



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Purificación y caracterización de la darpina® con un
módulo de repetición de anquirina denominada 57a10**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Biólogo**

P R E S E N T A:

DIEGO NÁJERA BENAVIDES



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ITZHEL GARCÍA TORRES**

CIUDAD DE MÉXICO, 2018



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del Alumno

Diego Nájera Benavides

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311265862

2. Datos del tutor

Dra. Itzhel García Torres

3. Datos del Sinodal 1

Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort

4. Datos del Sinodal 2

Dr. Sergio Enríquez Flores

5. Datos del Sinodal 3

Dra. Laura del Carmen Vargas Parada

6. Datos del Sinodal 4

Dra. Edén Marcela Rodríguez Flores

7. Datos del trabajo escrito

Purificación y caracterización de la darpina® con un módulo de repetición de anquirina denominada 57a10.

71 p.

2018

Agradecimientos Académicos.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Itzhel García Torres en el grupo de estudio de Biomoléculas y Salud Infantil del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz del Instituto Nacional de Pediatría.

Se reconoce la asesoría técnica de la Técnico Académico Nallely Cabrera González, del departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Esta tesis forma parte del proyecto titulado “Desarrollo de una biblioteca de proteínas de alta afinidad que reconozcan blancos biológicos para el diagnóstico oportuno de enfermedades de relevancia en salud pública”, apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) con número de registro 221583, y por Recursos Federales del Instituto Nacional de Pediatría con número de registro 053/2014.

Así mismo, para el desarrollo del presente trabajo de tesis se contó con materiales, reactivos y equipos de los proyectos CONACyT 241343, CONACyT 259105 a cargo del Dr. Gabriel López Velázquez y Dr. Sergio Enríquez Flores, respectivamente. Y con el apoyo de Recursos Federales del Instituto Nacional de Pediatría a los proyectos 051/2014, 052/2014 y 054/2014 cuyos investigadores responsables son los Dres. Gabriel López Velázquez, Sergio Enríquez Flores y José Ignacio de la Mora, respectivamente.

Para la culminación de esta tesis se contó con una beca de licenciatura otorgada por CONACyT con número de registro 26649.

Agradecimientos

A María Enriqueta Benavides Hernández, Alonso Nájera Benavides y Camus Nájera cuyo apoyo y motivación incondicional siempre y más en los tiempos duros fueron cruciales para que esto pudiera llevarse a cabo. También en memoria de Juan Nájera Velázquez cuyo ejemplo y enseñanzas fueron invaluable.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por el enorme conocimiento, oportunidades y recursos brindados durante estos años, los cuales me abrieron puertas hacia panoramas desconocidos para mí.

A mi tutora la Dra. Itzhel García Torres por sus valiosas enseñanzas, consejos, dedicación y paciencia durante este tiempo. Así mismo a los sinodales que formaron parte de mi jurado: Dr. Ruy Pérez, Dr. Sergio Enríquez, Dra. Laura Vargas y Dra. Edén Rodríguez por su disponibilidad y sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A Mercedes Cervantes López por su apoyo y compañía durante estos pocos pero muy buenos años, de igual manera a mis compañeros de laboratorio Uriel y Karla Daniela. A todos y cada uno de mis amigos dentro y fuera de la facultad, entre los principales: Lucero, Lalo, Sofía, Iram, Luisa, Alejandra Estrada, H, Alfredo, Ludwig, Carlos y Alejandro Parada, Jorge, Rodrigo, Alex, Diana Arzate, Kelly, Marianna, Carolina VM, Rubí, Pablo, Diana Gorozpe, Andrea, Ana, Sara, Javier, Salvador, Emmanuel, Carolina Montserrat, Vanessa, Ingrid y Alejandra Agudelo. Porque sus conocimientos y diversos puntos de vista aportaron a mi formación de biólogo, además los buenos ratos de conversación y fiesta con ustedes podían borrar mis ratos de amargura.

Por último al resto de los miembros de mi familia, cuya ayuda a sido invaluable y siempre ha estado presente.

Índice	Página
Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Proteínas con repeticiones de anquirina: precursoras de las darpinas.....	3
1.2 Diseño de las darpinas.....	4
1.3 Características estructurales de las darpinas.....	6
1.4 Otras características relevantes de las darpinas.....	9
1.5 Usos y aplicaciones de las darpinas en distintas áreas de investigación.....	10
2. Justificación.....	14
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivo General.....	15
3.2 Objetivos Particulares.....	15
4. Materiales y Métodos.....	16
4.1 Selección de la proteína con un módulo de anquirina 57a10, como objeto de estudio de este trabajo de investigación.	16
4.2 Subclonación del gen que codifica a la darpina 57a10 en el plásmido de sobreexpresión pET3aHisTEV.	16
4.3 Sobreexpresión y purificación de la Proteína 57 a10.	18
4.4 Digestión de la etiqueta de histidinas de 57a10, por acción de la proteasa del virus del tabaco.	19
4.5 Análisis de los pasos de purificación de la darpina 57a10 mediante SDS-PAGE.	20
4.6 Evaluación de tres métodos de cuantificación colorimétricos para determinar la concentración de la proteína 57a10.	20
4.6.1 Determinación de la concentración de 57a10.	21
4.7 Caracterización estructural de la darpina 57a10.	22
4.7.1 Análisis de la estructura secundaria de la darpina 57a10 por medio de difracción circular.	22
4.7.2 Análisis de la estabilidad térmica de la darpina 57a10 por medio de difracción circular.	23
4.8 Interacción de la darpina 57a10 con proteínas solubles del parásito <i>Giardia lamblia</i> ..	23
4.8.1 Estandarización de las condiciones de unión de la darpina a la resina acoplada a Níquel.	24

4.8.2	Obtención de las proteínas solubles del parásito <i>Giardia lamblia</i> .	26
4.8.3	Interacción de 57a10 con proteínas solubles de <i>Giardia lamblia</i> .	27
4.8.4	Evaluación de la unión inespecífica de proteínas solubles de <i>Giardia lamblia</i> a la resina acoplada a níquel.	28
4.9	Análisis de la pérdida espontánea de la etiqueta de histidinas de 57a10 a través del tiempo.	30
5.	Resultados	31
5.1	Secuencia de la darpina 57a10 en el plásmido de sobreexpresión pET-3aHisTEV.	31
5.2	Purificación de la darpina 57a10.	33
5.3	Evaluación de diferentes métodos colorimétricos para cuantificar la proteína 57a10.	35
5.4	Rendimientos de las purificaciones de la darpina 57a10.	37
5.5	Caracterización estructural de la darpina 57a10.	38
5.5.1	Determinación de la estructura secundaria por Dicroísmo Circular.	38
5.5.2	Efecto de la temperatura en la estructura secundaria de la proteína 57a10, seguida por dicroísmo circular.	39
5.6	Interacción de la darpina 57a10 con proteínas de la fracción soluble de lisado del parásito <i>Giardia lamblia</i> .	41
5.6.1	Estandarización de las condiciones para llevar a cabo la Interacción entre la darpina 57a10 y proteínas solubles de <i>Giardia lamblia</i> .	41
5.6.2	Interacción entre la darpina 57a10 y proteínas de la fracción soluble de <i>Giardia lamblia</i> .	45
5.6.3	Evaluación de la unión inespecífica de proteínas solubles de <i>Giardia lamblia</i> a la resina acoplada a níquel.	47
5.7	Análisis de la posible pérdida de la etiqueta de histidinas de manera espontánea por parte de 57a10 a través del tiempo.	48
6.	Discusión	50
7.	Conclusión	58
8.	Perspectivas	59
9.	Referencias	60
10.	Anexo	65

Abreviaturas

ARs - Proteínas con repeticiones de anquirina

Darpina – Proteína diseñada con repetición de anquirina

IPTG - Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB - Luria Bertani

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

kDa – Kilo dalton

IMAC - Cromatografía de afinidad acoplada a iones metálicos

SDS - Dodecilsulfato sódico

PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida

TEVp - Proteasa del virus del tabaco

TIM - Triosa fosfato isomerasa

T_m - Temperatura media de desnaturalización

PMSF - Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo

DO – Densidad óptica

E64 - L -trans-epoxisuccinil- leucilamida (4-guanidino)-butano

pM - Pico Molar

Å - Ångström

RESUMEN

Las darpinas son un grupo de proteínas sintéticas de diseño y conformadas por módulos de repetición de anquirina, las cuales tienen la capacidad de interactuar con alta especificidad con determinados blancos proteicos. Las darpinas surgen a partir de las anquirinas, que son proteínas que regulan interacciones proteína-proteína en numerosas especies. La principal característica de estas proteínas es su módulo de repetición cuyo número varía entre darpinas. El módulo está compuesto, por aminoácidos conservados, que mantienen la estabilidad de la proteína, y siete aminoácidos variables, los cuales se encargan de que la darpina interactúe con sus blancos específicos.

Actualmente existen numerosos reportes acerca de las darpinas de más de 2 módulos. Sin embargo a la fecha no hay estudios acerca de darpinas de un módulo. En este trabajo de tesis se purificó y caracterizó una proteína con un módulo de repetición de anquirina, denominada 57a10; cuya secuencia se tomó de una biblioteca genómica de darpinas de un módulo elaborada previamente en el laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría.

Dentro de las características más notables de esta proteína se encuentra su termoestabilidad de 51.8°C y que es comparable con la temperatura media de desnaturalización (T_m) reportada para darpinas de dos y tres módulos. Por otro lado, su desnaturalización por temperatura es reversible, ya que después de la desnaturalización térmica, una vez que se enfría, recupera en un 80% su estructura secundaria. Por último, se evaluó la interacción de la darpina 57a10 con proteínas de la fracción soluble de lisado celular del parásito intestinal *Giardia lamblia*. Esto se realizó con la finalidad de evaluar la afinidad de 57a10 por alguna proteína de este parásito y la posible aplicación a futuro de esta darpina como agente terapéutico o diagnóstico de la giardiasis. Como resultado de este análisis, 57a10 mostró afinidad por una proteína con peso aproximado de 66 kDa, la cual, en un futuro próximo, será identificada por medio de espectrometría de masas.

1. Introducción

1.1 Proteínas con repeticiones de anquirina: precursoras de las darpinas

Las proteínas con repeticiones de anquirina o ARs, son un grupo de proteínas que están compuestas principalmente, por un número variable de módulos de repetición generalmente de 33 aminoácidos; y están presentes de manera abundante a nivel biológico, se ha demostrado su presencia en los 3 dominios representados por Archea, Bacteria y Eukarya (Jernigan K., *et al*,2014).

Las anquirinas regulan numerosas interacciones proteína-proteína involucradas en diferentes eventos celulares como la traducción de señales, la regulación del ciclo celular, la respuesta inflamatoria y la regulación de la transcripción, entre otras. (Mosavi, *et al*, 2004). Además, se ha visto que estas proteínas pueden adaptarse con facilidad a diferentes ambientes ya que en las diferentes especies en las que se encuentran se ha observado la presencia de anquirinas tanto en el medio intracelular como en el extracelular.

