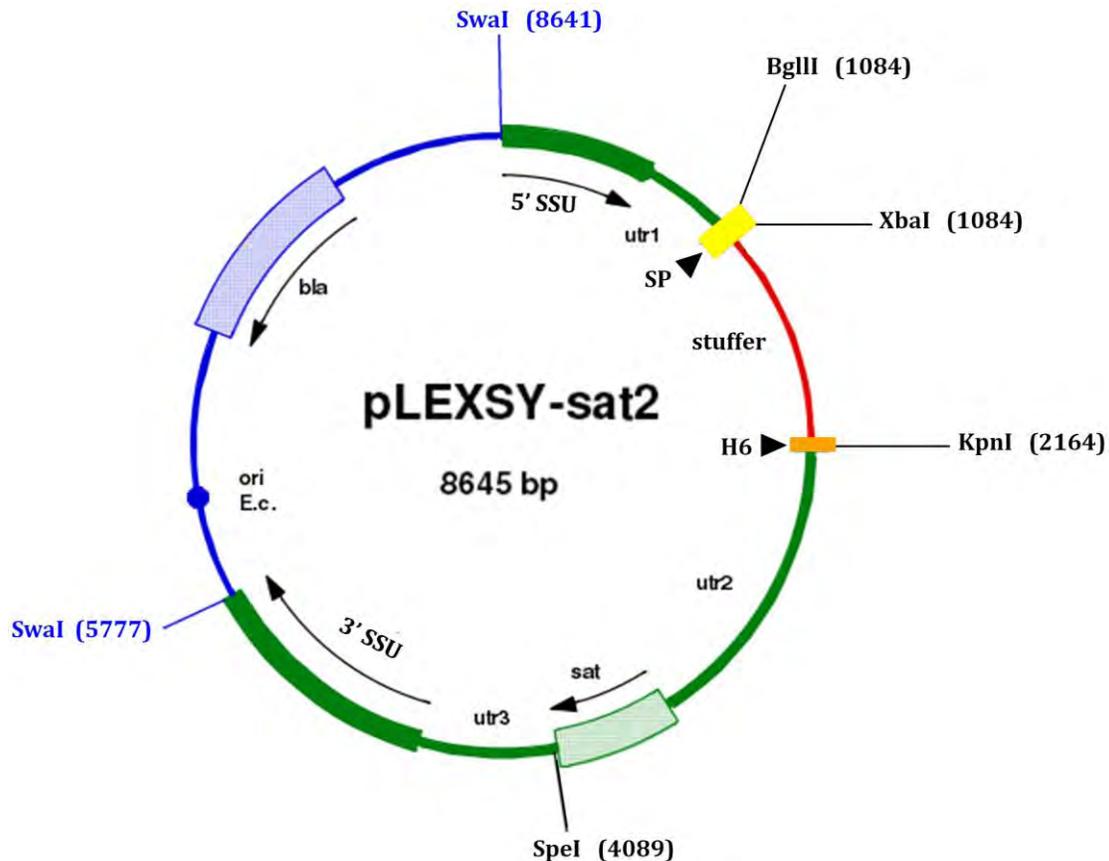


Figura 9. Mapa del vector de expresión pLEXSY-sat2 empleado para la transfección en *Leishmania tarentolae*. Se muestra en color rojo el fragmento de ADN que es reemplazado por el gen de interés. 5'ssu y 3'ssu son regiones para la recombinación homóloga en el cromosoma de *L. tarentolae*. Los sitios de corte de *SwaI* linearizan el vector, además de remover las regiones regulatorias de *E. coli*. UTR1: región no transcrita de 0.4k-IR del gene *aprt* de *L. tarentolae*. UTR2 y UTR3: regiones no transcrita de 1.4k-IR y 1.7k-IR, respectivamente, del gene *cambB* de *L. tarentolae*. Son regiones no traducidas que proveen las señales de splicing para el procesamiento postranscripcional de la expresión de genes diana y marcadores en la cepa LEXSY P10. SP (amarillo): péptido señal para la secreción de la fosfatasa LMSAP1 de *L. mexicana*. H6 (naranja): región con seis histidinas.

Tabla 7. Enzimas empleadas para la digestión de los genes de la prosilicateína y la silicateína dominio catafítico.

Construcción	Extremo	Enzimas
Prosilicateína	5'	<i>Bgl</i> II
	3'	<i>Kpn</i> I
Silicateína	5'	<i>Xba</i> I
	3'	<i>Kpn</i> I

Los amplicones de ADN digeridos correspondientes a la secuencia codificante de la prosilicateína y el dominio catalítico de la silicateína, así como, el plásmido pLEXY-sat2, se utilizaron en la reacción de ligación de acuerdo con lo que se muestra más adelante en la Tabla 9.

La reacción de ligación se llevó a cabo a 4 °C por 16 h. Posterior a esto, se realizó la transformación en células *E. coli* DH5α y se plaqueó en cajas petri incubadas a 37 °C por 16 h. A continuación se extrajo el ADN plasmídico de colonias seleccionadas por lisis alcalina y se hizo el escrutinio de las transformantes por medio de la digestión con la enzima *Xcm*I. Se secuenció el ADN de las posibles clonas transformantes para su confirmación y posterior a ello se purificó y cuantificó para su transfección a células de *Leishmania tarentolae*. Dichas células fueron cultivadas en medio líquido BHI, teniendo en consideración que *Leishmania tarentolae* crece en oscuridad a 26 °C bajo condiciones aerobias. La hemina es esencial para el metabolismo de *L. tarentolae*, por lo que se añadió al medio. También se adicionaron los antibióticos penicilina y estreptomina para prevenir contaminación por bacterias y/o levaduras. La velocidad de crecimiento, así como la densidad del cultivo se comporta de manera proporcional al suministro de oxígeno, entre mayor sea el área de contacto con el oxígeno, mayor número de células en contacto con éste, y mayor la velocidad de crecimiento, lo que da lugar a una mayor densidad de cultivo. Más adelante, en la sección de metodologías 4.2.5 se detalla el protocolo seguido para la transfección, selección y cultivo de *L. tarentoale*.

4.2.3 Métodos Generales de Biología Molecular

4.2.3.1 Manipulación de ADN

Células de *E. coli* DH5 α previamente transformadas con el plásmido deseado se inocularon en 3-5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se crecieron toda la noche a 37 °C con agitación a 200-250 rpm. El ADN plasmídico se extrajo mediante el método de lisis alcalina (33), o mediante Qiagen® Miniprep Spin Kit de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

4.2.3.2 Digestión de ADN por endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción, también llamadas enzimas de restricción, cortan la doble hebra del ADN sólo si reconocen una secuencia seleccionada. Las endonucleasas de restricción son de origen bacteriano y normalmente cortan la doble hebra de ADN en puntos característicos que a menudo presentan secuencias palindrómicas de cuatro, seis u ocho nucleótidos de longitud.

Las enzimas de restricción fueron utilizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante: usando el amortiguador y tiempo de incubación indicados para cada enzima. Típicamente 1 U de enzima por 1 μ g de ADN de doble cadena. En general, todas las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 40-50 μ l.

4.2.3.3 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las secuencias de ADN se amplificaron usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En esta técnica, la muestra de ADN se separa en sus cadenas sencillas y se incuba con ADN polimerasa, dNTP y dos cebadores de oligonucleótidos cuyas secuencias flanquean el segmento de ADN de interés. En cada ciclo, las dos cadenas de ADN se separan por calor, los cebadores se aparean con sus segmentos de ADN complementarios y la ADN polimerasa dirige la síntesis de las cadenas complementarias. El uso de una ADN polimerasa estable frente al calor como la polimerasa Taq aislada del *Thermus aquaticus*, una

bacteria que prolifera a 75 °C, elimina la necesidad de agregar enzima fresca luego de cada ciclo de calentamiento (el calor inactiva la mayoría de las enzimas). Así, en presencia de cantidades suficientes de cebadores y dNTP, la PCR se lleva a cabo simplemente al variar la temperatura de manera cíclica. Con veinte ciclos de PCR se incrementa la cantidad de la secuencia diana en aproximadamente un millón de veces ($\sim 2^{20}$) con especificidad elevada.

El kit ocupado de *ADN Polimerasa Taq: mezcla de reacción lista para usarse* contenía: 0.05 U/ μ L de la enzima, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), se agregó 10-50 ng de templado y 0.4 μ M de cada oligonucleótido. Para la amplificación del gen de interés para la expresión de la silicateína se diseñaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 8. Considerando que las dos construcciones coinciden en su secuencia terminal sólo se diseñaron tres oligonucleótidos.

Tabla 8. Oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para la amplificación de las diferentes construcciones del gen de la silicateína.

Oligo	Secuencia (5'-3')	Sitio	Especificaciones
Silicateína-5	GAAGATCTACCATGCCTCAGTACGAGTTCAA GG	<i>Bgl</i> III	Oligo para amplificar la región 5' de la secuencia codificante de la prosilicateína .
Silicateína-6	CGGGGTACCCAATGTAGGAAGAAGCATCAC	<i>Xba</i> I	Oligo para amplificar la región 5' de la secuencia codificantes del dominio catalítico de la silicateína.
Silicateína-7	GCTCTAGAGCCTACCAGAGACAGTCG	<i>Kpn</i> I	Oligo para amplificar la región 3' de la secuencia codificante de la prosilicateína y del dominio catalítico de la silicateína .

Los oligonucleótidos se mandaron sintetizar en la compañía Sigma-Aldrich®.

4.2.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Geles de agarosa de alto punto de fusión se prepararon en amortiguador TBE 1X a una concentración final de 1 % (m/v). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se cubrieron con el amortiguador TBE 1X. Las muestras de ADN a analizar se prepararon con al menos 1/6 de amortiguador de carga Naranja G (0.1% naranja G, 40 % sacarosa). Las muestras se cargaron en los pozos y se corrieron a 90 V por 45 min. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz UV.

4.2.3.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Fragmentos de ADN de doble cadena generados por PCR o digestión con enzimas de restricción se purificaron de geles de agarosa antes de la ligación. Dichos fragmentos de ADN se cortaron y purificaron utilizando el Qiagen® Gel Extraction Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.2.3.6 Ligación de ADN

La ligación de los fragmentos de ADN (inserto y vector) se realizó con la ADN ligasa T4. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl con las características descritas en la Tabla 9.

Tabla 9. Reactivos y enzimas para llevar a cabo la reacción de ligación del gen que expresa para la pro-silicateína y una reacción control.

Reactivo	Ligación (µl)	Ligación control (µl)
Buffer T4 Ligasa (10X)	1.0	1.0
T4 Ligasa enzima (40 U/µl)	1.0	1.0
Inserto PCR Pro-silicateína (70 ng/ml)	3.2	–
Vector pLEXSYS-2 Pro-silicateína (50 ng/ml)	4.0	4.0
H ₂ O _{dd}	c.b.p 10.0	c.b.p. 10.0

4.2.4 Métodos Generales de Bioquímica de Proteínas

4.2.4.1 Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) es utilizada para separar proteínas mediante la aplicación de un campo eléctrico en la presencia del detergente dodecil-sulfato de sodio (SDS). El SDS desnaturiza a las proteínas y les brinda una carga neta negativa, por lo tanto, cuando las proteínas son sometidas a la fuerza de un campo eléctrico en presencia de este detergente, estas se desplazan hacia el ánodo. La rapidez con la que una proteína se desplaza en el gel depende principalmente de dos factores: a) el peso molecular de la proteína, una proteína con un peso molecular pequeño correrá más rápido que una con mayor peso molecular y, b) el tamaño de los poros de gel de poliacrilamida, cuanto más concentrado se encuentre el gel de poliacrilamida, mayor dificultad tendrán las proteínas para moverse en él, y por tanto, será menor la separación entre ellas. Las proteínas separadas por SDS-PAGE son visualizadas mediante la formación de un complejo colorido con azul de Coomassie o por tinción con plata.