Estas proteínas se reportaron por primera vez en 3 organismos. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se reportaron cuatro repeticiones de anquirinas acopladas a la estructura de la proteína SWi6 (Sun Hee Leem *et al*, 1998), la cual actúa como factor de transcripción durante el ciclo celular de este organismo. En el *Homo sapiens* se reportó una anquirina presente en los eritrocitos, la cual lleva a cabo la función de unir la espectrina al dominio citoplasmático del eritrocito y se denominó anquirina 1 o R (Gallagher P., *et al*, 1997). Por último, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se reportó una anquirina, que fue denominada como anquirina número 2 o anquirina B, la cual participa en el mantenimiento y regulación de la estabilidad sináptica, (Breedon y Nasmyth, 1987).

1.2 Diseño de las darpinas

A partir de las proteínas con repeticiones de anquirina se diseñaron las darpinas, las cuales reciben este nombre por sus siglas en inglés (Designed Ankyrin Repeat Proteins). Se pueden definir como un grupo de proteínas sintéticas con capacidad de interactuar con alta afinidad con blancos específicos (Stumpp M. *et al*, 2008). A diferencia de los módulos de repetición de las anquirinas, los cuales ya están establecidos de forma natural, los módulos de repetición de las darpinas se unen de manera selectiva y específica.

Los primeros acercamientos en el diseño y generación de darpinas con cubiertas en los extremos amino y carboxilo terminal para que tuvieran la capacidad de ser solubles, fueron estudios realizados por Binz H., y colaboradores en el 2003, en donde se produjeron bibliotecas de DNA que codificaban para darpinas de 2, 3 y 4 módulos de repetición. Para elaborar estas darpinas fue necesario unir las secuencias de las cubiertas de los extremos amino y carboxilo terminal con las secuencias de los módulos de repetición.

Para definir los aminoácidos de los módulos de repetición, se elaboraron 4 consensos (A, B, C, D), tomando como punto de partida la secuencia obtenida por Sedgwick y Smerdon (1999) (Fig. 1). Los consensos A, B y C, se basaron en diferentes alineamientos de secuencias de aminoácidos de ARs reportadas en las bases de datos SMART y en el GenBank, empleando herramientas bioinformáticas como el programa BLAST. El consenso D consistió en un análisis estructural en el que se compararon las coordenadas cristalográficas de 10 anquirinas reportadas hasta ese momento en el Protein Data Bank (PDB), tomando como base los aminoácidos obtenidos en el consenso C. De esta manera, se definieron los residuos de aminoácidos encargados de llevar a cabo la interacción con blancos específicos. En estos residuos puede haber cualquier aminoácido, a excepción de glicina (G), prolina (P) y cisteína (C), los cuales son

desfavorables para la estructura de la proteína. Estos consensos permitieron definir los aminoácidos altamente conservados.

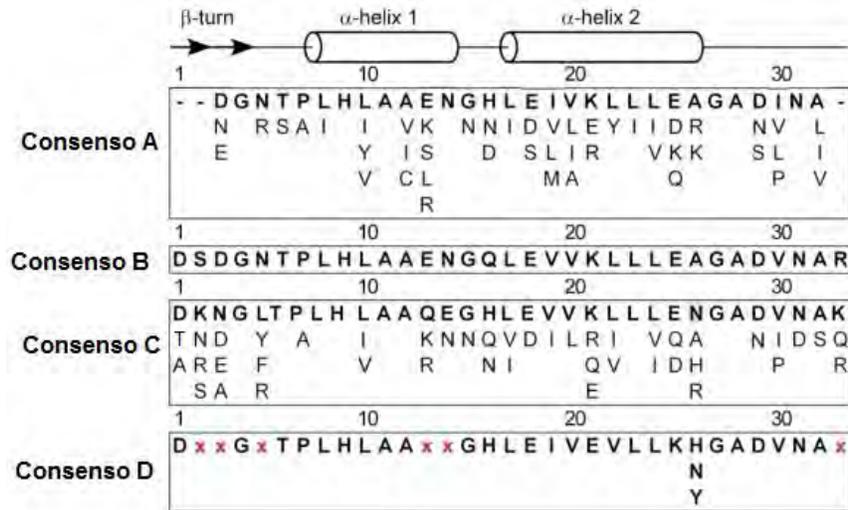


Figura 1. Consensos realizados para el diseño del módulo de repetición de anquirina. El consenso A se realizó a partir de la base de datos SMART en el que se definieron los residuos 2 – 32. En el consenso B se sustituyeron los residuos no conservados por residuos presentes en las secuencias de anquirinas reportadas en el GenBank. En el consenso C se utilizaron las secuencias reportadas en el GenBank para refinar los residuos 1, 2 y 33 que se definieron en el consenso B. Por último, en el consenso D se determinaron las posiciones correspondientes a los residuos de aminoácidos variables los cuales se marcan con una X. Imagen tomada y modificada (Binz H, *et al*, 2003).

Una vez diseñados los módulos de repetición, se flanquearon con 2 cubiertas, en los extremos amino y carboxilo terminal, las cuales protegen y brindan estabilidad a los módulos de repetición. A partir de estas secuencias, se generaron bibliotecas genómicas de darpinas, conformadas por vectores de sobreexpresión que contienen genes que codifican para diferentes darpinas (Binz H, *et al*, 2003).

El método de selección de darpinas para el reconocimiento de blancos específicos a partir de estas bibliotecas se ha llevado a cabo mediante la técnica del despliegue del ribosoma (Tamaskovic R. *et al*, 2012). Esta técnica es un método *in vitro* para selección de péptidos y proteínas. Una de las ventajas que presenta con respecto a otros métodos de selección es que la biblioteca de estudio no está limitada por la eficiencia de transformación de las bacterias y sólo se limita por el

número de ribosomas y por las moléculas de RNAm presentes (Zahnd C. *et al*, 2007).

1.3 Características estructurales de las darpinas

El estudio de las diferentes proteínas con dominios de anquirina presentes en la naturaleza ha aportado conocimiento acerca de las características estructurales que deben tener las darpinas para ser estructuralmente estables así como capaces de establecer interacciones específicas con diferentes proteínas, que es donde reside la principal función de estas proteínas. A continuación se abordan con más detalle algunas de sus características.

Módulo de repetición: Estas proteínas, al igual que las anquirinas, están compuestas por un número variable de módulos de repetición, generalmente de 33 residuos de aminoácidos. La estructura secundaria del módulo variable consiste en un giro β , 2 hélices α anti paralelas y un asa, la cual se une al giro β del siguiente módulo de repetición (Sedgwick y Smerdon, 1999). El módulo de repetición por si sólo presenta un tamaño aproximado de 3.5 kDa. La gran mayoría de las darpinas reportadas hasta el momento se componen de 4 a 6 módulos por lo que sus pesos moleculares oscilan entre 14 y 21 kDa (Stumpp M. *et al*, 2008).

En cada uno de sus módulos de repetición las darpinas presentan una serie de aminoácidos importantes para su funcionamiento. Por un lado, en la parte expuesta al solvente presentan 7 posiciones variables que caracterizan a cada darpina como única y le confieren especificidad hacia sus blancos (Fig.2a). Por otro lado, en la parte central se encuentran una serie de residuos de aminoácidos alifáticos como: leucina (L) en las posiciones 8, 23 y 24, alanina (A) en las posiciones 11, 12 y 28, valina (V) en las posiciones 20 y 30 y la isoleucina (I) en la posición 19 lo que le confiere al módulo de repetición una naturaleza hidrofóbica debido a la cadena lateral que presentan estos aminoácidos (Fig. 2b) (Binz H, *et al*, 2003).

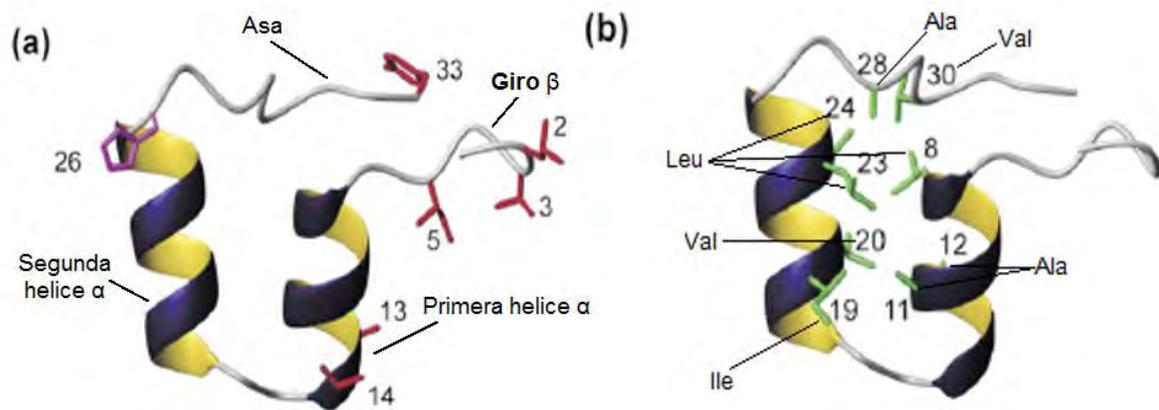


Figura 2. Elementos que conforman a los módulos de repetición de las darpinas. a) Módulo de repetición de anquirina. Constituido por un giro β , 2 hélices α y un asa. En rojo se indican los 7 aminoácidos variables, los cuales son característicos para cada darpina. b) Núcleo del módulo de repetición, en color verde se indican los aminoácidos alifáticos, los cuales confieren una naturaleza hidrofóbica a este módulo. Imagen tomada y modificada (Binz H, *et al*, 2003).

Cubiertas en los extremos amino y carboxilo terminal: Los módulos de repetición de las darpinas son altamente hidrofóbicos por lo que por sí solos no podrían ser solubles, ni plegarse de manera correcta. Esto se corroboró en el trabajo reportado por Leila K. Mosavi y colaboradores en el año 2002, donde intentaron purificar darpinas de 1 a 4 módulos de repetición sin cubiertas en los extremos terminales. Las darpinas de 1 módulo no pudieron plegarse bajo ninguna de las condiciones de pH ensayadas, las darpinas de 2 módulos se lograron plegar parcialmente y, únicamente, las darpinas de 3 y 4 módulos se plegaron de manera correcta. Trabajos posteriores (Binz H., *et al* 2003, Seeger M., 2013), en los cuales los módulos de repetición se flanquearon con cubiertas de 28 aminoácidos en los extremos N-terminal y C-terminal (Fig.3), demostraron la importancia de estas cubiertas, para favorecer el correcto plegamiento de las darpinas evitando así la formación de cuerpos de inclusión (Tamaskovic R. *et al*, 2012).