4.2.4.2 Tinción de geles de poliacrilamida con Azul de Coomasie

Se colocó el gel en un recipiente de plástico o vidrio y se añadieron aproximadamente 5 volúmenes de 0.25 % Coomasie Azul Brillante en 50 % de ácido tricloroacético (TCA). Se incubó a temperatura ambiente por 20 min con agitación y se drenó el colorante y se almacenó nuevamente (se puede emplear para numerosas tinciones). Se lavó el gel con agua para remover el colorante que no penetró en el gel. Se añadieron grandes volúmenes de solución desteñidora (25 % metanol, 7 % ácido acético) y se cambió cuando fue necesario. La sensibilidad de esta tinción es de 1.0 µg de proteína.

4.2.4.3 Western blot

La técnica de Western blot, también conocida como inmunoblotting, es usada para detectar antígenos de proteínas después de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con una subsecuente transferencia a un soporte sólido. La transferencia a este soporte sólido fija a la proteína y permite la presentación del epítipo que es reconocido por un anticuerpo específico. El paso inicial de un Western blot es la transferencia de las proteínas de un gel de poliacrilamida a un soporte sólido, el cual puede ser una membrana de nitrocelulosa o PVDF (poli-vinil di-fluoruro) que las inmoviliza, haciendo a las proteínas accesibles a un ensayo inmunológico. A continuación se bloquea la membrana con una proteína inerte al ensayo para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos que se van a utilizar en la detección. En este paso comúnmente se emplean las proteínas presentes en la leche en polvo. Posteriormente, se aplica el anticuerpo específico fusionado a una enzima capaz de producir un producto detectable.

Las proteínas en estudio fueron separados en un gel al 12 % de poliacrilamida mediante electroforesis SDS-PAGE. La electroforesis se corrió a 15 volts durante 1 hora. A continuación se resumen las diferentes etapas que se realizaron para la técnica de Western blot usando como membrana PVDF. Se equilibró el gel de poliacrilamida y la membrana en Buffer de Transferencia. Se preparó un sándwich consistente en: papel filtro/ PVDF / gel / papel filtro, eliminando las burbujas de aire en el sándwich mediante desplazamiento con un rodillo. La transferencia electroforética se llevó a cabo a 200 mA por 1 hora (cámara electroforética BioRad®). Posteriormente, se lavó la membrana con Buffer TBS en agitación constante. Se bloqueó la membrana con solución 5 % de leche desengrasada en TBS por 24 horas, a 4 °C. A continuación, la membrana se lavó exhaustivamente con Buffer TBS. Se adicionó el anticuerpo conjugado (se empleó el anticuerpo Anti-His conjugado a la enzima peroxidasa de rábano HRP, dilución 1:1000, adquirido de la compañía Santa Cruz®), y se incubó por 1 hora en agitación constante. Consecutivamente, se lavó cuatro veces la membrana con Buffer TBST

y se incubó la membrana con sustrato quimioluminiscente. Para finalizar, se expuso una película radiográfica con la membrana.

4.2.4.4 Tinción de geles de poliacrilamida con sales de plata

Existen numerosos métodos para teñir proteínas con sales de plata después de la separación por SDS-PAGE. En todos los casos, los procesos se basan en una reducción diferencial de los iones de plata, los cuales se unen a las cadenas laterales de los aminoácidos. Estos métodos se pueden clasificar en dos tipos: aquellos donde se emplean soluciones de plata amoniacal y los que utilizan nitrato de plata. Ambas metodologías son 100 a 1000 más sensibles que la tinción por Azul de Coomassie R250, y son capaces de detectar cantidades tan pequeñas como 0.1 a 1.0 ng de proteína en un sola banda. Las soluciones de nitrato de plata son más sencillas de preparar, y en comparación con las sales de plata amoniacal, estas no generan subproductos potencialmente explosivos. El método descrito a continuación es una modificación del procedimiento descrito por Sammos *et al.* (1981) y perfeccionado por Schoenle *et al.* (1984).

Se corrió una electroforesis SDS-PAGE para separar a las proteínas en estudio. El gel se fijó incubando por 4 a 12 horas a temperatura ambiente, con agitación suave en al menos 5 volúmenes de una solución de etanol: ácido acético glacial: agua (30:10:60 % v/v). Se descartó la solución fijadora, y se añadieron al menos 5 volúmenes de 30 % etanol. El gel se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Subsecuentemente, se añadieron 10 volúmenes de agua destilada y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. El lavado con agua se repitió un par de veces. El último lavado con agua se descartó y, usando guantes, se añadieron 5 volúmenes de una solución 0.1 % de AgNO₃. El gel se incubó en esta disolución por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La solución de AgNO₃ se descartó y se realizaron lavados de ambos lados del gel (20 segundos cada uno) bajo chorro de agua destilada. Se añadieron 5 volúmenes de una solución acuosa con 2.5 % de carbonato de sodio, 0.02 % formaldehído y se incubó el gel a temperatura ambiente con agitación suave. Las bandas coloridas de la proteína aparecieron en pocos minutos. Se

continuó la incubación hasta obtener el contraste deseado. La reacción se detuvo al lavar el gel con 1 % de ácido acético por pocos minutos. Posteriormente se lavó el gel repetidamente con agua destilada (10 minutos cada lavado). El gel se secó para preservarlo.

4.2.4.5 Zimograma

La zimografía es conocida como una técnica electroforética, comúnmente basada en SDS-PAGE, la cual contiene un sustrato copolimerizado dentro de la matriz de poliacrilamida para la detección de actividad enzimática. Las muestras son normalmente preparadas en el buffer SDS-PAGE, bajo condiciones no desnaturalizantes, ya sea por aplicación de calor o por agentes reductores (2-mercapto-etanol o ditioneitol [DTT]). Después de la corrida, el buffer SDS es removido del gel por incubación en una solución de Tritón 100X (o un detergente similar), seguida de una incubación en un buffer de activación apropiado, por el tiempo y temperatura óptima para el tipo de enzima estudiada y el sustrato ocupado para ser degradado. El zimograma es posteriormente teñido, y las áreas donde hubo reacción catalítica son diferenciadas. Cuando la actividad enzimática a detectar es de proteasa el sustrato que se usa es gelatina para la copolimerización del gel. Para el caso específico de este estudio, la silicateína tiene actividad promiscua de proteasa, por lo cual, se empleó gelatina como sustrato. En este caso, la visualización de la actividad enzimática se logra al observar bandas más claras dentro de un fondo azul, después de teñirse con Azul de Coomasie.

Se preparó solución de 1 % gelatina porcina (Sigma, G2625) en agua destilada, y se mantuvo caliente para evitar la gelificación. Se preparó el gel separador al 12 %, reemplazando el volumen de agua con la solución de gelatina a una concentración final de 0.1 %. La disolución se mezcló y se transfirió rápidamente entre las placas para formar el gel. Los pasos subsecuentes realizados fueron los mismos realizados para los geles SDS-PAGE. Se agregó el mismo volumen de buffer de carga 2X. No se calentó en ningún momento. Los controles usados son los siguientes:

- i. Muestra + inhibidor de proteasas
- ii. Muestra + β -mercaptoetanol
- iii. Marcador de Peso Molecular

La electroforesis se realizó a 100 V por 2.5 horas a 4 °C. Se procedió a la eliminación de SDS, ya que el uso de SDS en el gel puede interferir con la actividad de la proteasa, por lo que es removido mediante dos lavados de 15 min con una disolución 2.5 % (v/v) Triton 100X. Se incubó el gel en una disolución que favorece la actividad de las proteasas (0.1 M glicina, 5 mM CaCl₂, 0.2 mM ZnCl₂) por 24 horas a 37 °C. El gel se fijó con una disolución al 10 % metanol y 10 % ácido acético durante 30 min. El gel se tiñó con una disolución 0.025 % Azul de Coomassie G250 durante 4 horas. Se decantó el sobrenadante y lavó con agua para quitar el exceso de colorante. La presencia de bandas claras indicó la degradación de la gelatina y por ende la actividad proteolítica.

4.2.4.6 Purificación por afinidad a una columna con iones Ni²⁺

Esta técnica funciona permitiendo que las proteínas con afinidad por iones metálicos sean retenidas en una columna que contiene iones metálicos inmovilizados, níquel en este caso. Muchas proteínas de origen natural no tienen una afinidad por iones metálicos, por lo tanto, mediante técnicas de ADN recombinante se introduce en la secuencia una 'etiqueta' consistente en seis o más residuos de histidina consecutivos en el extremo carboxilo o amino terminal de la proteína. El soporte de la resina consiste en agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético, el cual actúa como quelante de los iones de níquel divalente (Ni²⁺). De esta forma los iones de Ni²⁺ quedan unidos por cuatro enlaces a la columna, haciendo muy difícil su desprendimiento. A través de los dos enlaces restantes, se unen las proteínas con las colas de histidina que se quieren purificar.

Una vez obtenido el extracto crudo filtrado a través de una membrana de diámetro de poro de 0.45 μ m, se aplicó a una cromatografía de afinidad con una resina cargada con níquel como fase estacionaria. El hexapéptido de histidinas añadido a la proteína presenta afinidad por el níquel, lo que permite su retención en la

columna Ni²⁺ His Trap (Invitrogen®). La posterior elución se logra mediante la adición de dos volúmenes de columna de buffer de elución, precedida de lavados con buffer de lisis (25 mM Tris, 300 mM NaCl, 25 mM imidazol, pH 8) correspondiente a 4 volúmenes de columna. El buffer de elución difiere con el buffer de lisis únicamente en la concentración de imidazol, ya que el primero contiene 250 mM. La alta concentración de imidazol favorece el equilibrio imidazol-columna sobre el equilibrio histidina-columna desplazando así a la proteína recombinante.

4.2.4.7 Purificación por precipitación por salado

El fundamento de este método se basa en la reducción de la solubilidad de las proteínas en presencia de fuerzas iónicas altas. Este efecto, conocido como salting out (reducción de la solubilidad por sales), es resultado de la competencia por las moléculas de solvatación entre los iones salinos agregados y los otros solutos disueltos (proteínas). A concentraciones salinas elevadas, el disolvente solvata preferentemente a los iones de sal agregada y se torna insuficiente para solvatar a los otros solutos presentes en la disolución (proteína). Sin la presencia de las moléculas del disolvente rodeando a las moléculas de las proteínas presentes, las interacciones entre las moléculas de proteínas se favorecen, produciendo la precipitación de las proteínas, y otros solutos no disueltos presentes. La solubilidad de distintas proteínas varía considerablemente en función de la concentración salina, por ejemplo, a una fuerza iónica de 3, el fibrinógeno es mucho menos soluble que las proteínas mioglobina, hemoglobina y seroalbúmina. Debido a que diferentes proteínas precipitan a diferentes concentraciones de sales, la técnica de reducción de la solubilidad es la base de uno de los procedimientos más utilizados para la purificación de proteínas. Así, mediante el ajuste de la concentración de sal de una solución que contiene una mezcla de proteínas, justo por debajo del punto de precipitación de la proteína a ser purificada, se eliminan muchas de las proteínas no deseadas de la solución. El sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄, es el compuesto más usado debido a su elevada solubilidad (3.9 M a 0 °C). Una de las ventajas de este método es que los iones

que reducen la solubilidad de la proteína estabilizan sus estructuras nativas, de manera que las proteínas no sufren desnaturalización (34). El pH puede ajustarse aproximadamente en el punto isoeléctrico (pI) de la proteína deseada, ya que esta es menos soluble cuando su carga neta es cero.

4.2.4.8 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) mide las fluctuaciones de la intensidad de luz difractada debido al movimiento browniano de las partículas con respecto al tiempo. Al incidir un haz de luz monocromático, tal como un láser, a una solución con partículas en movimiento browniano, se observa el efecto Doppler. Cuando la luz golpea a la partícula, la longitud de onda de la luz difractada cambia con respecto al tiempo (fluctuación). La intensidad de luz difractada fluctuará dependiendo del tamaño de partícula, siendo las partículas pequeñas las que causen mayor número de fluctuaciones que las de mayor tamaño. Utilizando diversos algoritmos matemáticos y aproximaciones (las partículas rígidas son de forma esférica) se puede correlacionar esta variación de la intensidad con el coeficiente de difusión y el tamaño hidrodinámico de las partículas. Los parámetros a considerar se pueden observar en la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Donde se observa que el radio hidrodinámico (R_H) depende de la temperatura (T), de la viscosidad del medio (η) y del coeficiente de difusión (D). Siendo k la constante de Boltzmann. Esta técnica es una de las más usadas para determinar el tamaño de partículas y permite medir radios de hasta 0.001 μm , lo cual es difícil de alcanzar con otras técnicas. Asimismo, es útil para determinar la velocidad de partículas en solución, por ejemplo, para observar el comportamiento de microorganismos o bien, para analizar el flujo de los fluidos. Entre sus ventajas cabe mencionar que es una técnica no invasiva.