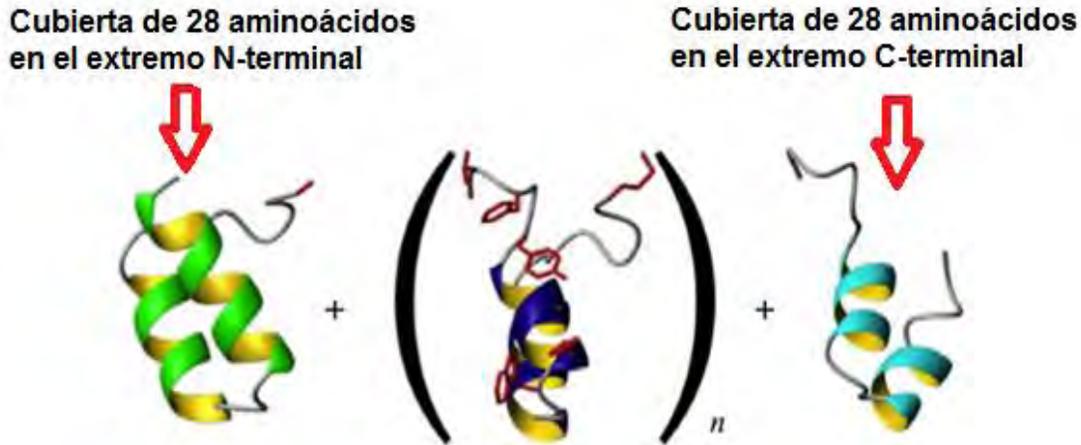


Figura 3. Módulo de repetición de una darpina, flanqueado con las cubiertas amino y carboxilo terminal. Las cubiertas de 28 aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran señaladas con flechas y son éstas las que favorecen que la proteína sea soluble. Imagen tomada y modificada (Binz H, *et al*, 2003).

Motivo altamente conservado: A pesar de que las darpinas tienen la capacidad para unirse de manera específica a diferentes blancos debido a sus residuos variables, también poseen una serie de residuos de aminoácidos altamente conservados. Este motivo está compuesto por los aminoácidos treonina ₆ (T), prolina ₇ (P), leucina ₈ (L), histidina ₉ (H), leucina ₁₀ (L), alanina ₁₁ (A) y alanina ₁₂ (A) o bien, el motivo TPLHLAA (Fig. 4). Estos residuos favorecen una red de puentes de hidrógeno que le brindan estabilidad a estas proteínas, principalmente entre los residuos de T e H ubicados en las posiciones 6 y 9 respectivamente (Binz H., *et al*, 2003).

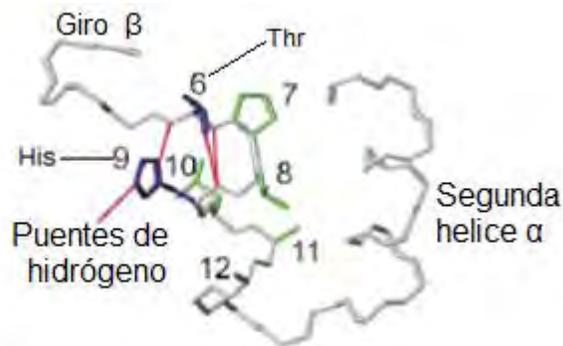


Figura 4. Motivo altamente conservado. La región numerada 6-12 corresponde al motivo TPLHLAA, las líneas de color rojo corresponden a los puentes de hidrógeno formados entre la histidina (H) y la treonina (T). Imagen tomada y modificada (Binz H., *et al*, 2003).

1.4 Otras características relevantes de las darpinas

Además de lo antes mencionado, las darpinas también presentan otras características que merecen atención como: su termoestabilidad, ventajas con respecto a los anticuerpos, su adecuada sobreexpresión en el citoplasma de *Escherichia coli*, en forma de proteínas solubles, y sus altos rendimientos de purificación.

Las darpinas presentan una mayor termoestabilidad con respecto a las ARs y una alta resistencia a la desnaturalización por temperatura. Las darpinas caracterizadas hasta el momento de 2 a 6 módulos de repetición presentan temperaturas medias de desnaturalización (T_m) de 66 a 85 °C, mientras que las T_m reportadas para ARs de 2 a 5 módulos, se encuentran igual o por debajo de los 50 °C. Ligado a esto se ha reportado una relación directamente proporcional entre la termoestabilidad y el número de módulos variables que contenga la darpina (Binz H., *et al*, 2003; Tamaskovic R. *et al*, 2012, Moody P., *et al*, 2014).

La gran capacidad de interacción de las darpinas con blancos específicos ha sugerido la aplicación de estas proteínas como una alternativa al uso de anticuerpos debido a las ventajas que presentan respecto a éstos. Entre estas ventajas tenemos su tamaño. Las darpinas reportadas hasta el momento presentan un peso molecular entre 14 a 21 kDa lo cual es menor que el fragmento Fab, el cual es el fragmento de anticuerpo más pequeño utilizado hasta el momento con un peso molecular de 50 kDa (Poljak R., 1973). El tamaño reducido de las darpinas es una de las características que les permite penetrar con mayor facilidad a los tejidos, e interaccionar más fácil con los sitios de acción de los ligandos produciendo una inhibición más fuerte. Además, las darpinas carecen del fragmento Fc lo que evita que se pueda generar una reacción causada por parte del sistema inmune (Stumpp M. *et al*, 2008).

Otra ventaja que presentan las darpinas es que carecen de cisteínas, por lo que no requieren formar puentes disulfuro para estabilizar su estructura favoreciendo su sobreexpresión de manera fácil y eficiente en el citoplasma bacteriano con altos

rendimientos de purificación. Los rendimientos de darpinas purificadas mediante el método de cromatografía de afinidad acoplada a ion metálico (IMAC) van de 25 a 200 mg por litro de cultivo celular, lo que favorece una reducción en los costos de producción y en los tiempos de espera con respecto a lo requerido en la producción de anticuerpos por inmunización de animales (Tamaskovic R., *et al*, 2012; Stumpp M. *et al*, 2008; Milovnik P., *et al*, 2009).

1.5 Usos y aplicaciones de la darpinas en distintas áreas de investigación

Debido a las características tan distintivas que presentan las darpinas se les han dado diferentes aplicaciones en diversas áreas. En la literatura existen varios ejemplos del uso de darpinas en el área de la investigación médica que se describen a continuación.

En el trabajo realizado por Nikolas Stefan y colaboradores en el 2011 se evaluó la efectividad de las darpinas como posible método de diagnóstico en tumores. Esto se llevó a cabo evaluando la interacción entre una darpina de 3 módulos de repetición, denominada Eph1n, y las moléculas de adhesión de las células epiteliales (EpCAM). Se utilizaron como blanco las EpCAM debido a sus propiedades como indicadores tumorales. Las EpCAM se encuentran poco expresadas en las superficies de las células vasolaterales en epitelio sano, mientras que en células tumorales sus niveles se elevan de manera considerable. La interacción entre la darpina y las EpCAM se monitoreó por medio de citometría de flujo. La darpina evaluada se fusionó con la proteína verde fluorescente y, mediante ensayos de inmunofluorescencia, se evaluó la interacción entre estas 2 moléculas, observándose una fluorescencia mayor en presencia de las EpCAM. La afinidad entre la darpina y las EpCAM resultó en un valor de 86 pico Molar (pM). De esta manera, Stefan y colaboradores proponen a la darpina Eph1n como un futuro agente de diagnóstico de tumores.

Existen algunos estudios de utilización de darpinas en el área de la oftalmología en el tratamiento del edema macular diabético, el cual es una enfermedad caracterizada por la pérdida de la visión debido a la acumulación de líquido en la capa nuclear interna de la retina y es un padecimiento muy frecuente en pacientes con diabetes mellitus (Andonegui J. y Jiménez L., 2008). Uno de los primeros trabajos donde se evaluó el uso de las darpinas para el tratamiento de edema macular diabético, fue el trabajo de Campochiaro P. y colaboradores en el 2013, donde se evaluó la unión entre una darpina denominada MP0112 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Esto con el objetivo de que las darpinas puedan regular la actividad de VEGF, la cual a su vez estimula la formación del edema macular diabético. De esta manera se propuso utilizar a MP0112 como una alternativa a los anticuerpos convencionales utilizados en el tratamiento de esta enfermedad como son Ranibizumab y Bevacizumab. En este trabajo se observó que MP0112 se unía a todas las isoformas VEGF con una afinidad de 2 pM y su efecto era más duradero que el de los anticuerpos, por lo que actualmente la empresa Molecular Partners AG ha utilizado a MP0112 bajo el nombre de Abicipar. En la actualidad Abicipar, se encuentra en pruebas de fase 2 en el tratamiento del edema macular diabético donde el grupo de personas tratadas con la darpina MP0112 ha mostrado una mejoría significativa.

Otra aplicación importante que se le ha dado a las darpinas es su uso como chaperona en la cristalización de proteínas. El trabajo de Monroe N. del 2011 muestra el uso de darpinas de 3 módulos para llevar a cabo la cristalización de la proteína trimérica AcrB compuesta por las subunidades A, B y C. Esta proteína está presente en *E. coli*, y es una proteína de membrana perteneciente a la familia RND cuya función principal es el transporte de fármacos. El objetivo de del trabajo de Monroe consistía en obtener una estructura con mejor resolución de esta proteína ya que sólo se tenía una estructura cristalográfica a una resolución de 2.7 Å (Pos *et al.*, 2004). Se pusieron a prueba 9 darpinas de 3 módulos. De esas, sólo se pudo obtener la estructura cristalográfica del complejo darpina-AcrB de 3. Las interacciones entre estas darpinas y su respectivo blanco se analizaron

explorando computacionalmente las estructuras cristalográficas. Se vio que el triptófano₈₀₉ (W) y la tirosina₈₁₁ (Y) de la superficie de AcrB interactuaban con los aminoácidos variables del primer módulo de repetición. La interacción entre AcrB y la darpina denominada como número 1 generó una estructura cristalográfica a una resolución de 2.5 Å, mientras que las otras 2 generaron resoluciones mayores a 3 Å.

El primer módulo variable de la darpina no.1 presentaba en su mayoría aminoácidos aromáticos (W y F) y alifáticos (V e I), los cuales favorecieron que se obtuviera esta resolución debido a que a pesar de que la interacción se llevó a cabo de la misma manera en las 3 darpinas, la composición de aminoácidos particular de cada una provocó un acomodo diferente en cada cristal.

Como ya se mencionó, las darpinas han sido ampliamente utilizada en diversas áreas de la investigación, sin embargo todos los trabajos reportados hasta la fecha emplean darpinas de 4 a 6 módulos de repetición y en algunos casos darpinas de 2 y 3 módulos. Actualmente no hay reportes de la caracterización y uso de darpinas de un módulo debido a que se han reportado como inestables por lo que este trabajo es uno de los primeros reportes sobre la purificación y caracterización de una darpina con un módulo de repetición.

Otro aspecto importante de mencionar es que a pesar de los múltiples trabajos que involucran el uso de darpinas en el área de la biomedicina, actualmente no hay reportes de trabajos que evalúen la interacción de darpinas con organismos parasitarios. Los cuales son altamente prevalentes en nuestro país, tal es el caso de las infecciones provocadas por *Entamoeba*, cuyo número de casos reportados hasta la semana epidemiológica 28 del año 2018, es 111,403. Por otro lado, los casos reportados para enfermedades provocadas por otros protozoarios son de 38,996 dentro de las cuales se encuentra la giardiasis, con 6.103 casos, (Boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud de México, 2018). Por tal motivo, en el presente trabajo de investigación se propone acercar la tecnología de las darpinas

en la búsqueda de proteínas blanco para su posible uso diagnóstico o terapéutico en la giardiasis.