Los experimentos DLS se realizaron con el instrumento Malvern Nano S (Malvern, Ltd) equipado con un láser NIBS (láser no invasivo de dispersión) y un peltier para controlar la temperatura. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C en un buffer con 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% v/v glicerol, a una longitud de onda de 663 nm. La muestra de proteína (2 mg/ml) fue filtrada previamente por medio de un filtro Anotop® de tamaño de poro 0.02 µm (whatman, GE). Los radios hidrodinámicos fueron calculados a partir de los valores Z, usando el software presente en el equipo.

4.2.4.9 Cuantificación por método BCA

La determinación de proteína por BCA es un método altamente sensible, en donde se mezclan las proteínas presente en el medio con Cu²⁺ en un medio alcalino produciendo Cu⁺, y un reactivo para la detección de Cu⁺ altamente selectivo y sensitivo denominado ácido bicinconínico (BCA). Se ha reportado que la estructura macromolecular de la proteína y la presencia de cisteína, cistina, triptófano y tirosina son los responsables de la formación de color en muestras de proteína cuando son ensayadas con BCA. La cuantificación por BCA combina la reacción de Biuret en donde la proteína reacciona con Cu²⁺ en medio alcalino para producir Cu⁺. El producto de la reacción presenta un color púrpura, es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. Esto permite la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa (35). Se empleó el kit de Pierce BCA®.

Se preparó el reactivo de trabajo al mezclar 50 partes del 'reactivo A' (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, reactivo BCA para detección y tartrato de sodio en una solución de NaOH 0.2 N) con una parte del 'reactivo B' (solución de sulfato de cobre 4 %). La solución stock de 200 mg/ml se preparó y se realizaron diluciones con agua destilada hasta obtener la menor concentración de 10 mg/ml. Se tomaron 0.1 ml de cada muestra de concentración desconocida. Para el blanco, se utilizó 0.1 ml de diluyente. Se realizó por duplicado. Se adicionaron 2 ml de reactivo de trabajo a cada tubo y mezclar con vortex. Se incubaron todos los tubos

a la temperatura de 60 °C por 30 minutos. Después de la incubación, se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm. La curva patrón se realizó con los datos recolectados y se interpolaron los resultados de las muestras con concentración desconocida.

4.2.5 Métodos para la manipulación de *Leishmania tarentolae*

La siguiente metodología se apega al protocolo descrito por Jena Bioscience para la manipulación de su kit comercial de la cepa P10 para una expresión constitutiva usando como antibiótico de selección la nourseotricina

4.2.5.1 Condiciones de almacenamiento y reactivación de cepas de *L. tarentolae* en glicerol

El almacenamiento de células de *L. tarentolae* se realizó exclusivamente a -80 °C. Para guardar células en congelación de *L. tarentolae* y evitar la muerte celular se procedió de la siguiente manera: a partir de un cultivo en fase de crecimiento media (DO₆₀₀ 1.2-1.8) se mezcló hasta alcanzar una concentración de 80 % de glicerol en tubos crioviales. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se llevó a congelación suavemente con hielo húmedo por 1 hora. Al día siguiente se almacenó a -20 °C, y después de 24 horas se transfirió a -80 °C.

La reactivación de crioviales se realizó con hielo húmedo. El total del contenido del criovial fue inoculado en una botella T25 con 5-10 ml de medio BHI precalentado a 26 °C. Después de dos días, el cultivo se diluyó para continuar con el trabajo experimental.

Se observaron mejores resultados al partir de un cultivo en suspensión con agitación para realizar los stocks de glicerol, ya que la DO es más alta que en un cultivo en botellas T25, con lo cual se incrementó la proporción de células que lograron sobrevivir al procedimiento.

4.2.5.2 Protocolo para electroporación y selección de clonas

La transfección de células de *L. tarentolae* se llevó a cabo mediante electroporación. Se digirió 2-5 µg del plásmido con *SwaI* por 3 horas a 37 °C y se

purificó el fragmento correspondiente a 5.8 kb de gel de agarosa usando kit Qiagen Extracción Gel. La digestión se realizó, asimismo, en el plásmido control que contenía la secuencia codificante de eGFP como control positivo. El control negativo fueron células electroporadas sin ADN. Se emplearon 500 ng de ADN purificado para la transfección. Para la transfección, un cultivo de *L. tarentolae* P10 con $DO_{600} > 1.5$ se diluyó cinco veces y se dejó crecer por toda la noche en agitación. Antes de la transfección se verificó el estado de las células al microscopio, y se confirmó que éstas presentaran forma redondeada, fueran móviles y sin aglomerados celulares, y que estuvieran libres de contaminación bacteriana. Antes de comenzar con la transfección se tuvieron preparados:

- 8 ml de medio BHI Lexsy (con Pen-Strep y Hemina) precalentado a 26 °C para cada transfectante.
- Medio estéril BHI Lexsy con Bacto-Agar al 2 % (3 g en 150 ml, suficiente para 10-12 platos).
- 1 M HEPES pH 7.4 (23.83 g en 100 ml), estéril por autoclave.
- Medio BHI Lexsy, doble concentración (2x) (11 g en 105 ml).

Se mezclaron células de *Leishmania* cuidadosamente en la botella T25 y con pipeta se trasvasó el cultivo en tubos falcon de 15 ml (se realizó en condiciones estériles). Se centrifugó por 3 minutos, a temperatura ambiente (~ 20 °C) y a 2000 rpm. Se disolvió el pellet en la mitad de volumen (si la DO_{600} fue menor a 1.0, se disolvió en 1/3 de volumen). En condiciones estériles: se mezcló el cultivo cuidadosamente y se tomaron 400 µl de la mezcla. Se trasvasó a una celda de electroporación junto con el ADN del gen de interés. Se depositó la celda en hielo húmedo por, exactamente, 10 minutos. Se eliminaron las burbujas de aire y la electroporación se realizó mediante 1 pulso a 450 V. Se regresó la celda de electroporación a hielo húmedo por 10 minutos. Posteriormente, se transfirió todo el contenido de la celda a 8 ml de medio BHI precalentado (con Pen-Strep y Hemina, sin antibiótico de selección) y se incubó por toda la noche a 26 °C en botellas T25. Al día siguiente, se prepararon los platos de agar. Se fundieron los 150 ml con 2 % de Bacto-Agar en microondas. Se prepararon 105 ml de medio

BHI Lexsy 2X, junto con 30 ml de suero fetal bovino (FCS), 12 ml de HEPES 1 M, 3 ml de Pen-Strep 200X, 0.6 ml de Hemina 500X, 300 µl de antibiótico de selección NTC 1000X, precalentado a 26 °C. Se dejó enfriar Bacto-Agar a 55-65 °C y se mezcló con medio BHI Lexsy. Se trasvasó el medio a los platos, evitando la formación de burbujas. Los platos se prepararon el mismo día que se electroporaron las células, o bien, se almacenaron boca abajo y en oscuridad por no más de 3 días. Se centrifugaron 6 ml del cultivo anterior y el paquete celular se resuspendió en 300 µl de medio BHI Lexsy (Pen-Strep y hemina). Cuidadosamente se plaquearon 100 µl de células en los platos correspondientes. Los platos se incubaron boca abajo a 26 °C para la selección de clonas aisladas. Los 4 ml restantes del cultivo se mantuvieron en la botella y se les agregó 4 µl de antibiótico de selección. En este caso, se adquirieron multiclonas. Después de 4-14 días, las colonias en los platos son lo suficientemente grandes (1-2 mm de diámetro) para ser transferidas a platos de 96 pozos. Se precalentó medio BHI Lexsy con Pen-Strep, hemina y NTC. Se colocaron aproximadamente 100 µl de medio de cultivo a la cámara de 96 pozos y en condiciones de esterilidad se inocularon las colonias. Las colonias se seleccionaron de acuerdo a su morfología tal que tuvieran forma bien delimitada redonda y de color blanco. Las clonas que crecieron se contaron como transfectantes positivas y se trasvasaron a una cámara de 24 pozos. Se continuó incrementando el volumen del cultivo hasta alcanzar los 3 ml en cámara de 6 pozos. Siempre se agregó la cantidad de medio (BHI con Pen-Strep, hemina y NTC) necesaria para que el cultivo fuera diluido 1:30. Para la cámara de 24 pozos, el volumen total fue de 1 ml, para la de 6 pozos fue de 3 ml.

Una vez que se observó crecimiento óptimo para una clona y se alcanzó el volumen de 3 ml, se tomaron 200 µl del cultivo y se llevaron a 6 ml en botella T25. Se realizó otro pase a 8 ml. Una vez que se tuvo la clona en este volumen, se pudo ocupar para llevar a cabo experimentos posteriores (SDS-PAGE y Western blot). Fue importante mantener siempre un cultivo con medio fresco (hacer pases cada tercer día). Después de 7- 10 días, el cultivo en suspensión se empleó como

preinóculo para un cultivo por toda la noche en matraz de 100 ml, con volumen final de 25 ml. De ahí se realizaron los stocks de glicerol.

4.2.5.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en el citoplasma de *L. tarentolae*

Se inocularon células en una dilución 1:30 en medio BHI Lexsy (Pen-Strep y hemina) a partir de un cultivo denso en un matraz Erlenmeyer. Se dejaron crecer toda la noche a 26 °C en agitación a 130 rpm. Al día siguiente se duplicó el volumen con medio BHI Lexsy (Pen-Strep y hemina) adicionado con hemina (400 ml de cultivo = 400 µl hemina) y se creció el cultivo por 24 h más. Pasado este tiempo se colectaron las células por centrifugación a 3 000 rpm, por 10 minutos a 18 °C. La DO₆₀₀ de este cultivo debe ser >4.0. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (100 µl de buffer de lisis por 1 ml de cultivo). Se incubó en hielo por 30 minutos y las células se rompieron por sonicación en 3 ciclos de 30 segundos prendido a una potencia de 7 y 30 segundos de descanso en hielo. El lisado se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El lisado se purificó a través de una columna de afinidad a Ni²⁺ como se menciona en la sección correspondiente.

4.2.5.4 Protocolo para purificación de proteínas recombinantes secretadas al medio de cultivo

Se expresó la proteína como se describe en la sección anterior. Las células se centrifugaron a 3000 rpm, 20 minutos a 18 °C y se separó el paquete celular del sobrenadante. El sobrenadante se concentró usando tubos concentradores Centricon® con el corte respectivo de la proteína hasta un volumen de 10 ml. Se continuó con protocolos de purificación de proteínas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Expresión de la Silicateína en Células Procariontes

En estudios anteriores, se ha intentado la expresión de la silicateína recombinante en diferentes sistemas de expresión. El principal impedimento ha sido la obtención de la proteína correctamente plegada, lo cual ha obstaculizado su estudio y aplicación. En este estudio se probó el sistema de expresión de *E. coli* capaz de expresar simultáneamente dos grupos de proteínas chaperonas, las cuales asisten en el correcto plegamiento de otras proteínas. Por otra lado, se buscó expresar a la silicateína como propéptido debido a que se ha sugerido que al tener a la enzima como zimógeno se favorece el correcto plegamiento de la misma y, además, la proteína presenta mayor estabilidad (7). Asimismo, se manejó la secuencia que incluía únicamente los aminoácidos correspondientes al dominio catalíticamente activo, ya que el interés en la silicateína está enfocado, precisamente, al estudio de su actividad enzimática.

Se realizó el protocolo para la transformación de los plásmidos pHLTEV–prosilicateína y pET29–silicat en células competentes de *E. coli* que contenían los genes para la expresión simultánea de los dos grupos de chaperonas de *E. coli* mencionados en la sección de metodologías.