En el laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría, una de las líneas centrales de investigación es el estudio del protozooario *Giardia lamblia*, parásito intestinal causante de la giardiasis. Este padecimiento se caracteriza por generar diarreas agudas y mala absorción de nutrientes. Debido a que *Giardia lamblia* es un parásito cosmopolita, desde hace tiempo ha generado problemas de salud en todo el mundo, sin embargo, tiene mayor prevalencia en países en vías de desarrollo y el sector de la población más vulnerable es el sector infantil, así como personas inmunocomprometidas y de la tercera edad. (Blandina T, *et al*, 2017). El número de casos reportados y la gran distribución e incidencia mundial de la giardiasis (Escobedo AA, *et al*, 2018) ha dado pauta a diversos esfuerzos en la mejora de los fármacos de uso común o bien la caracterización de nuevos blancos terapéuticos, con el propósito de erradicar o disminuir la incidencia de esta enfermedad. Algunos investigadores han caracterizado biomoléculas esenciales de este organismo con el propósito de valorar su potencial farmacológico obteniendo algunos avances al respecto (Hjøllo T, *et al*, 2018). Por lo anterior, en este trabajo se pretende caracterizar funcional y estructuralmente la darpina (con un módulo de anquirina) 57a10, para identificar potenciales blancos proteicos en este parásito cosmopolita de importancia en la salud y causante de la giardiasis.

2. Justificación

Las darpinas son proteínas diseñadas para interactuar con blancos proteicos, la mayoría de las aplicaciones documentadas a la fecha involucran darpinas de más de un módulo. Las darpinas con un sólo módulo han sido poco estudiadas y muchas veces descartadas, debido a que diversos estudios las definen como inestables y difíciles de purificar. En el presente trabajo de investigación se propone purificar y caracterizar la darpina 57a10, la cual cuenta con un módulo de anquirina, con la finalidad de aportar información sobre las características de esta proteína y evaluar sus posibles aplicaciones a futuro.

Adicionalmente, la tecnología de las darpinas no ha sido aplicada al estudio de las enfermedades parasitarias, por lo que también se aprovechará a la darpina 57a10 y se probará su potencial para interactuar con proteínas solubles de *Giardia lamblia*.

3. Objetivos

3.1 Generales:

- Purificar y determinar las características estructurales y funcionales de la darpina 57a10 (proteína con un módulo de repetición de anquirina).

3.2 Particulares:

- Subclonar el gen de la darpina 57a10 en el plásmido de sobreexpresión pET-3aHisTEV
- Sobreexpresar la darpina 57a10 en cultivos de *E. coli* de la cepa BL21DE3plysS.
- Purificar la darpina 57a10 mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados.
- Comparar tres métodos de cuantificación de proteínas para determinar la concentración de la darpina 57a10.
- Determinar la estructura secundaria de la darpina 57a10 mediante dicroísmo circular.
- Determinar la termoestabilidad de la darpina 57a10 mediante dicroísmo circular a 222 nm.
- Poner a reaccionar a la darpina 57a10 con un lisado celular de *Giardia lamblia* con el fin de evaluar su posible interacción con proteínas solubles de este parásito.

4. Materiales y Métodos

4.1 Selección de la proteína con un módulo de anquirina 57a10, como objeto de estudio de este trabajo de investigación

Debido a las características de sus aminoácidos variables se seleccionó a la darpina 57a10. A partir de una biblioteca de darpinas de un módulo de repetición, elaborada previamente en el laboratorio, se seleccionó la clona que contenía el gen de esta darpina. Algunos detalles de la obtención de esta biblioteca se mencionan en el anexo 1.

4.2 Subclonación del gen que codifica a la darpina 57a10 en el plásmido de sobreexpresión pET3aHisTEV

Los genes contenidos en la biblioteca de darpinas de un módulo se encuentran clonados en el plásmido de sobreexpresión pET3a. Con el fin de llevar a cabo la purificación de 57a10 mediante cromatografía de afinidad acoplada a ion metálico, se subclonó la secuencia codificante para la darpina 57a10 del plásmido pET3a al plásmido de sobreexpresión pET3aHisTEV (Enríquez Flores *et al*, 2011). Éste último posee la secuencia que codifica para una etiqueta de 6 histidinas, antecedido de la secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (pTEV) que se ubicará en el extremo amino terminal de la proteína de interés.

El plásmido pET3aHisTEV contiene en el sitio múltiple de clonación y los sitios de restricción NdeI y BamHI los cuales son los sitios de restricción que flanquean a la secuencia de la darpina 57a10 en el plásmido pET-3a. De esta forma, tanto el plásmido pET3a_57a10 como el plásmido pET3aHisTEV se digirieron con estas 2 enzimas de restricción para así insertar mediante una reacción de ligación la secuencia de 57a10 utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Fig. 5).

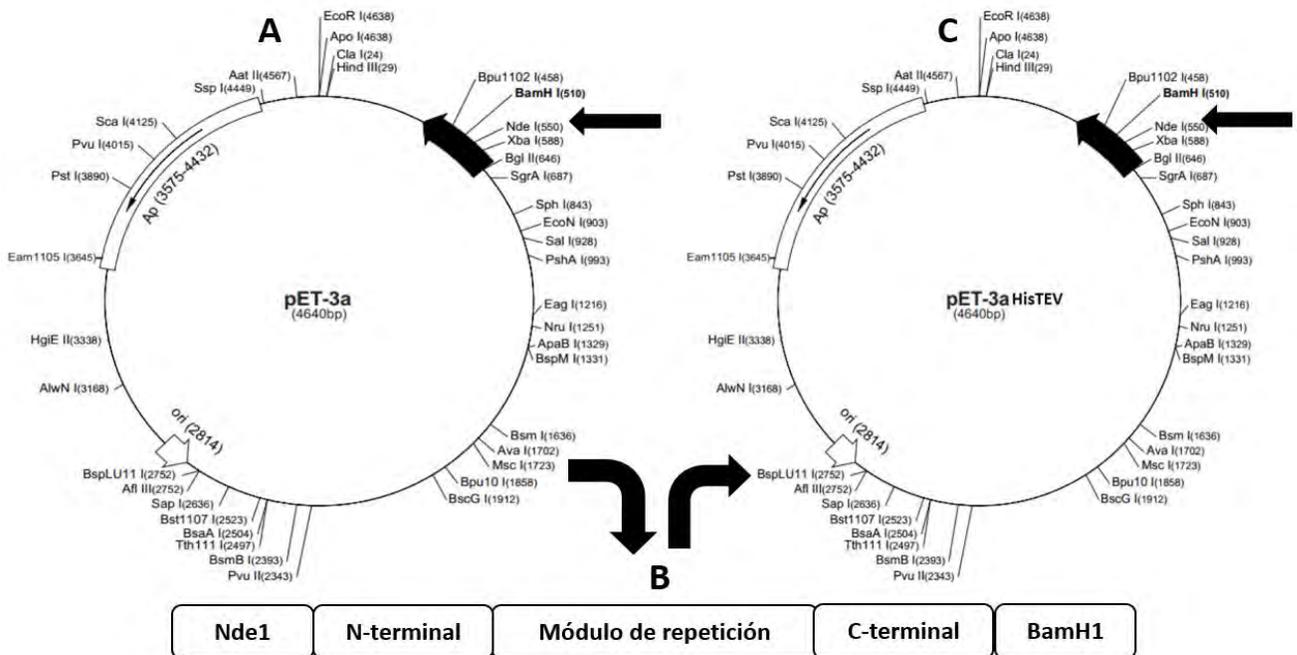


Figura 5. Subclonación de la secuencia de 57a10 del plásmido pET-3a al plásmido de sobreexpresión pET-3aHisTEV. A) Plásmido pET-3a, donde se señala con una flecha los sitios de restricción NdeI y BamHI. B) Representación gráfica de la construcción de la secuencia codificante para 57a10 que incluye las cubiertas en el extremo amino y carboxilo terminal. La secuencia de la darpina está flanqueada por los sitios de restricción NdeI y BamHI. C) Plásmido pET-3aHisTEV, donde se señala con una flecha los sitios de restricción NdeI y BamHI.

Para corroborar que la secuencia nucleotídica codificante para la proteína 57a10 se insertó debidamente en el plásmido pET-3aHisTEV se secuenció mediante el método de Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Con el DNA secuenciado se transformaron células competentes de *Escherichia coli* Top 10 y BL21DE3pLysS y a ambos cultivos se les agregó glicerol al 9% con el fin de almacenarlos a -70°C hasta su uso.

4.3 Sobreexpresión y purificación de la darpina 57a10

Se sembró un precultivo en medio sólido suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml tomando una asada del cultivo almacenado en glicerol al 9% que contenía el plásmido pET3aHisTEV con la secuencia de DNA codificante para la darpina 57a10 y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se cosecharon las bacterias y fueron resuspendidas en 500 µl de medio LB suplementado con ampicilina. Con una alícuota de este precultivo se inoculó un cultivo de 500 mL, hasta alcanzar una densidad óptica medida a 600 nm de 0.1 (DO_{600nm}: 0.1). El cultivo se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.8; la sobreexpresión de la proteína se indujo con 0.5 mM de IPTG, finalmente el cultivo se incubó durante toda la noche a 30°C, en agitación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos inducidos se centrifugaron a 3,024 x g durante 15 min, utilizando una centrifuga Hettich Universal 32R.

El sobrenadante se retiró y la pastilla bacteriana resultante se resuspendió en 40 ml de amortiguador de lisis A (Tris 50 mM, pH:8, NaCl 500 mM) suplementado con el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 2 mM.

La muestra se sonicó en frío, mediante 7 ciclos de 45 segundos, con descansos de 2.5 minutos entre cada ciclo, utilizando un sonicador Branson, modelo 450 VWR Scientific. El lisado celular se centrifugó a 4°C a 6,804 x g durante 45 minutos en la centrifuga Hettich Universal 32 R.

Posteriormente se recolectó el sobrenadante y se incubó durante 30 minutos a 25°C en presencia de la resina acoplada a Níquel (Profinity™ IMAC Ni-Charged Resin, BIO-RAD), previamente equilibrada con amortiguador de lisis A. Posteriormente se colectó la fracción de proteínas no unidas a la resina. La columna se lavó con 30 ml de amortiguador (Tris 50 mM, pH:8, NaCl 50 mM) y se

colectó la fracción del lavado. Posteriormente se agregó 30 ml de amortiguador (Tris 50 mM, pH:8, NaCl 50 mM) + Imidazol 200 mM y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con el fin de eluir la darpina.

Una vez eluida, la proteína se concentró en un centricon, AMICON Ultra (Merck Millipore) de 15 ml con paso de corte de 10 kDa y se centrifugó a 1577 x g hasta un volumen de 3 mL. Con el fin de almacenar la proteína se precipitó con sulfato de amonio al 70% y se almacenó a 4 °C.

4.4 Digestión de la etiqueta de histidinas de 57a10, por acción de la proteasa del virus del tabaco

La darpina 57a10 se incubó en presencia de la proteasa del virus del tabaco (TEVp), con el fin de hidrolizar la etiqueta de 6 histidinas del extremo amino terminal. Para ello, la proteína precipitada se centrifugó a 9,700 x g durante 10 minutos en la microcentrífuga Sorvall S, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 µl de amortiguador de digestión (Tris 50 mM, pH: 8.0, EDTA 0.5 mM) y DTT 1 mM. La proteína disuelta en el amortiguador de digestión se incubó durante 12 horas a 25 °C en presencia de la TEVp en una relación 1:25 (TEVp:57a10).

Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra de darpina + pTEV se diluyó con 14 ml de amortiguador de trietanolamina (100 mM, pH; 7.4) y se incubó durante 30 minutos a 25°C con resina de níquel previamente equilibrada con el mismo amortiguador de trietanolamina. Después del tiempo de incubación se colectó la fracción no unida a la resina IMAC, que en este caso, contiene a la proteína sin la etiqueta de histidinas.

La proteína 57a10 sin etiqueta de histidinas, se colocó en un tubo AMICON ultra de 15 ml con paso de corte de 10 kDa y se centrifugó a 1577 x g durante 20 min

en la centrifuga Universal 32 R para poder concentrar nuestra proteína a un volumen final de 1 ml.

4.5 Análisis de los pasos de purificación de la darpina 57a10 mediante SDS-PAGE

En el proceso de purificación de la proteína 57a10, se tomaron diversas alícuotas con el fin de monitorear cada paso mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE al 16% de acuerdo a la técnica reportada por Laemmli (U.K. Laemmli, 1970). Las electroforesis se llevaron a cabo con un voltaje constante de 80 mV durante media hora y posteriormente se aumentó el voltaje a 120 mV durante dos horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, y posteriormente fueron desteñidos con agua desionizada.

4.6 Evaluación de tres métodos de cuantificación colorimétricos para determinar la concentración de la proteína 57a10

La darpina 57a10 presenta un porcentaje bajo de aminoácidos aromáticos, careciendo de triptófanos (W) y tirosinas (Y), presentando únicamente 2 fenilalaninas (F); además, carece completamente de cisteínas (C) por lo que 57a10 no puede ser cuantificada por medio de su coeficiente de extinción molar a 280 nm. De esta forma, se evaluaron 3 métodos de cuantificación de proteínas por colorimetría, para determinar cuál de ellos arroja el valor más aproximado a la concentración real de la muestra al compararlos con la concentración de la triosa fosfato isomerasa de *Giardia lamblia* (GITIM).

Para cada uno de estos métodos se realizó una curva patrón utilizando diferentes concentraciones de BSA en un rango de 4 mg/ml a 40 mg/ml partiendo de una concentración stock de 1 mg/mL

Los 3 métodos evaluados fueron: el método del ácido bicinonínico (BCA), el método de Bradford y el método de Lowry; algunos detalles de estos métodos se mencionan a continuación.

Método de BCA (ácido bicinonínico): Es un método de cuantificación colorimétrico que consiste en la reducción del ion Cu^{2+} resultado de la interacción con los residuos de arginina, cisteína, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina de la proteína de interés. Al reducirse el ion Cu^{2+} a Cu^{1+} interacciona con 2 moléculas de BCA, formando así el complejo BCA-Cu^{1+} , el cual genera una coloración morada que se puede medir a una longitud de onda de 562 nm (Olson J. y Markwell J., 2007).

Método de Bradford: El método de Bradford tiene como componente principal el azul de Coomasie G-250 el cual inicialmente tiene una coloración roja. Una vez que interacciona con la cadena lateral básica y aromática de la proteína de interés adopta una coloración azul que puede ser medida a una longitud de onda de 595 nm. (Olson J. y Markwell J., 2007)

Método de Lowry: Este método se compone de 2 etapas, la primera se lleva a cabo bajo condiciones alcalinas y consiste en la interacción entre los iones de Cu^{2+} y los enlaces peptídicos de la proteína de interés. De esta forma los iones de Cu^{2+} se reducen a Cu^{1+} y se forma un complejo entre los enlaces peptídicos de la proteína y los iones de Cu^{1+} . En la segunda etapa este complejo reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu lo cual genera una coloración azul que se puede medir a una longitud de onda de 750 nm. (Olson J. y Markwell J., 2007)

4.6.1 Determinación de la concentración de la darpina 57a10

Utilizando como referencia cada curva patrón se cuantificó la concentración de 57a10 utilizando los 3 métodos colorimétricos. Se analizaron muestras de darpina

57a10 con etiqueta de histidinas, cada una de estas fracciones se analizó por duplicado utilizando dos volúmenes diferentes de muestra (2.5 y 5 μ l).

Mediante geles desnaturalizantes al 16% se evaluaron dos cantidades (10 y 15 μ g) de proteína determinadas de acuerdo a las concentraciones obtenidas en cada uno de los métodos evaluados. Como proteína control se utilizaron 10 y 15 μ g de la triosa fosfato isomerasa de *Giardia lamblia* (GITIM), cuya masa molecular en su estado monomérico es de 27.9 kDa. La concentración de GITIM se estimó espectrofotométricamente a 280 nm con base en su coeficiente de extinción molar de 26720 M⁻¹ cm⁻¹. El método más aproximado mostraba bandas con una tonalidad similar a la de las bandas de GITIM siendo el método de BCA el que presentó una coloración más aproximada, esto se mencionará con más detalle en los resultados.

En trabajos posteriores se cuantificaron las fracciones colectadas durante la purificación utilizando el método de BCA y como referencia la curva patrón de BSA. Cada una de las fracciones se analizó por duplicado utilizando dos volúmenes diferentes de muestra (2.5 y 5 μ l). Los tubos de la curva patrón y de las fracciones se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente se cuantificaron en un espectrofotómetro modelo Cary 50, a una longitud de onda de 562 nm.

4.7 Caracterización estructural de la darpina 57a10

4.7.1 Análisis de la estructura secundaria de la darpina 57a10 por medio de dicroísmo circular

Para determinar la estructura secundaria de 57a10 se llevó a cabo un barrido de longitud de onda entre 190 y 280 nm en un espectropolarímetro J-810 (Jasco, Maryland, USA). Se utilizó una concentración de proteína de 0.25 mg/ml diluida en amortiguador de fosfato de sodio (25 mM, pH: 7.4). Este análisis se hizo con una velocidad de barrido de 1 nm/min a una temperatura de 25 °C y en una celda de

cuarzo de 0.1 cm de paso de luz. Los datos obtenidos se analizaron en el programa Origin Pro 2015.

4.7.2 Análisis de la estabilidad térmica de la darpina 57a10 por medio de dicroísmo circular

El análisis de estabilidad térmica se hizo con el fin de determinar la temperatura media de desnaturalización de 57a10. La prueba se realizó partiendo de la muestra utilizada en el experimento anterior, la cual estaba a una concentración de 0.25 mg/ml en amortiguador de fosfato de sodio (25 mM, pH: 7.4).

El ensayo se realizó a una longitud de onda de 222 nm en el espectropolarímetro J-810 (Jasco, Maryland, USA) y utilizando una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico, en un rango de temperatura de 20 a 90 °C, donde el aumento de temperatura fue de 1°C por cada 2.5 minutos.

La fracción desnaturalizada (f_D) se calculó por medio de la ecuación: $f_D = \theta_T - \theta_N / \theta_D - \theta_N$, donde θ_N corresponde a la elipticidad del estado nativo, θ_D a la elipticidad del estado desnaturalizado y θ_T a la elipticidad de la muestra a la temperatura T.

La temperatura media de desnaturalización (T_m), se determinó mediante un ajuste utilizando el modelo de Boltzmann. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Origin Pro 2015.

4.8 Interacción de la darpina 57a10 con proteínas solubles del parásito *Giardia lamblia*

El objetivo de este experimento fue estudiar la afinidad de la darpina 57a10 con proteínas solubles del parásito intestinal *G. lamblia*, con el fin de evaluar el posible uso a futuro de 57a10 con fines diagnósticos o terapéuticos contra la giardiasis.

Para cumplir este objetivo, el experimento se diseñó en 3 etapas. La primera etapa consistió en determinar la mejor condición de unión de 57a10 a la resina IMAC (sección: 4.8.1). En la segunda etapa se obtuvieron las proteínas solubles de *Giardia*, lisando los trofozoitos y separando la fracción soluble de la insoluble (sección: 4.8.2). Por último en la tercera etapa se llevó a cabo la interacción entre 57a10 y las proteínas de la fracción soluble de *G. lamblia*, para posteriormente unirlo a la resina IMAC (sección: 4.8.3). Adicionalmente se realizó un experimento control en el que se evaluó la unión inespecífica de las proteínas solubles de *G. lamblia* a la resina IMAC en ausencia de la darpina 57a10 con el fin de descartar falsos positivos debido a la probable afinidad de proteínas con la resina IMAC (sección: 4.8.4).

4.8.1 Estandarización de las condiciones de unión de la darpina a la resina acoplada a Níquel

Para obtener las condiciones óptimas de unión entre la darpina y la resina se llevaron a cabo 2 pruebas en las que se evaluaron diferentes cantidades de darpina y diferentes volúmenes de resina.

De acuerdo al manual Profinity™ IMAC Resins (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001677B.PDF>), la resina acoplada a níquel tiene una capacidad de unión de 15 mg/ml, de esta forma se decidió evaluar cantidades en el límite de la capacidad de la resina y por debajo de la capacidad reportada.

En primer lugar se probaron diferentes cantidades de darpina en un intervalo de 0.5 a 5 mg y diferentes volúmenes de resina en un rango de 35 a 350 μ l. Estas relaciones se encuentran en el límite de la capacidad de la resina acoplada a níquel. Además, se evaluaron diferentes condiciones de incubación modificando la temperatura y el tiempo de incubación, la cuales se muestran en la tabla.1.

Volumen de resina (μl)	Cantidad de proteína (mg)	Tiempo de incubación
35	0.5	1 hora y Toda la noche (12 horas)
100	1	
250	2.5	
350	5	

Tabla 1. Diferentes condiciones de incubación probadas para la interacción entre darpina 57a10 y resina acoplada a níquel.

En un segundo acercamiento, se probaron diferentes cantidades de darpina en un intervalo de 100 μ g a 1 mg y diferentes volúmenes de resina en un intervalo de 20 a 250 μ l. Estas relaciones se encuentran por debajo de la capacidad de la resina acoplada a níquel. Para este ensayo, se evaluaron diferentes condiciones de incubación, modificando la temperatura y el tiempo de incubación, la cuales se muestran en la tabla.2.

Volumen de resina (µl)	Cantidad de proteína (mg)	Tiempo de incubación
20	0.1	1 hora, 2 horas y toda la noche (12 horas)
50	0.25	
100	0.5	
250	1	

Tabla 2. Diferentes condiciones de incubación probadas para la interacción entre darpina 57a10 y resina de níquel.

Al finalizar los respectivos tiempos de incubación para todas las fracciones de ambas pruebas se colectó la fracción no unida a la resina centrifugando a 9,700 x g durante 10 minutos.

Posteriormente, se lavó con 1 mL de amortiguador de Trizma 50 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C) en agitación y se centrifugó a 9,700 x g durante 10 minutos para separar la fracción denominada fracción de lavado.

En ambas pruebas se analizaron las fracciones no unidas a la resina y el lavado de todas las condiciones. Esto se llevó a cabo en geles SDS-PAGE al 16%, teñidos con azul de Coomasie coloidal.

4.8.2 Obtención de las proteínas solubles del parásito *Giardia lamblia*.

Para obtener las proteínas de *G. lamblia*, se utilizaron 16 tubos de cultivo de este parásito de la cepa WB crecidos a confluencia. Cada tubo contenía aproximadamente de 15 a 18 millones de trofozoitos. Estos cultivos se

almacenaron a 4 °C la noche previa a la lisis con la finalidad de que los trofozoitos se desprendieran de la superficie de los tubos donde estaban adheridos.

Al día siguiente los cultivos se centrifugaron a 1,577 x g en la centrifuga Hettich Universal 32R durante 10 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y los botones celulares se resuspendieron en amortiguador de Trizma 500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM para concentrarlos en un tubo Eppendorf.

El botón celular se lavó 4 veces con amortiguador de Trizma (500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM) mediante centrifugación a 1,577 x g durante 10 minutos.

Finalmente, a la pastilla celular se le agregó amortiguador de lisis B (Trizma 500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM, PMSF 2mM y E64 1mM) para posteriormente lisar por sonicación mediante 7 ciclos de 45 segundos c/u con descansos de 2.5 minutos entre cada ciclo, en el sonicador Branson a una intensidad de 4 y con un output de 20 kHz.

Finalizados los 7 ciclos de sonicación la muestra se centrifugó a 9,700 x g durante 40 minutos y posteriormente se recolectó el sobrenadante, el cual corresponde a las proteínas solubles de *G. lamblia*.

La concentración de la fracción soluble se determinó, cuantificando a 280 nm en un espectrofotómetro modelo NanoDrop One de la marca Thermo Scientific.

4.8.3 Interacción de 57a10 con proteínas solubles de *Giardia lamblia*

La darpina 57a10 se incubó con la fracción de proteínas solubles a una relación de 1:1.5 (1 mg de darpina 57a10 con 1.5 mg de fracción soluble de *G. lamblia*) durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente (25 °C). La mezcla de interacción se puso en contacto con 250 µl de resina previamente equilibrada con amortiguador de Trizma 500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM y se incubó durante toda la noche (12 horas) a 4 °C y en agitación en tubos Eppendorf de 1.5 ml.

La muestra se centrifugó a 9,700 x g durante 10 minutos para recolectar la fracción no unida a la resina de afinidad.

Posteriormente se hizo un lavado con 1 ml de amortiguador de Trizma y se incubó durante 10 minutos para posteriormente centrifugar a 9,700 x g, durante 10 minutos y recolectar el lavado.

Por último, la muestra se eluyó con 500 µl de amortiguador de Trizma 500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM e imidazol 200 mM, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) y en agitación. Posteriormente se centrifugó a 9,700 x g durante 10 minutos para colectar la fracción del eluido.

Los 500 µl del eluido final se lavaron para eliminar el imidazol restante para lo cual se diluyeron hasta a un volumen de 3 ml con amortiguador de Trizma (500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM) y se centrifugaron en un tubo AMICON como previamente se describió. Esto se repitió 3 veces y la muestra se concentró en un volumen de 500 µl. Enseguida se concentró utilizando un speedvac modelo CentriVap durante hora y media a 35 °C hasta un volumen mínimo, para finalmente llevar a un volumen final de 50 µl con amortiguador de Trizma 500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM.

Las diferentes fracciones colectadas durante este ensayo se analizaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 16% el cual se tiñó con azul de Coomassie coloidal.

4.8.4 Evaluación de la unión inespecífica de proteínas solubles de *Giardia lamblia* a la resina acoplada a níquel

Este experimento control se realizó con el objetivo de determinar si existían proteínas de la fracción soluble de *G. lamblia*, que se unían de manera inespecífica a la resina sin que se encuentre presente la darpina 57a10.

Para este experimento se incubó 1.5 mg de extracto de proteínas solubles de *G. lamblia* con 250 µl de resina acoplada a níquel durante 2 horas a 4 °C y en agitación. Las cantidades de resina y proteína utilizadas para el ensayo de interacción fueron las mismas utilizadas en el ensayo con 57a10.

Finalizado el tiempo de incubación se centrifugó a 9,700 x g durante 10 minutos y se colectó la fracción no unida a la resina. Se realizaron 2 lavados, cada uno con 1 ml de amortiguador de Trizma y centrifugando a 9,700 x g, durante 10 minutos; se colectó la fracción de lavado.

La muestra se eluyó con 500 µl de amortiguador de Trizma 500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM e imidazol 200 mM incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) y en agitación. Posteriormente se centrifugó a 9,700 x g durante 10 minutos para coleccionar la fracción del eluido que contendría las posibles proteínas que de manera inespecífica se unen a la resina IMAC.

El eluido se concentró en un tubo AMICON ultra de 15 ml, durante 15 min hasta llevar a un volumen de 100 µl. Posteriormente se realizaron 3 lavados con el propósito de eliminar el imidazol restante, cada lavado se hizo con 300 µl de amortiguador de trizma (500 mM, pH: 8.5, NaCl 100 mM) y se centrifugó a 1,577 x g durante 15 min.

Finalmente se analizaron las fracciones de este experimento por electroforesis, en un gel SDS-PAGE al 16%, el cual se tiñó con azul de Coomasie coloidal.

4.9 Análisis de la hidrólisis espontánea de la etiqueta de histidinas de 57a10 a través del tiempo

Este experimento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar si la banda que se cree que corresponde a 57a10 sin etiqueta de histidinas aumentaba con él al paso del tiempo. Para ello se evaluaron 5 muestras de la darpina 57a10 purificada en diferentes fechas, las cuales no se habían sometido a la hidrólisis de la etiqueta de His con la TEVp. La presencia de esta banda se analizó mediante SDS-PAGE al 16%, el cual se tiñó con azul de Coomasie coloidal.

5. Resultados

5.1 Secuencia de la darpina 57a10 en el plásmido de sobreexpresión pET-3aHisTEV

El electroferograma obtenido mediante secuenciación del gen de la darpina 57a10 se presenta en la figura 6. Se puede observar la secuencia que codifica para la etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal (subrayado en negro) y con la cual se podrá purificar a 57a10 mediante la resina IMAC. También se encuentra la secuencia de reconocimiento de la TEVp (subrayado en naranja) para llevar a cabo la proteólisis de la etiqueta de histidinas. Por último, se señalan las secuencias codificantes de las cubiertas de los extremos amino (subrayado en azul) y carboxilo terminal (subrayado en verde), así como la secuencia del módulo variable de 57a10 (subrayado en rojo).

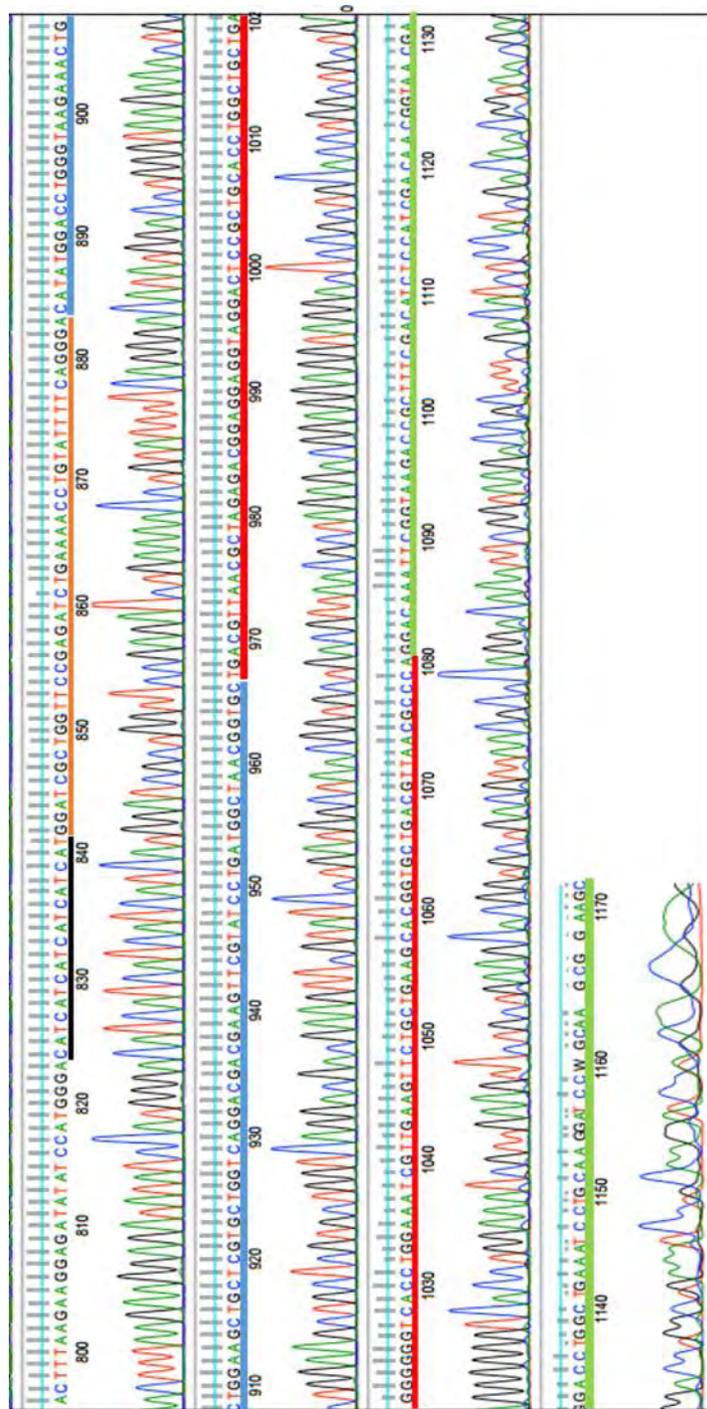


Figura 6. Electroferograma obtenido mediante secuenciación del gen correspondiente a la proteína 57a10. Subrayado con negro se señala la secuencia codificante para la etiqueta de 6 histidinas; con color anaranjado la secuencia de reconocimiento para la TEVp; con color azul se indica la secuencia de la cubierta aminoterminal; con rojo la secuencia del módulo variable de 57a10 y con color verde se señala la secuencia de la cubierta carboxiloterminial.

Con la secuencia obtenida flanqueando con un solo oligonucleótido se pudo leer la secuencia completa de la darpina 57a10 además de la secuencia que codifica para la etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal y la secuencia de reconocimiento para la proteasa del virus del tabaco. La secuencia de nucleótidos se tradujo hacia los aminoácidos correspondientes utilizando el servidor Expasy-translate (<https://web.expasy.org/protparam/>) y en la figura 7 se muestran los aminoácidos que conforman a 57a10, la cual en su extremo amino terminal contiene la secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco y la etiqueta de histidinas, adicionalmente se somborean los aminoácidos variables los cuales en su mayoría son de naturaleza hidrofílica.

```

catcatcatcatcatcatggatcgctgggtccgagatctgaaaacctgtatttcagggga
H H H H H H G S L V P R S E N L Y F Q G
catatggacctgggtaagaaactgctggaagctgctcgtgctgggtcaggacgacgaagtt
H M D L G K K L L E A A R A G Q D D E V
cgtatcctgatggctaacgggtgctgacgttaacgctagagacggaggaggtaggactccg
R I L M A N G A D V N A R D G G G R T P
ctgcacctggctgctgaggggggtcacctggaaatcgttgaagttctgctgaagcacggt
L H L A A E G G H L E I V E V L L K H G
gctgacgttaacgccaggacaaattcggttaagaccgctttcgacatctccatcgacaac
A D V N A Q D K F G K T A F D I S I D N
ggtaacgaggacctggctgaaatcctgcaaggatccwgcaagcggaagc
G N E D L A E I L Q G S X K R K

```

Figura 7. Traducción de la secuencia nucleotídica a secuencia de aminoácidos de 57a10. Se muestra en el extremo aminoterminal la etiqueta de 6 histidinas (naranja) seguida de la secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (azul). En rojo, se presentan las cubiertas amino y carboxilo terminal. Los aminoácidos sombreados en rosa, verde y azul corresponden a las 7 posiciones variables de 57a10 que se encuentran en el módulo de anquirina (negro).