Para la inducción de la silicateína como propéptido y como dominio catalítico se empleó IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido), el cual es un análogo sintético de la lactosa que se emplea para inducir la expresión de proteínas en *E. coli* DE3. En el operón lactosa, la adición de IPTG hace que la RNA polimerasa transcriba el gen *lacZ* y se produzca mRNA *lacZ* que codifica para la proteína β -galactosidasa (32). En células *E. coli* DE3, el gen *lacZ*, fue reemplazado por la secuencia codificante de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. A su vez, el IPTG también induce la expresión de la proteína de interés ya que en los plásmidos pET29 y pHLTEV la secuencia que codifica para los diferentes dominios de la silicateína se encuentra bajo el control del promotor T7 y el operador lactosa.

En las células de *E. coli* que sobreexpresan chaperonas a partir del plásmido pG-KJE, la expresión está controlada por los promotores *Ara* y *Tet*. Una vez realizada la inducción se utilizaron geles de poliacrilamida para analizarlos. Los resultados obtenidos de realizar una curva temporal de expresión de prosilicateína se muestran en la Figura 10 y Figura 11. El peso esperado de la construcción obtenida de este vector es 46 kDa. Se puede apreciar que cercano al marcador de 48 kDa hay una banda prominente que podría indicar la presencia de la prosilicateína. Sin embargo, esta banda se aprecia desde antes de la inducción, por lo que es poco probable se trate de la proteína de interés. En cambio, coincide con lo esperado para la chaperona dnaJ por lo que es factible se trate de esta proteína, ya que la inducción de las chaperonas se realizó antes que la de la proteína de interés. De lo observado en el gel no es posible descartar si la banda prominente en 48 kDa está compuesta por ambas proteínas: la prosilicateína y la chaperona dnaJ. En la fracción insoluble (Figura 11) no se aprecia el enriquecimiento de ninguna proteína conforme aumenta el tiempo de inducción, por lo que no hay indicios de que la prosilicateína se exprese en cuerpos de inclusión.

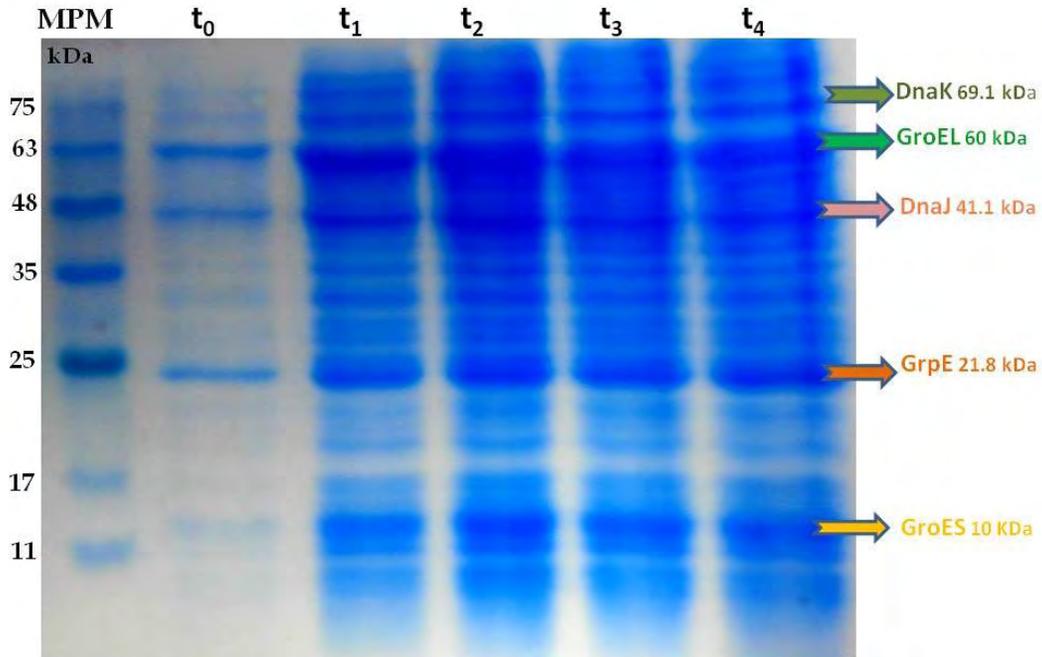


Figura 10. Gel SDS-PAGE al 12 % con las fracciones solubles obtenidas de la expresión de la prosilicateína a partir del plásmido pHLTEV-prosilicateína en células de *E. coli* con chaperonas. t_0 : sin inducir, t_1 : una hora después de la inducción con IPTG, t_2 : dos horas después de la inducción, t_3 : tres horas después de la inducción, t_4 : cuatro horas después de la inducción. MPM: marcadores de peso molecular.

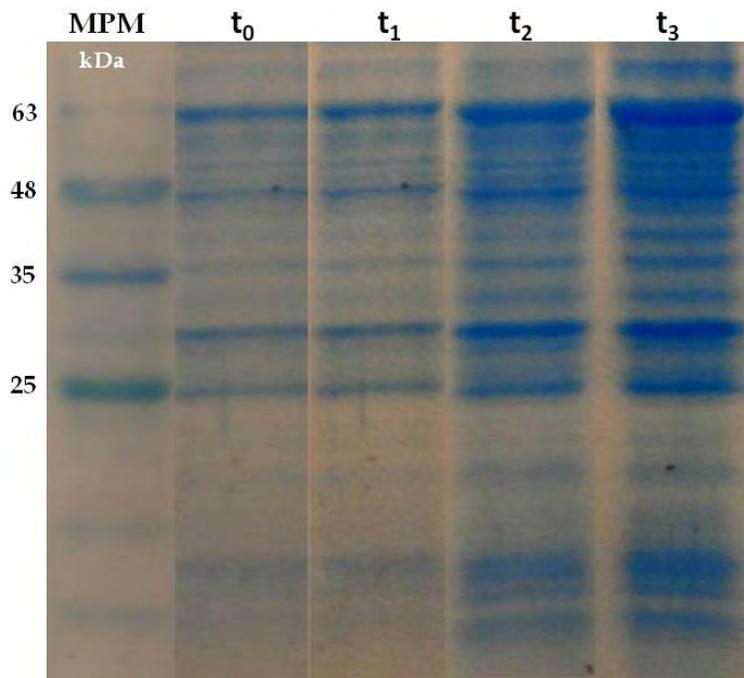


Figura 11 Gel SDS-PAGE al 12 % donde se observan las fracciones insolubles de la expresión de la prosilicateína a partir del plásmido pHLTEV-prosilicateína en células de *E. coli* con chaperonas. t_0 : sin inducir, t_1 : una hora después de la inducción con IPTG, t_2 : dos horas después de la inducción, t_3 : tres horas después de la inducción. MPM: marcadores de peso molecular.

En la Figura 12 se presentan las fracciones solubles de la expresión de la silicateína dominio catalítico en células de *E. coli* que sobreexpresan las chaperonas. Como se puede apreciar en t_1 a t_4 (perfil proteico de las células después de inducir) existe una banda que no se visualizó en el perfil sin inducir (t_0). Inclusive, esta banda se mostró en un peso molecular cercano a los 35 kDa, esperados para la construcción del dominio catalítico de la silicateína. A medida que el tiempo de inducción transcurrió la intensidad de esta banda aumentó, lo que sugirió la presencia de la silicateína dominio catalítico. Adicionalmente, en todos los carriles se observaron las bandas correspondientes a las chaperonas, las cuales se indujeron antes del tiempo cero. El carril con t_4 , correspondiente al perfil proteico de las células sometidas a mayor tiempo de inducción (cuatro horas), mostró una concentración de proteína total menor, esto puede deberse a un error de muestreo, por lo que el tiempo de inducción se estableció en tres horas.

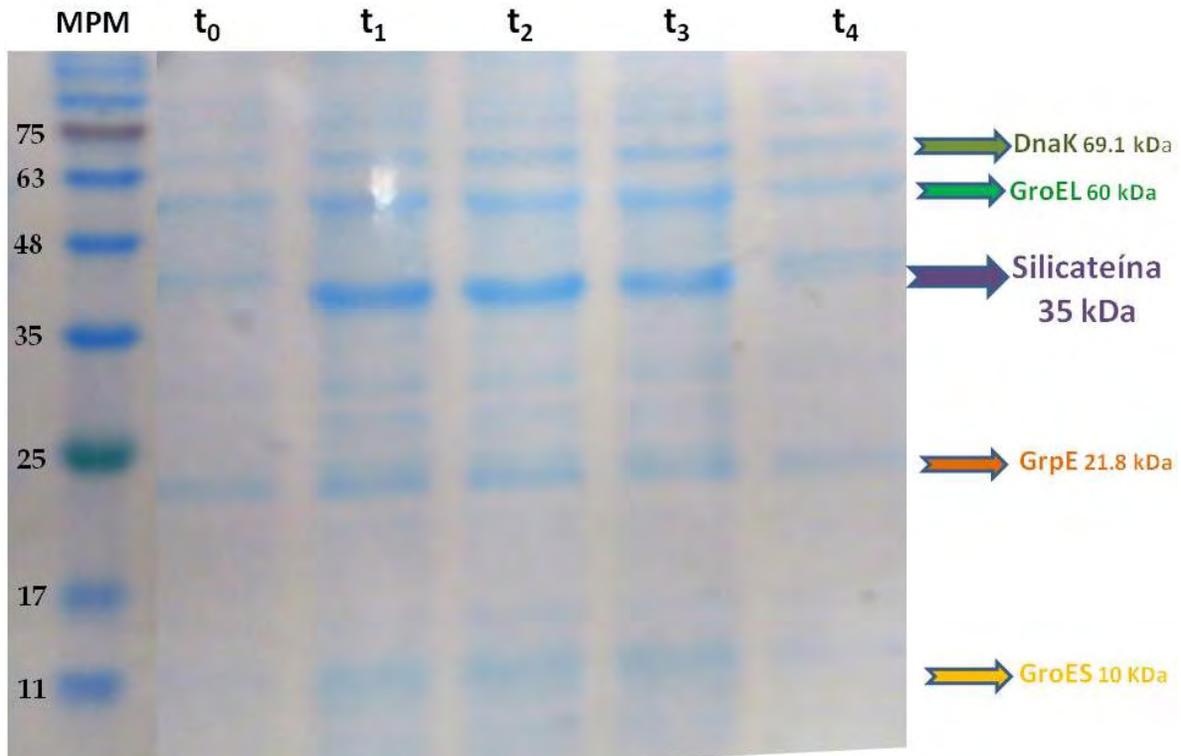


Figura 12. Gel SDS-PAGE al 12 % de las fracciones solubles de la inducción del dominio catalítico de la silicateína en células de *E. coli* con chaperonas. t_0 : sin inducir, t_1 : una hora después de la inducción con IPTG, t_2 : dos horas después de la inducción, t_3 : tres horas después de la inducción, t_4 : cuatro horas después de la inducción. MPM: marcadores de peso molecular.

El análisis de la expresión del dominio catalítico de la silicateína en células que sobreexpresan las chaperonas en la fracción insoluble se observa en la Figura 13. Este gel mostró un considerable enriquecimiento de una banda del mismo tamaño que la observada en Figura 12 (cerca de los 35 kDa), y que probablemente corresponda al dominio catalítico de la silicateína. Por lo que, se puede sugerir que este dominio se expresa predominantemente en la fracción insoluble.