5.2 Purificación de la darpina 57a10

La proteína 57a10 se purificó a homogeneidad como se observa en la figura 8 en dónde se presentan cada una de las fracciones colectadas a lo largo de la purificación. En el carril 1 se aprecia sobreexpresión de la darpina 57a10, debido a

que se distingue la banda con una masa aproximada de 12 kDa, que, presumiblemente corresponde a la darpina 57a10 con la etiqueta de 6 His y el sitio de reconocimiento de la TEVp, en su extremo aminoterminal. El carril 2 corresponde a la fracción soluble obtenida después de lisar y clarificar el extracto celular. Se aprecia una banda de mayor grosor de peso aproximado a los 12 kDa, con lo se puede suponer que la darpina es una proteína soluble. Los carriles 3 y 4 corresponden a la fracción no unida a la resina y a la fracción de lavado respectivamente. En ambos carriles se observan bandas tenues cercanas a los 12 kDa, lo que nos indica una ligera pérdida de proteína que no se unió a la resina. La hidrólisis de la etiqueta de histidinas de la darpina por acción de la proteasa del virus del tabaco (TEVp) se llevó a cabo de manera eficiente lo que permitió obtener a la proteína 57a10 con un alto grado de pureza. En las primeras fracciones analizadas del gel podemos ver que la banda de 57a10 presenta una masa molecular de 12 kDa. Posteriormente en la fracción de la interacción de 57a10 con la TEV (carril 5) y en los carriles 6, 7 y 8, las bandas de 57a10 tienen una masa menor aproximada a 9.7 kDa, lo cual nos indica que la etiqueta de histidinas fue hidrolizada de manera eficiente por acción de la TEVp.

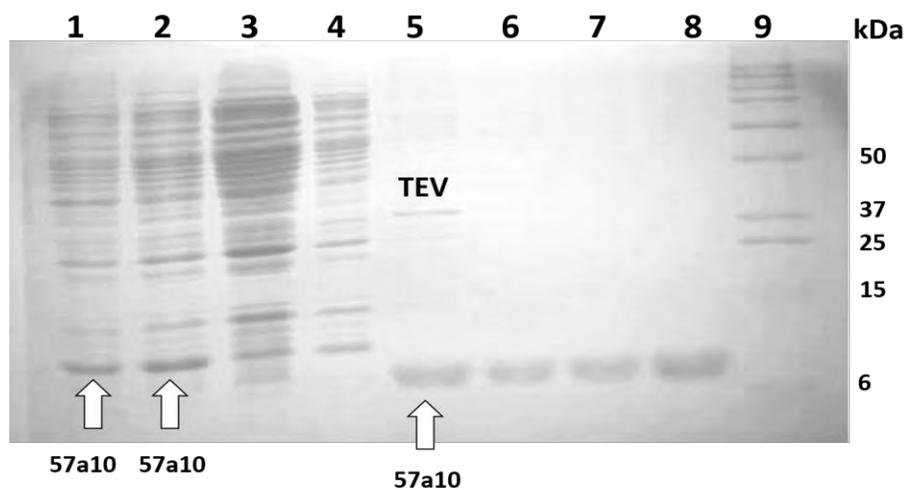


Figura 8. Análisis de la purificación de la darpina 57a10. Carril 1: Lisado Celular (LC), Carril 2: Sobrenadante (SN), Carril 3: fracción no unida a la columna (NU), Carril 4: Lavado (L), Carril 5: Darpina incubada con la proteasa del virus del tabaco (TEV) (E+TEV)), Carriles 6-8: Proteína purificada 57a10. Carril 6: 0.5 µl, Carril 7: 1 µl, Carril 8: 1.5 µl, Carril 9: Marcador de peso molecular Unstained Precision Protein Standards, BIORAD (MPM).

5.3 Evaluación de diferentes métodos colorimétricos para cuantificar la proteína 57a10

Para evaluar cuál método para determinar la concentración de la darpina 57a10 es el mejor, se utilizó un lote de proteína con la etiqueta de histidinas. Es decir, esta proteína no fue sometida a proteólisis por la TEVp.

La darpina 57a10 carece de triptófanos (W), tirosinas (Y) y cisteínas (C), estos tres aminoácidos son necesarios para determinar su concentración con base en su absorptividad a 280 nm, por lo que no es posible determinar el coeficiente de extinción molar de la darpina. Debido a lo anterior, se compararon 3 métodos de cuantificación de proteínas colorimétricos (BCA, Bradford y Lowry), las concentraciones obtenidas con cada uno de ellos se presentan en la tabla 3. Tomando como base estas concentraciones, en la figura 8, se presenta el gel SDS-PAGE en donde se cargaron 10 y 15 μg . Así mismo en el gel, se cargaron 10 y 15 μg de la GITIM para tomarla como proteína de referencia.

La figura 9 muestra que el método de cuantificación de proteínas por BCA, este fue más confiable con respecto a la GITIM (proteína de referencia), ya que las bandas que se observan en los carriles 2 y 3 (darpina) son las más aproximadas a la GITIM (carriles 8 y 9). Por otro lado, los métodos de Bradford y Lowry nos dan una sobreestimación de concentración de la proteína ya que los datos proporcionados por las cuantificaciones nos muestran una alta concentración de proteína. Sin embargo en el gel se observa que la cantidad de proteína cargada es muy poca (Fig. 9, carriles 4 - 7). De esta forma podemos decir que el sesgo generado por estos 2 métodos fue muy grande y por esta razón se decidió no utilizarlos para cuantificar a la darpina 57a10. De esta manera, en los experimentos siguientes la determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo por el método de BCA.

Un dato importante que se pudo apreciar en este ensayo es que en los carriles donde se cargó la proteína 57a10 (Fig. 9, carriles 2-7) se observó una segunda banda con un peso molecular menor que corresponde con el peso molecular aproximado a 9.7 kDa de la proteína sin la etiqueta de histidinas. Como se mencionó al comienzo de esta sección, el lote de proteína utilizado para este experimento no se incubó en presencia de la TEVp por lo que probablemente exista una hidrólisis espontánea de los seis residuos de histidina ubicados en el extremo aminoterminal que se abordará más adelante en la sección 5.7 No obstante, este hecho se tomó en consideración para los experimentos posteriores ya que la etiqueta de histidinas es necesaria para evaluar la interacción entre 57a10 y las proteínas solubles de *Giardia lamblia*. Para esto, las pruebas de interacción se realizaron en el menor periodo de tiempo posible posterior a la purificación para así evitar márgenes de error debido a la pérdida de la etiqueta de histidinas.

Darpina	BCA (mg/ml)	Bradford (mg/ml)	Lowry (mg/ml)
57a10 His	1.9	9.1	8.5

Tabla 3: Concentraciones obtenidas para la darpina 57a10-His por los métodos de cuantificación colorimétricos evaluados.

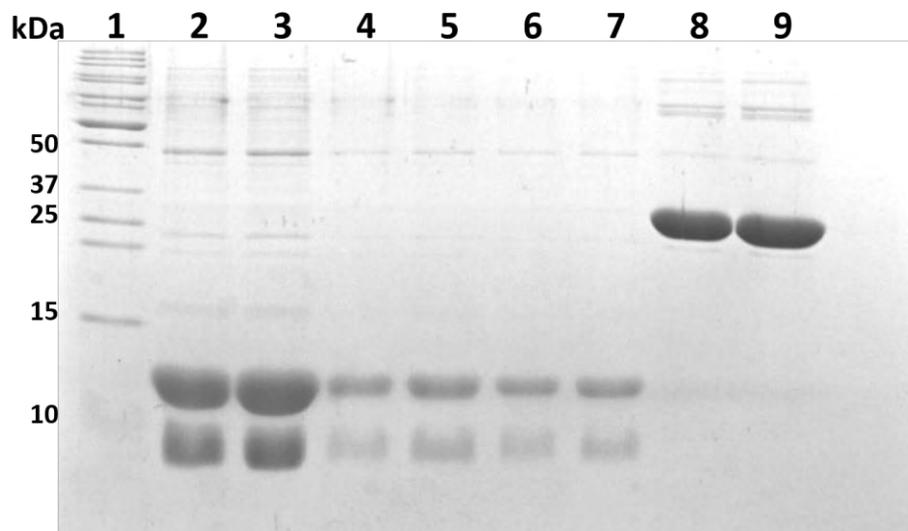


Figura 9. Comparación de los 3 métodos de cuantificación colorimétricos. Gel SDS-PAGE al 16% con diferentes cantidades de la proteína 57a10, tomando como referencia las concentraciones obtenidas por los 3 métodos de cuantificación evaluados. Carril 1: marcador de peso molecular Unstained Precision Protein Standards, BIORAD. Carriles 2 y 3: darpina cuantificada por el método de BCA 10 y 15 µg. Carril 4 y 5: darpina cuantificada por el método de Bradford 10 y 15 µg. Carril 6 y 7: darpina cuantificada por el método de Lowry 10 y 15 µg. Carriles 8 y 9: GITIM 10 y 15 µg.

5.4 Rendimientos de las purificaciones de la darpina 57a10

Una vez estandarizado el método de cuantificación se pudo obtener la concentración de la darpina 57a10 en las diversas purificaciones realizadas y con esto se pudo determinar sus rendimientos así como un rendimiento promedio (Tabla 4).

No. de purificación	Concentración (mg/mL)	Volumen Final (mL)	Proteína total (mg)	Volumen de medio de cultivo (L)	Rendimiento (mg/L de cultivo)
1	48.10	0.5	24.05	0.5	48.10
2	5.67	3	17.01	1	17.01
3	16.97	0.6	10.18	0.5	20.36
				Promedio	28.49

Tabla 4. Rendimientos obtenidos en diversas purificaciones de la proteína 57a10. La concentración de proteína fue determinada por el método de BCA.

5.5 Caracterización estructural de la darpina 57a10.

5.5.1 Determinación de la estructura secundaria por Dicroísmo Circular.

En la figura 10 se ilustra la elipticidad molar obtenida para la proteína 57a10 mediante la obtención del espectro de dicroísmo circular. Como ya se ha mencionado anteriormente las darpinas están conformadas principalmente por 2 hélices alfa y un giro beta. La gráfica mostrada en la figura 10 presenta 2 mínimos principales a 208 nm y 222 nm, los cuales corresponden a los mínimos característicos de las hélices alfa.