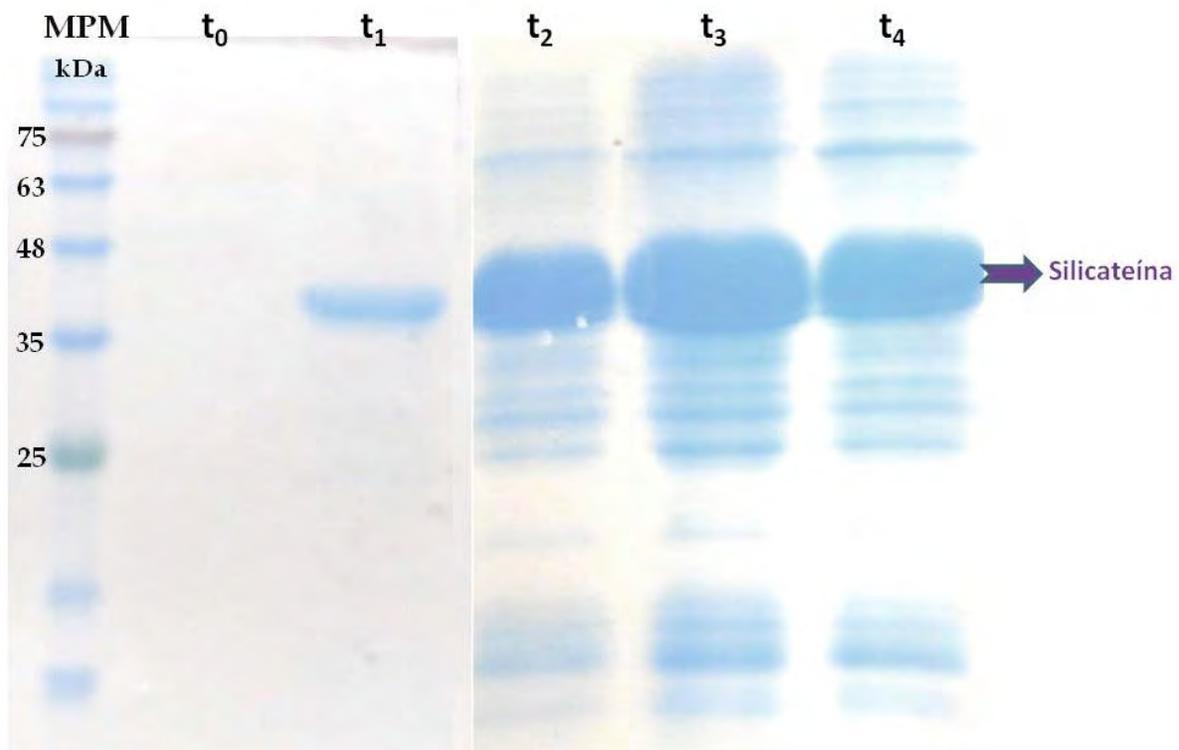


Figura 13. Gel SDS-PAGE al 12 % con las fracciones insolubles de la inducción del dominio catalítico de la silicateína en células de *E. coli* con chaperonas. t₀: sin inducir, t₁: una hora después de la inducción con IPTG, t₂: dos horas después de la inducción, t₃: tres horas después de la inducción, t₄: cuatro horas después de la inducción. MPM: marcadores de peso molecular.

De las dos construcciones evaluadas, únicamente la construcción del dominio catalítico mostró expresión de la proteína en la fracción soluble para su posterior estudio. Por ello, se procedió a purificar la muestra obtenida a las tres horas de inducción mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ (Figura 14).

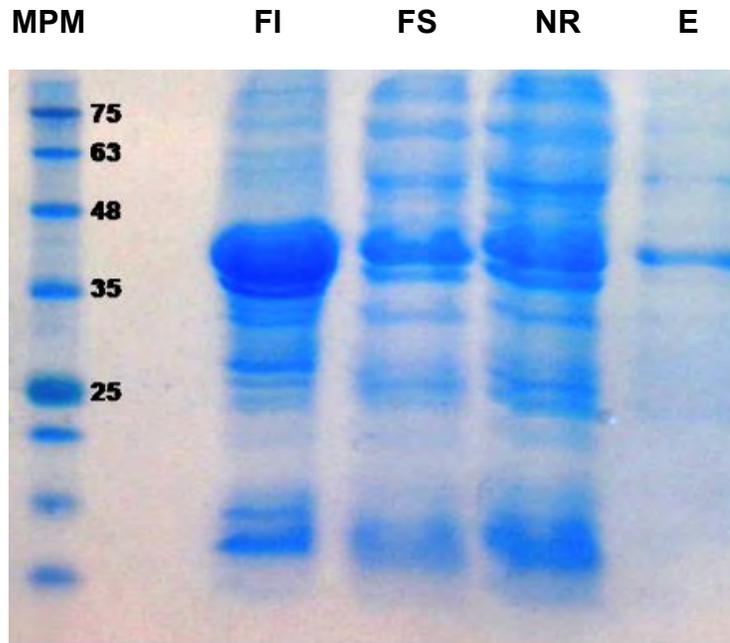


Figura 14. Gel SDS-PAGE al 12 % donde se muestra el proceso de purificación del dominio catalítico de la silicateína mediante una cromatografía de afinidad a Ni^{2+} . FI: fracción insoluble, FS: fracción soluble, NR: fracción no retenida por la columna de Ni^{2+} , E: elución de columna de Ni^{2+} . MPM: marcadores de peso molecular.

En la Figura 14 se puede observar que existe una fracción considerable del dominio catalítico de la silicateína que no interaccionó con la columna, y sólo una fracción minoritaria que sí lo hizo, la cual fue posteriormente eluída. La columna de afinidad utilizada reporta una capacidad de 5 mg de proteína por ml de resina, por lo que se descartó que se haya excedido la capacidad de la columna. Las razones de la baja interacción de la proteína con la columna pueden deberse a que: 1) el plegamiento de la proteína ocluye a la etiqueta de histidinas por lo que no encontraba accesible, o bien, 2) la proteína no se encuentre plegada correctamente. Para descartar la segunda posibilidad se realizó un estudio de dispersión dinámica de luz de la fracción eluída de la columna de afinidad.

5.1.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La gráfica en la Figura 15 contiene varios picos, lo que indicó que la muestra de proteína mostró un perfil polimodal, lo cual era lo esperado si se considera que en la elución (Figura 14) se aprecia más de una banda, es decir, hay presencia de más de una proteína. Además, los picos observados no tienen una buena

resolución resultando en una muestra polidispersa. Sin embargo, lo que llamó la atención en este estudio fue el radio hidrodinámico de las especies presentes en la muestra, los cuales varían desde 10 nm hasta más de 100 nm. El radio hidrodinámico de una proteína se define como el radio equivalente de una esfera rígida que difunde a la misma velocidad. Puesto que las proteínas no existen como esferas rígidas, su radio hidrodinámico es un reflejo del tamaño aparente de la molécula hidratada. Además, se debe considerar que muchas proteínas no son esféricas y presentan una forma elongada.

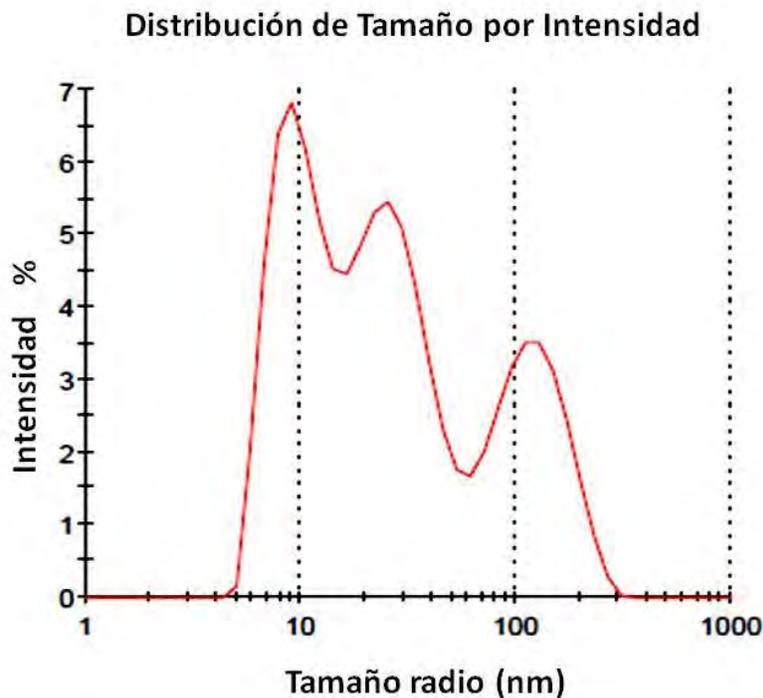


Figura 15. Espectro de dispersión dinámica de luz del dominio catalítico de la silicateína eluido de la columna de afinidad a Ni^{2+} .

En la Figura 16, se puede comparar la masa molecular y el correspondiente radio hidrodinámico de algunas proteínas modelo. La construcción de la silicateína tiene un tamaño esperado de 35 kDa, lo que correspondería teóricamente a un radio hidrodinámico de 2.7 nm. No obstante, este valor de R_H dista mucho del obtenido experimentalmente para la silicateína, el cual además de ser una muestra con diferentes R_H , el menor está cercano a 10 nm. Esto implicaría un tamaño aproximado de casi 20 veces mayor al estimado si consideramos el R_H de la

Tiroglobulina G y su peso molecular correspondiente. Lo anterior sugirió que es probable que el dominio catalítico de la silicateína forme oligómeros con composiciones diversas, y muy posiblemente que la proteína se encuentre desnaturalizada.

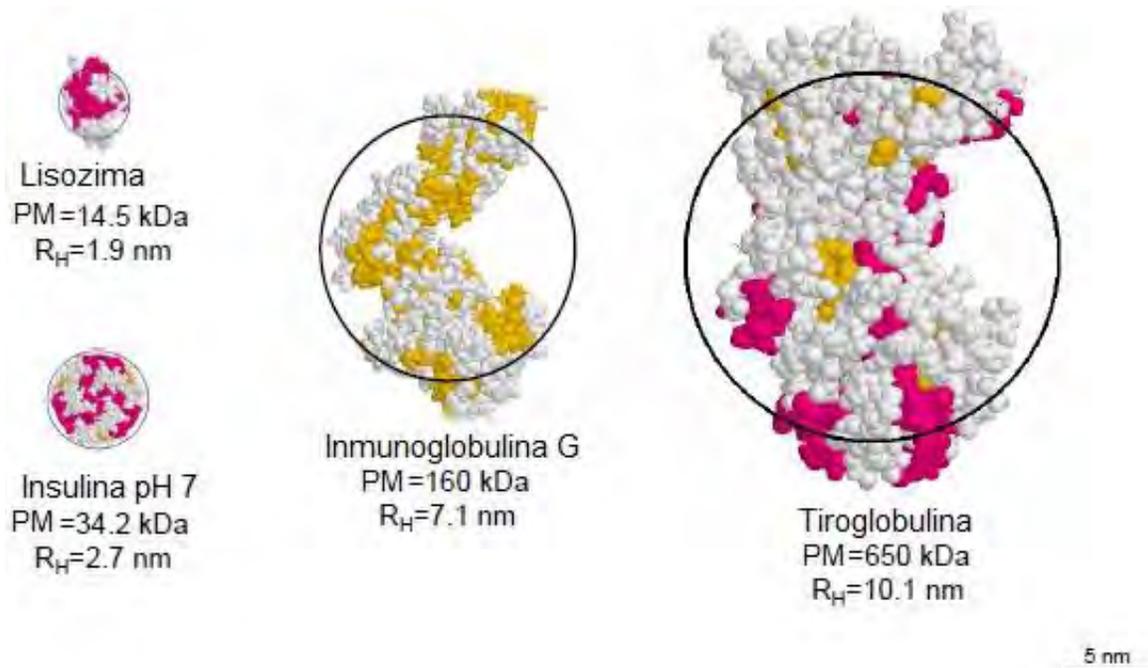


Figura 16. Radio hidrodinámico y masa molecular de diferentes proteínas modelo.

5.2 Expresión de la Silicateína en Células Eucariontes

Debido a la dificultad de obtener a la silicateína, tanto como propéptido como sólo el dominio catalítico, expresada en forma heteróloga y plegada correctamente en células de *Escherichia coli*, se continuó el trabajo con otro sistema de expresión que favoreciera el correcto plegamiento.

El dominio catalítico de la silicateína se espera tenga un plegamiento similar a la L-catepsina, la cual es rica en puentes disulfuro. Por lo que es posible que esta modificación, no se lleve a cabo en células bacterianas; especialmente si consideramos que el citoplasma bacteriano tiene condiciones reductoras y los puentes de disulfuro se realizan en el espacio periplásmico. Tomando en cuenta lo anterior, fue conveniente trabajar con un sistema de expresión eucarionte cuyos

asistentes de plegamiento fueran más adecuados. Se escogió a las células de *Leishmania tarentolae* como organismo huésped cuyas ventajas se describieron anteriormente y que se pueden resumir en tres: 1) es un sistema de expresión eucarionte que lleva a cabo modificaciones postraduccionales, 2) aun cuando se trata de células eucariontes, su manipulación es similar a la de células bacterianas, y 3) ha permitido la expresión de proteínas que en sistemas convencionales de expresión no se habían obtenido. Entre los ejemplos más destacados se encuentran las proteínas descritas en la Tabla 10.

Tabla 10. Proteínas expresadas en células de *Leishmania tarentolae*.

Proteína	Tipo	Organismo nativo	Publicación
Laminina-332	Glicoproteína	Humano	<i>The production of recombinant human laminin-332 in a Leishmania tarentolae expression system.</i> Hoang-Phuong Phan, Marisa Sugino, Tomoaki Niimi. 2009 (36).
Precursor Proteína Alfa	Glicoproteína	Humano	<i>Production of Glycosylated Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha (sAPPalpha) in Leishmania tarentola.</i> Stephen Klatt et al. 2013 (30)

Por tal razón, en este módulo de trabajo se buscó diseñar por técnicas de Ingeniería Genética dos diferentes cepas transgénicas del protozooario *L. tarentolae*, en donde una de ellas pudiera expresar a la silicateína en su forma de propéptido, y la otra fuera capaz de expresar al dominio catalítico de la silicateína en su forma activa. Para ello se utilizó el kit comercial proveniente de Jena

Bioscience, cuyo protocolo se implementó en el laboratorio del Doctor Ruy Pérez Monfort ubicado en el Instituto de Fisiología Celular, con ayuda de los investigadores: Dr. Stephen Klatt, Dra. Rosario López y Dra. Nayelli Cabrera González.

Inicialmente se realizaron las construcciones pLEXY-prosilicateína y pLEXY-silicateína, destinadas a la integración en el genoma de *L. tarentolae* para expresar a la prosilicateína y al dominio catalítico de la silicateína, respectivamente. El vector original adquirido se muestra en la Figura 9. Según el diseño de este vector, la secuencia mostrada en rojo es la que se elimina con la digestión en los sitios de restricción correspondientes al corte de la endonucleasa *KpnI*. La ventaja de tener esta secuencia nombrada como ‘adicional’, es que se puede visualizar en el gel de agarosa una banda correspondiente a su peso, con lo que se puede confirmar que el plásmido se digirió exitosamente en ambos extremos, lo que además, incrementa la probabilidad de ligar el inserto de interés. Las enzimas de restricción que se utilizan para la eliminación de la secuencia ‘adicional’ deben coincidir con las enzimas de restricción empleadas para cortar al gen de interés (inserto), es decir, se deben generar extremos compatibles (extremos cohesivos) para que se realice la posterior ligación (Figura 17 y Figura 18).

Otra de las características de este vector es la posibilidad de cortar el sitio del péptido señal, si se remueve esta secuencia por medio de digestión con enzimas de restricción, entonces la secuencia de la proteína insertada no tendrá las instrucciones para su exportación al medio de cultivo. En el caso de la construcción del plásmido pLEXY-prosilicateína se decidió optar por eliminar esta secuencia para que la prosilicateína permaneciera en el citoplasma de las células de *Leishmania tarentolae*. Lo contrario se realizó en la construcción del vector pLEXY-silicateína, en donde la secuencia codificante del dominio catalítico se clonó en el marco de lectura del péptido señal para la exportación de la silicateína al medio de cultivo. Esto se planeó así considerando que la actividad promiscua de proteasa del dominio catalítico de la silicateína es tóxica si se expresa en el citoplasma de las células de *L. tarentolae*; afectando la viabilidad del organismo

por la degradación de proteínas endógenas esenciales. Además, el tráfico de la silicateína al medio de cultivo involucra su paso por el retículo endoplásmico, sitio donde se favorece la formación de los puentes de disulfuro.

Los insertos digeridos de la prosilicateína y del dominio catalítico de la silicateína, se obtuvieron del plásmido pBSK-G5S0116. Este plásmido contenía el gen para la expresión de la silicateína en su forma de propéptido, por lo que mediante la PCR y los oligos de los extremos 3', se determinó el tamaño del amplicón y así se obtuvieron los insertos para realizar ambas construcciones.

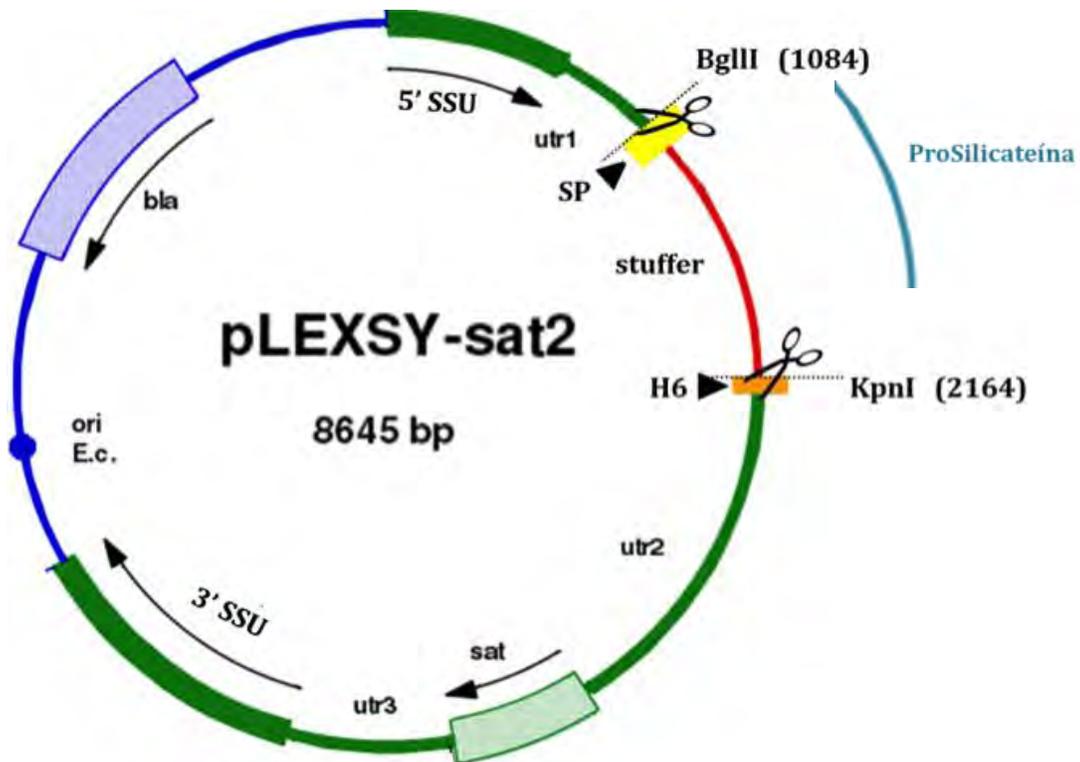


Figura 17. Representación de los cortes realizados en el vector pLEXSY-sat 2 para la construcción del vector pLEXSY-prosilicateína. Se observa en amarillo la secuencia del péptido señal, la cual se elimina del vector junto con la secuencia 'adicional' para reemplazarse por la secuencia codificante de la prosilicateína en azul.

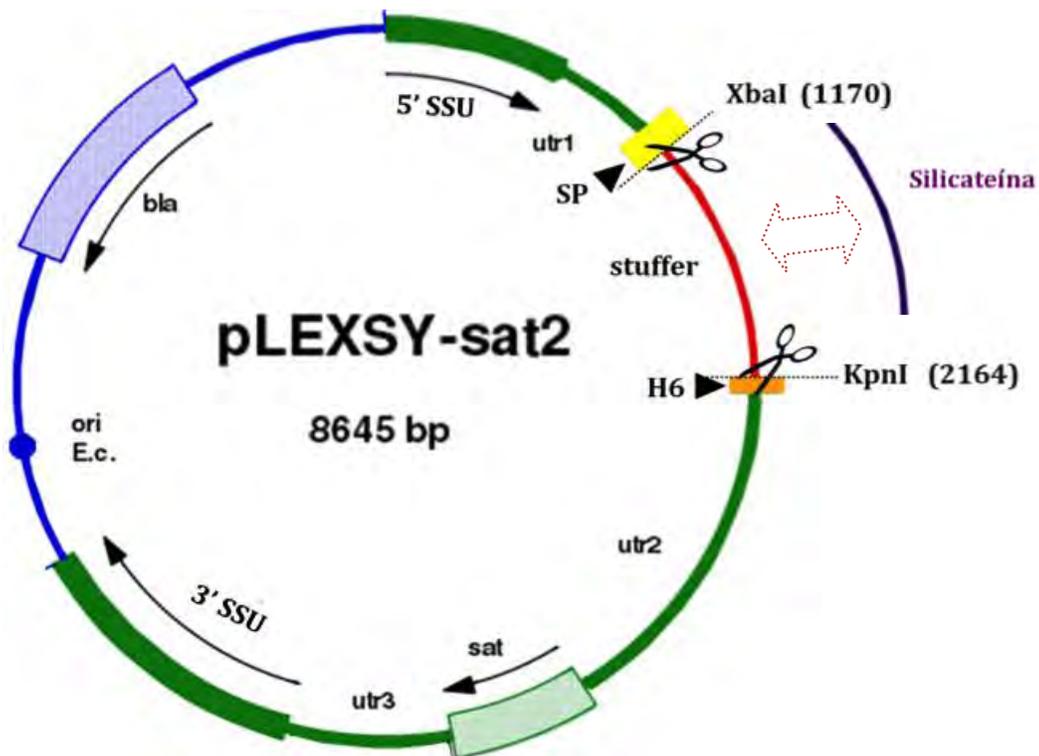


Figura 18. Representación de los cortes realizados en el vector pLEXY-sat 2 para la construcción del vector pLEXY-silicateína. Se observa en amarillo la secuencia del péptido señal, la cual se conserva. La secuencia 'adicional' fue reemplazada por la secuencia codificante del dominio catalítico de la silicateína.

Se realizó la clonación de las secuencias codificantes de la prosilicateína y el dominio catalítico de la silicateína. Los productos de las reacciones de ligación se transformaron en células de *E. coli* DH5 α . La construcción de la prosilicateína mostró 12 colonias para la ligación control (sin inserto) y 25 colonias para la reacción de ligación con el correspondiente inserto. Esto indicó que al menos 12 colonias podrían contener el inserto en el plásmido, es por ello que se tomaron 12 colonias de la caja de ligación y se incubaron en medio LB por toda la noche. Posteriormente, se aisló ADN plasmídico de las 12 clonas y se verificó la presencia del inserto mediante patrón de restricción con *XcmI*. El mismo procedimiento se llevó a cabo para la construcción del dominio catalítico de la silicateína, donde se escogieron colonias que cumplieron con el patrón esperado. En la Figura 19 se ejemplifica el patrón de restricción experimental obtenido de

una de las colonias elegidas para la prosilicateína y del dominio catalítico de la silicateína, así como el corte virtual esperado.

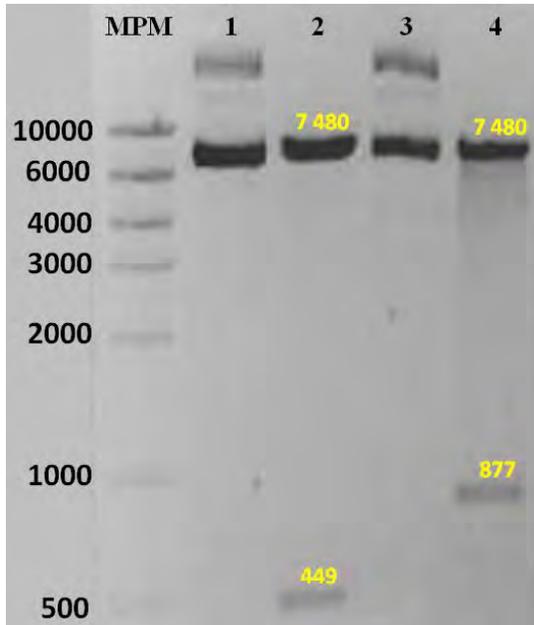


Figura 19. Patrones de restricción obtenidos experimentalmente con la enzima *Xcm1* de 1: pLEXSY-silicateína sin digerir, 2: pLEXSY-silicateína digerido, 3: pLEXSY-prosilicateína sin digerir, 4: pLEXSY-prosilicateína digerido.

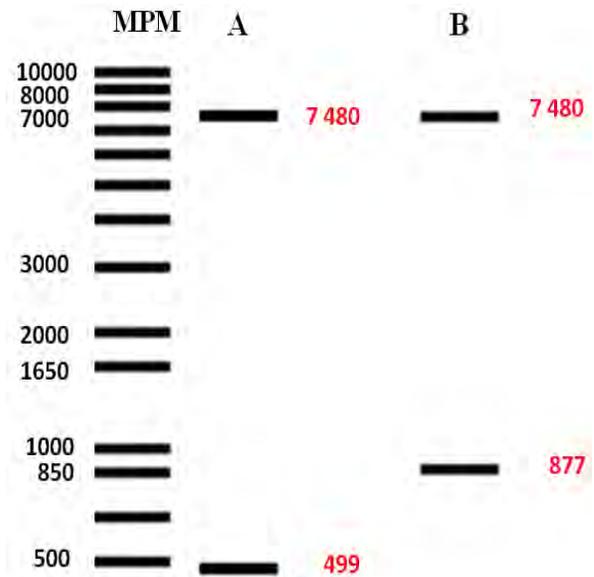


Figura 20. Patrón de restricción teórico con la enzima *Xcm1*. **A.** Corte virtual pLEXSY-silicateína. **B.** Corte virtual pLEXSY-prosilicateína. MPM: marcadores de peso molecular.

La subsecuente secuenciación del ADN aislado corroboró que se obtuvo la construcción deseada para ambos vectores de expresión. Consecutivamente, ambas construcciones se linearizaron mediante digestión con la endonucleasa *SwaI* y se purificaron según el protocolo de metodologías. Posterior a ello, el ADN se cuantificó para introducirse a células de *L. tarentolae* mediante transfección por electroporación. Los controles y construcciones que se manejaron en este procedimiento se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Controles de expresión y transfección en *L. tarentolae*.

Control	Características	Crecimiento con NTC	Observaciones
Control +	Vector con inserto del gen para la expresión de la proteína eGFP.	+++	Crecimiento con fluorescencia.
Control -	Vector sin inserto.	+++	Crecimiento sin fluorescencia.
Control Cero	Células de <i>L. tarentolae</i> bajo las mismas condiciones de transfección sin vector y sin inserto.	Sin crecimiento	Crecimiento en medio BHI sin NTC
Control de Cepa	Células de <i>L. tarentolae</i> en medio de cultivo óptimo, sin transfectar, sin vector, sin inserto.	Sin crecimiento	Crecimiento en medio BHI sin NTC

Nota: La simbología +++ indica un crecimiento abundante al microscopio óptico a 40X (más de 20 células por campo).

Para evaluar la eficiencia de la transfección, se usó como Control Positivo el vector pLEXY clonado con el gen para la expresión de la proteína eGFP. La expresión de esta proteína en *L. tarentolae* se puede observar mediante microscopía de fluorescencia, confirmando la correcta transfección. El Control Negativo se empleó para demostrar que la señal de fluorescencia es debida únicamente a la expresión de la proteína eGFP. Por otra parte, el Control Cero se usó para corroborar que el protocolo de transfección no afectó significativamente la viabilidad de las células. Para verificar la correcta manipulación de las células de *L. tarentolae*, se implementó el Control de Cepa, el cual permitió monitorear durante todo el procedimiento que las condiciones de trabajo se mantuvieran óptimas para el desarrollo de las células.

Los resultados de los controles demostraron que se contó con las condiciones óptimas para la transfección y el posterior crecimiento de las clonas. Respecto a las construcciones realizadas, sólo se probó la viabilidad de las células que contenían la construcción para el dominio catalítico de la silicateína. Con esta

construcción se procedió a escalar el cultivo hasta tener un volumen de 30 ml, en donde el total de pases fue de 7. El número de pases realizados para el cultivo que contenía la construcción del dominio catalítico de la silicateína fue exactamente el mismo que para el Control Positivo, ya que se realizaron a la par para observar las células al microscopio de fluorescencia. El estado morfológico idóneo para corroborar la viabilidad de las células se muestra en la Figura 21. Esta morfología se verificó después de cada pase realizado.

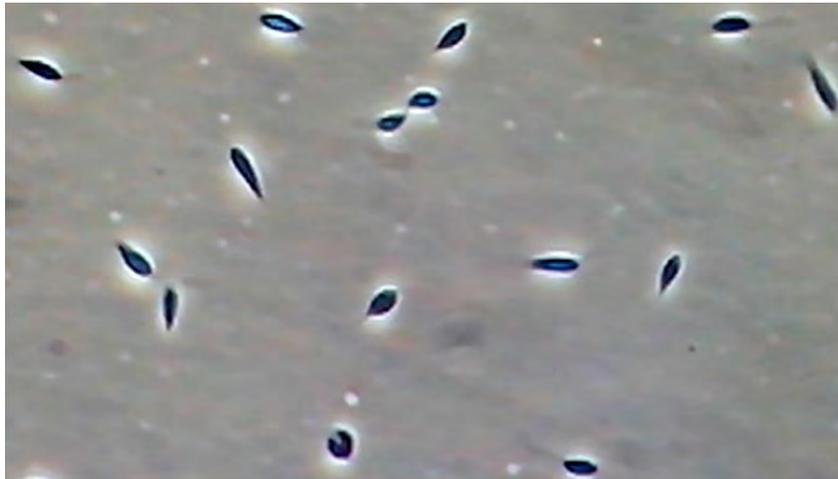


Figura 21. Fotografía en microscopio óptico de luz de un cultivo de células de *Leishmania tarentolae* que expresan a la proteína eGFP (control positivo) en fase logarítmica de crecimiento.

Cuando se obtuvo el volumen total de 30 ml, se contó con la concentración celular suficiente para realizar la extracción de ADN celular y confirmar mediante PCR la correcta integración del transgen al genoma de *L. tarentolae*. Las condiciones utilizadas en la PCR confirmatoria se muestran en la Tabla 12 y Tabla 13. La secuencia y función de oligos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 12. Cantidad de los reactivos empleados en la PCR para la confirmación de la integración al genoma de *L. tarentolae* del gen de la silicateína.

Reactivo	Silicateína
10x Buffer Taq	2 μ l
d-NTPs (10 mM)	2 μ l
Templado DNA (10-30ng/ μ l)	2 μ l
F2999 (10 μ M)	1 μ l
F3002 (10 μ M)	1 μ l
H ₂ O	12 μ l
Volumen Final	20 μ l

El tamaño del amplicón esperado es de 2.1 kbp.

El termociclador utilizado en la PCR se programó con las condiciones mostradas en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones para realizar la PCR correspondiente a la amplificación de insertos.

	Temperatura (°C)	Tiempo
	94	10 min
25 ciclos	94	30 s
	53	45 s
	72	3 min

Tabla 14. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la PCR para confirmar la integración del plásmido pLEXSY en el genoma de *L. tarentolae*.

Oligo	Secuencia (5'-3')	Especificaciones
F2999	CCTAGTATGAAGATTTTCGGTGATC	Oligo directo para diagnóstico de la integración del vector de expresión pLEXSYsat.
F3002	CTGCAGGTTACCTACAGCTAC	Oligo reverso para diagnóstico en el sitio ssu de <i>L. tarentolae</i>

Posterior a ello, se corrieron las muestras de PCR en geles de agarosa al 1 %, los resultados obtenidos para la confirmación de la presencia del plásmido pLEXSYsilicat en el ADN genómico de *Leishmania tarentolae*, así como la presencia del inserto para la expresión de la silicateína en él, se muestran en la Figura 22.

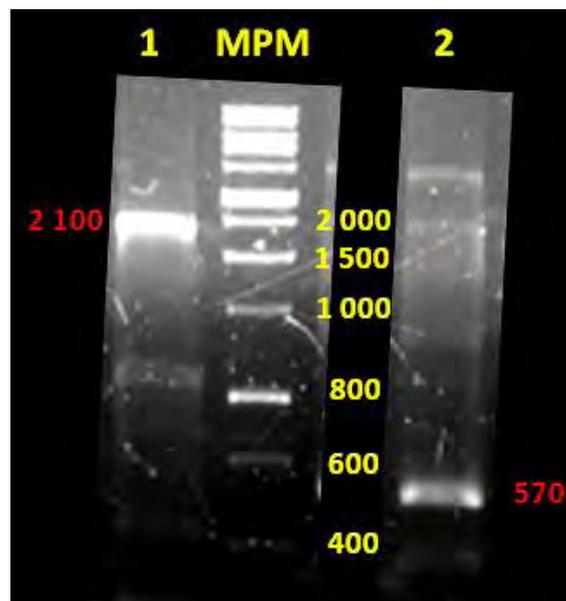


Figura 22. Gel de agarosa al 1 % de la PCR confirmatoria para 1: evaluar la integración del plásmido pLEXSYsilicat en el genoma de *L. tarentolae*, amplicón esperado 2100 pb. 2: evaluar la presencia del inserto dominio catalítico de la silicateína en el genoma de *L. tarentolae*, amplicón esperado: 570pb, MPM: marcadores de peso molecular.

Según se observa en la Figura 22, los amplicones esperados para confirmar tanto la integración del plásmido pLEXSY-silicateína al genoma de *Leishmania tarentolae* como la presencia de la secuencia de la silicateína en el plásmido pLEXSY-silicateína, se lograron observar en el gel de agarosa. Lo anterior indicó que las instrucciones para la expresión de la silicateína se hallaban presentes en la cepa transgénica generada e identificada como LEXSY-silicateína.

Una representación de la secuencia en el ADN de la cepa transgénica generada se observa en la Figura 23, donde la inserción se observa entre las secuencias ribosomales de *Leishmania tarentolae*, como se explicó anteriormente en la sección de Antecedentes.



Figura 23. Representación gráfica de una parte del ADN genómico en la cepa transgénica de *L. tarentolae* generada donde se encontró la inserción correspondiente a la secuencia codificante para la expresión del dominio catalítico de la silicateína.

Confirmado lo anterior, se analizó la expresión de la proteína escalando el cultivo de la cepa LEXSY-silicateína a volúmenes mayores. El Control Positivo también se escaló junto con la muestra para analizar la presencia de la proteína verde fluorescente.

El volumen final al cual se escaló la cepa LEXSY-silicateína fue de 2 litros, el protocolo de trabajo seguido fue conforme lo indicado en la sección de metodologías para el análisis de proteínas tanto en citoplasma del microorganismo como en el medio de cultivo.

Una vez que se extrajeron las muestras del medio y del paquete celular, ambas se purificaron (según metodologías) y se realizaron geles SDS-PAGE al 12 % para su análisis, donde nuevamente se empleó el Control Positivo. Para el paquete celular, se observó la banda correspondiente a la proteína eGFP (27 kDa), inclusive recién teñido el gel, la banda se observaba de color verde. Para el caso de la banda esperada para la silicateína, no se logró visualizar ni en el extracto sin purificar, ni el purificado por columna de níquel (información no mostrada). Esto concuerda

con lo esperado, ya que en la construcción, la proteína recombinante contiene el péptido señal para su exportación al medio de cultivo.

Para el análisis de los dos litros de medio de cultivo se aplicó, como primer paso de purificación, el protocolo de salting out descrito en la sección de metodologías, en cual, mediante la adición de un exceso de sal, se logra precipitar las proteínas presentes gracias a que la solvatación de la sal se ve favorecida en comparación con la de la proteína conllevando la precipitación de esta última. Este método permitió, asimismo, concentrar la proteína presente. La muestra se analizó mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 % y un gel de gelatina SDS al 12 %. Los geles de gelatina se emplean para analizar cualitativamente actividad proteolítica cuando la muestra analizada presenta actividad de proteasa, como es el caso de la silicateína. En este tipo de geles, a la distancia en la que migra la proteína de interés se observa la degradación del cosustrato de gelatina del gel resultando en una zona de clarificación fácilmente observable (Figura 24). En este zimograma se observa una banda donde la gelatina fue degradada y no es teñida por el azul de Coomassie, sin embargo, se encuentra más arriba del peso molecular esperado de la silicateína (23 kDa). Lo anterior puede deberse a: *i*) la presencia de otras enzimas proteolíticas endógenas de *L. tarentolae* que se hallaban presentes en la muestra, o bien, *ii*) la silicateína migra de forma anómala en el gel copolimerizado con gelatina. Para descartar alguna de estas posibilidades se realizó un gel SDS-PAGE teñido con plata mediante el cual se pudo verificar que la única banda que se observa tiene un peso cercano a 35 kDa mucho mayor que el esperado de 23 kDa de la silicateína (Figura 25).

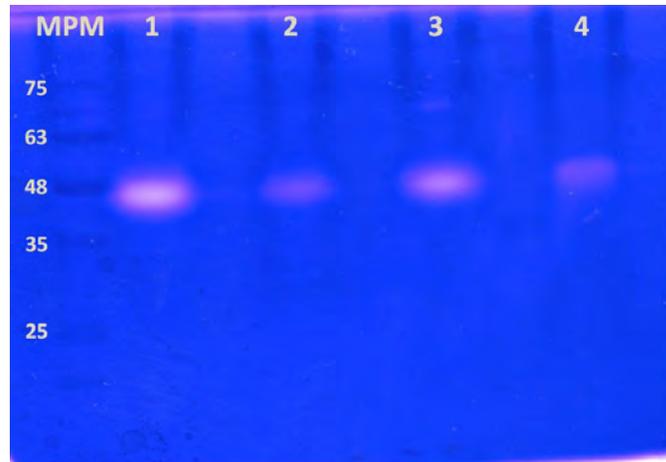


Figura 24. Zimograma de gelatina para evidenciar a las proteasas presentes en el extracto purificado en el medio de cultivo de *L. tarentolae* modificada con el gen de la silicateína presentes medio de cultivo. MPM: marcadores de peso molecular, 1: sin inhibidor de proteasas, 2: sin β -mercaptoetanol, 3: sin calentar, 4: sin inhibidor de proteasas, sin β -mercaptoetanol y sin calentar.



Figura 25. Gel de plata del extracto purificado presente en el medio de cultivo de *L. tarentolae* modificada con el gen de la silicateína. MPM: marcador de peso molecular, 1: muestra.

Como evidencia final, se realizó la técnica de Western Blot, donde se analizaron los extractos resultantes de la purificación del medio de cultivo de las células de *L. tarentolae* modificada con el gen de eGFP y silicateína. En ambas construcciones, las proteínas transgénicas contenían una etiqueta de histidinas en su extremo C-terminal, por lo cual se empleó el anticuerpo Anti-His para la detección en el

Western Blot. La Figura 26 muestra que la expresión de eGFP fue exitosa, sin embargo, no se detectó presencia de la silicateína mediante esta técnica, por lo que se confirmó que la proteína observada en el zimograma y en el SDS-PAGE teñido con plata no corresponde a la silicateína.



Figura 26. Análisis por Western Blot de 1: GFPe y 2: silicateína usando un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas presentes en las proteínas. MPM: Marcador de peso molecular estimado.

6. CONCLUSIONES

La expresión recombinante en las células de *E. coli* capaces de sobreexpresar chaperonas presentó cantidades adecuadas de las proteínas chaperonas correspondientes. Respecto a la expresión del dominio catalítico de la silicateína se observó su presencia en ambas fracciones: soluble e insoluble. Debido a que la fracción soluble de la silicateína contiene la proteína útil en estudios bioquímicos, se continuó con su estudio para analizar el correcto plegamiento de la proteína. Estudios de dispersión dinámica de luz (DLS) evidenciaron que la proteína se hallaba presente en un conglomerado soluble de gran tamaño. La cantidad de proteína observada en la fracción insoluble fue muy abundante, lo que sugiere que la mayor parte de la enzima no se logró plegar correctamente resultando en la formación de agregados insolubles. En general, se considera que las proteínas presentes en cuerpos de inclusión no están plegadas correctamente y por tanto no contienen proteína funcional. No obstante, diversos estudios han demostrado actividad en los cuerpos de inclusión, lo que sugiere que al menos una pequeña población de la proteína presente en estos agregados se encuentra plegada correctamente. Por ello, sería interesante ensayar la actividad de la silicateína en estos cuerpos de inclusión, los cuales se podrían utilizar como reactivos químicos en la producción de nanomateriales basados en polímeros de silicio.

Debido a los resultados obtenidos en células bacterianas, se decidió probar la expresión de la silicateína en células de *Leishmania tarentolae*, un sistema eucarionte capaz de realizar modificaciones postraduccionales que colaboran en el correcto plegamiento de las proteínas. La construcción de la cepa transgénica con la información necesaria para la expresión de la silicateína en su forma activa y como zimógeno fue exitosa. En la generación de cepas transgénicas, únicamente se lograron producir cepas para la construcción correspondiente al dominio catalítico de la silicateína. No obstante, no se logró detectar la presencia de la proteína correspondiente. Se pudo establecer que la actividad de proteasa observada en el medio de cultivo se debía a una proteína endógena de *L. tarentolae* que no correspondía a la silicateína.

Puesto que la silicateína ha probado ser difícil de expresar de forma recombinante, el siguiente sistema de expresión por probar sería el uso de células de insecto ya que corresponden a un sistema eucarionte superior.

A pesar de no lograrse la exitosa expresión de la proteína de interés, se estableció una metodología de trabajo efectiva para la expresión de proteínas recombinantes en el novedoso sistema de *Leishmania tarentolae*. Lo anterior abre una alternativa para ensayar la expresión de proteínas en este nuevo organismo que promete ser exitoso para aquellas proteínas que no se han logrado expresar en los sistemas de expresión convencionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Mancilla, J. C. R. P. C. L. A. (2012) El papel del Silicio en los Organismos y Ecosistemas, *Conciencia Tecnológica* 43, 42-46.
2. Ortuño, Á. V. (1999) *Introducción a la Química Industrial*, Barcelona, España.
3. Cornelis Klein & Cornelius S.Hurlbut, J. (1997) *Manual de Minerología*, 21 ed., Barcelona, España.
4. Yuan, R.-H. J. J.-J. (2011) Learning from Biosilica: Nanostructured Silicas and Their Coatings on Substrates by Programmable Approaches. , In *Advances in Biomimetics* (Cavrak, M., Ed.), p 958, InTech, China.
5. Sánchez-Puig, N., Guerra-Flores, E., López-Sánchez, F., Juárez Espinoza, P. A., Ruiz-Arellano, R., González-Muñoz, R., Arreguín-Espinosa, R., and Moreno, A. (2012) Controlling the morphology of silica-carbonate biomorphs using proteins involved in biomineralization, *J Mater Sci* 47, 2943-2950.
6. Otzen, D. (2012) The role of proteins in biosilicification, *Scientifica* 2012, 867562.
7. Schroder, H. C., Wang, X., Manfrin, A., Yu, S. H., Grebenjuk, V. A., Korzhev, M., Wiens, M., Schlossmacher, U., and Muller, W. E. (2012) Acquisition of structure-guiding and structure-forming properties during maturation from the pro-silicatein to the silicatein form, *The Journal of biological chemistry* 287, 22196-22205.
8. Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G. D., and Morse, D. E. (1998) Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6234-6238.
9. Cha, J. N., Shimizu, K., Zhou, Y., Christiansen, S. C., Chmelka, B. F., Stucky, G. D., and Morse, D. E. (1999) Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 361-365.
10. Bawazer, L. A., Izumi, M., Kolodin, D., Neilson, J. R., Schwenzer, B., and Morse, D. E. (2012) Evolutionary selection of enzymatically synthesized semiconductors from biomimetic mineralization vesicles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1705-1714.
11. Krasko, A., Schroder, H. C., Batel, R., Grebenjuk, V. A., Steffen, R., Muller, I. M., and Muller, W. E. (2002) Iron induces proliferation and morphogenesis in primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*, *DNA and cell biology* 21, 67-80.
12. Hayhurst, A., and Harris, W. J. (1999) Escherichia coli skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments, *Protein expression and purification* 15, 336-343.
13. García Fruitós Elena, G. M. N., Morell Montse, Vera Andrea, Ferraz Rosa María, Arís Anna, Ventura Alberto & Villaverde Antonio. (2005) Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins, *Microbial Cell Factories*.

14. Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., and Yura, T. (1998) Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* 64, 1694-1699.
15. Kushnir, S., Gase, K., Breitling, R., and Alexandrov, K. (2005) Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*, *Protein expression and purification* 42, 37-46.
16. Celik, E., and Calik, P. (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells, *Biotechnology advances* 30, 1108-1118.
17. Guerrero-Olazarán Martha, C.-B. E. L., Galán-Wong Luis J. y Viader-Salvadó José M. (2004) Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura, In *Avances en Nutrición Acuicola* Nuevo León, México.
18. Treanor, J. (2009) Recombinant proteins produced in insect cells, *Current topics in microbiology and immunology* 333, 211-225.
19. Kim, J. Y., Kim, Y. G., and Lee, G. M. (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential, *Applied microbiology and biotechnology* 93, 917-930.
20. Graham, S. V. (1995) Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida, *Parasitol Today* 11, 217-223.
21. Tania M. Cortázar, J. W. (2004) Manipulación genética y el estudio del parásito protozoario *Leishmania*, *Biomédica* 24, 438-455.
22. Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M., and Papadopoulou, B. (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element, *The Journal of biological chemistry* 277, 19511-19520.
23. Lee TI, Y. R. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes, *Annu Rev Genet* 34, 77-137.
24. LeBowitz, J. H., Coburn, C. M., McMahan-Pratt, D., and Beverley, S. M. (1990) Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 9736-9740.
25. Patnaik, P. K. (1997) Studies with artificial extrachromosomal elements in trypanosomatids: could specificity in the initiation of DNA replication be linked to that in transcription?, *Parasitol Today* 13, 468-471.
26. Sturm, N. R., and Campbell, D. A. (1999) The role of intron structures in trans-splicing and cap 4 formation for the *Leishmania* spliced leader RNA, *The Journal of biological chemistry* 274, 19361-19367.
27. Saxena, A., Worthey, E. A., Yan, S., Leland, A., Stuart, K. D., and Myler, P. J. (2003) Evaluation of differential gene expression in *Leishmania* major Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis, *Molecular and biochemical parasitology* 129, 103-114.
28. Almeida, R., Gilmartin, B. J., McCann, S. H., Norrish, A., Ivens, A. C., Lawson, D., Levick, M. P., Smith, D. F., Dyall, S. D., Vetrie, D., Freeman, T. C., Coulson, R. M., Sampaio, I., Schneider, H., and Blackwell, J. M. (2004) Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome, *Molecular and biochemical parasitology* 136, 87-100.

29. Roy, G., Dumas, C., Sereno, D., Wu, Y., Singh, A. K., Tremblay, M. J., Ouellette, M., Olivier, M., and Papadopoulou, B. (2000) Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models, *Molecular and biochemical parasitology* 110, 195-206.
 30. Klatt, S., Rohe, M., Alagesan, K., Kolarich, D., Konthur, Z., and Hartl, D. (2013) Production of glycosylated soluble amyloid precursor protein alpha (sAPPalpha) in *Leishmania tarentolae*, *Journal of proteome research* 12, 396-403.
 31. Bioscience, J. (2009) Handbook pLEXSY-2 Expression Vector, p 4, Germany.
 32. Harvey Lodish, A. B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Lawrence Zipursky, James Darnell. (2005) Técnicas de genética molecular y genómica, In *Biología Celular y Molecular* (Panamericana, E. M., Ed.) Quinta ed., p 378.
 33. Sambrook Joseph, R. D. (2011) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Vol. 1, Tercera ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 34. Voet, D. V. J. G. (2006) *Bioquímica*, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
 35. Duhalt, H. G. A. y. R. V. (1998) Cuantificación de Proteínas: una revisión, *BioTecnología* 3, 12.
 36. Phan, H. P., Sugino, M., and Niimi, T. (2009) The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system, *Protein expression and purification* 68, 79-84.
-