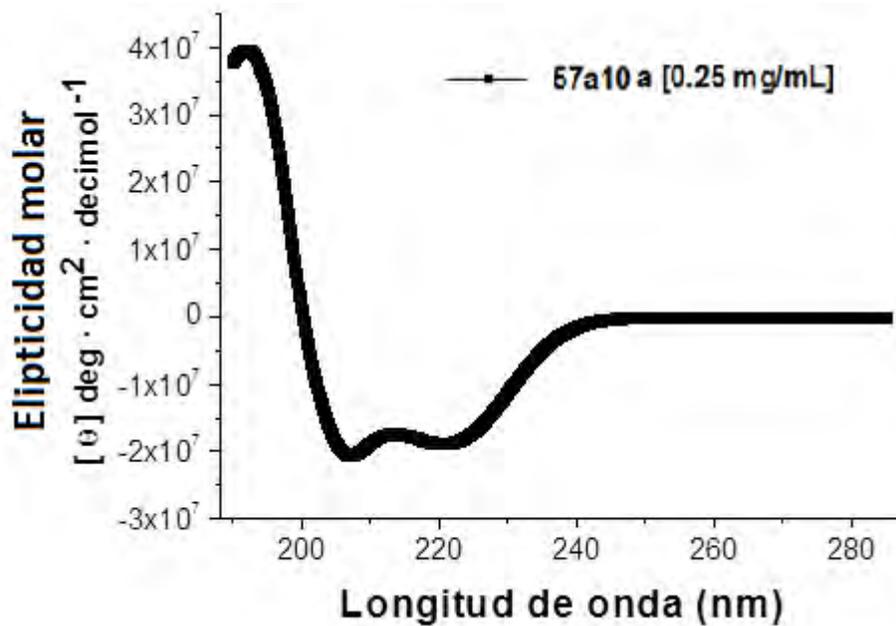


Figura 10. Estructura secundaria de la darpina 57a10 seguida por dicroísmo circular. La darpina 57a10 se utilizó a una concentración de 0.25 mg/ml y se hizo un barrido de longitud de onda de 290 a 180 nm

5.5.2 Efecto de la temperatura en la estructura secundaria de la proteína 57a10, seguida por dicroísmo circular.

El análisis de dicroísmo circular para determinar la termoestabilidad de la proteína de estudio se muestra en la figura 11, siguiendo el cambio en la elipticidad a 222 nm conforme aumenta la temperatura. En esta gráfica se puede observar que la darpina 57a10 presentó una temperatura media de desnaturalización de 51.83°C. Este valor es de considerarse ya que la proteína 57a10 es una proteína relativamente pequeña con 93 aminoácidos cuyo peso molecular es de 9.7 kDa.

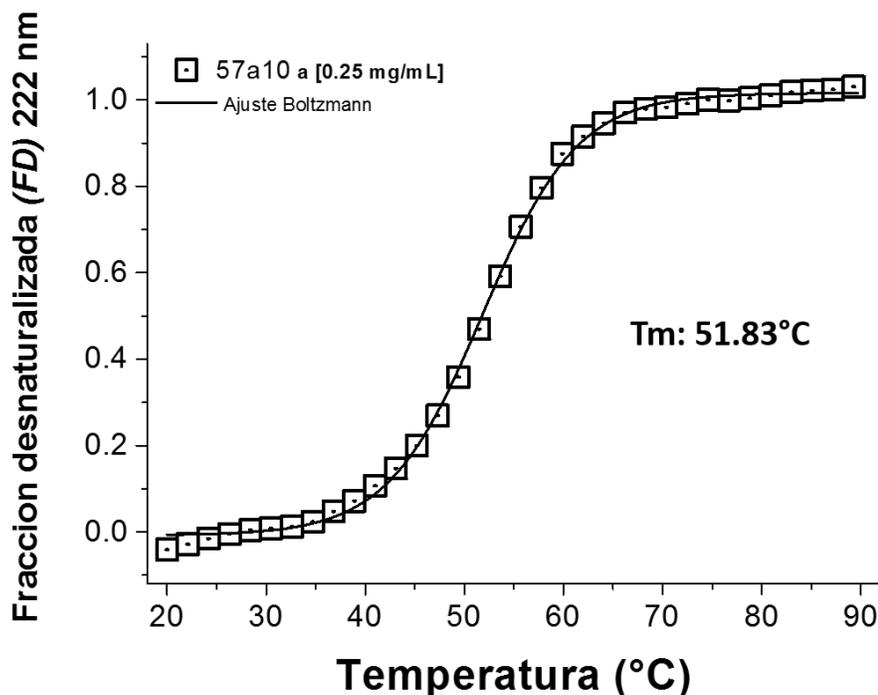


Figura 11. Termostabilidad seguida por Dicroísmo Circular a 222 nm. La darpina 57a10 se utilizó a una concentración de 0.25 mg/ml, el intervalo de temperatura usado fue de los 20 a 90 °C.

Posterior al análisis de la estructura secundaria, la misma muestra de proteína se enfrió hasta alcanzar los 25 °C y se determinó el espectro de dicroísmo circular como se mencionó previamente; se observó que la proteína recupera su estructura secundaria en un 80%. Esto se determinó comparando el valor de la elipticidad molar a 222 nm, antes y después de desnaturalizarse. Esta diferencia resulta evidente como lo muestra la figura 12, el trazo de color negro corresponde al espectro de dicroísmo circular de la proteína antes del ensayo de desnaturalización térmica mientras que el trazo de color rojo corresponde al espectro de dicroísmo circular después de la desnaturalización térmica y una vez que la temperatura descendió a 25°C.

Después de que la proteína se desnaturaliza por temperatura y se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente se pueden apreciar los mínimos de 208 y 222 nm lo que nos indica que 57a10 recuperó su estructura secundaria casi en su totalidad.

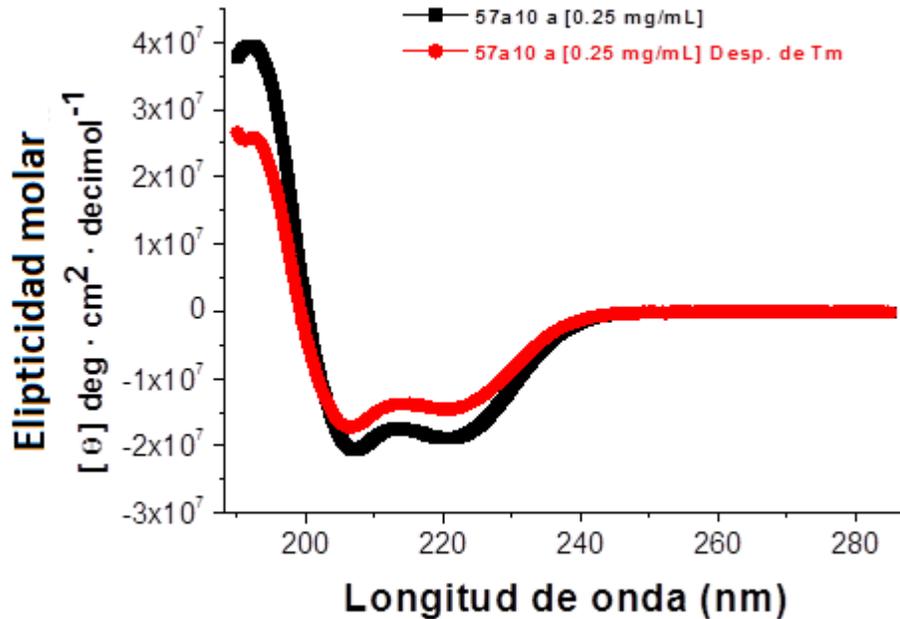


Figura 12. Gráficas comparativas de la estructura secundaria de 57a10, seguida por dicroísmo circular. Antes (negro) y después (rojo) de la desnaturalización térmica.

5.6 Interacción de la darpina 57a10 con proteínas de la fracción soluble de lisado del parásito *Giardia lamblia*.

El uso de las darpinas en el estudio de organismos parasitarios es un área poco explorada; por lo que se evaluó la afinidad de 57a10 con proteínas solubles de trofozoítos de *G. lamblia*, lo que podrá aportar información útil para su posible uso en el tratamiento o diagnóstico de la giardiasis.

5.6.1 Estandarización de las condiciones para llevar a cabo la Interacción entre la darpina 57a10 y proteínas solubles de *Giardia lamblia*.

Se llevó a cabo la unión de la darpina 57a10 a la resina acoplada a níquel, esto con el objetivo de determinar la mejor condición de unión, para usar dicha condición en las pruebas de interacción entre 57a10 y las proteínas solubles de *G. lamblia*. Esto se hizo comparando diferentes volúmenes de resina y diferentes cantidades de darpina. A continuación se presentan 2 pruebas de unión de darpina a la resina acoplada a níquel.

Las figuras 13 y 14 presentan los geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 16% donde se analizó la primera prueba en donde se utilizaron diferentes cantidades de darpina y diferentes volúmenes de resina, en relaciones 1:50 (Fig. 13 carriles 2, 3, 6 y 7; Fig. 14 carriles 1, 2, 7 y 8) y 1:100 (Fig. 13 carriles 4 y 5; Fig. 14 carriles 3, 4, 5 y 6). Estas relaciones se encuentran en el límite de la capacidad de unión de la resina acoplada a níquel la cual es de 15 mg de proteína por 1 ml de resina. Además, se evaluaron diferentes condiciones de incubación, modificando la temperatura y el tiempo de incubación. Como control, se utilizaron 30 μ g de la darpina 57a10 purificada con etiqueta de histidinas y se evaluó la fracción de proteína no unida a la resina y la fracción del lavado.

Las relaciones utilizadas no resultaron favorables ya que al analizar la fracción no unida a la resina (Fig. 13 carriles 2, 4 y 6; Fig. 14 carriles 1, 3, 5 y 7) se observa que la cantidad de proteína perdida, es similar a la cantidad presente en el control (Fig. 13 carril 1), lo que nos indica que la gran mayoría de la proteína no está adherida a la columna. Por otro lado, en la fracción del lavado (Fig. 13 carriles 2, 3, 6 y 7; Fig. 14 carriles 1, 2, 7 y 8), también se observa pérdida de proteína lo que nos indica que la proteína restante se pierde al lavar la resina acoplada a níquel, por lo que estas relaciones de cantidad de proteína y volumen de resina no resultaron favorables y no fueron utilizadas.

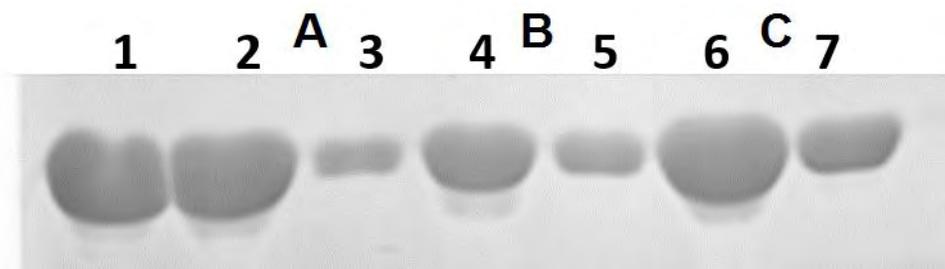


Figura 13. Estandarización de la unión de proteína 57a10 a la resina acoplada con Níquel. Muestras incubadas durante 1 hora a 25 °C en agitación, **condiciones: A:** 35 μ l de resina + 0.5 mg de proteína, **B:** 250 μ l de resina + 2.5 mg de proteína, **C:** 350 μ l de resina + 5 mg de proteína. Carril 1: Control 30 μ g de la proteína 57a10, carriles 2 y 3: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición A), carriles 4 y 5: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición B), carriles 6 y 7: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición C).

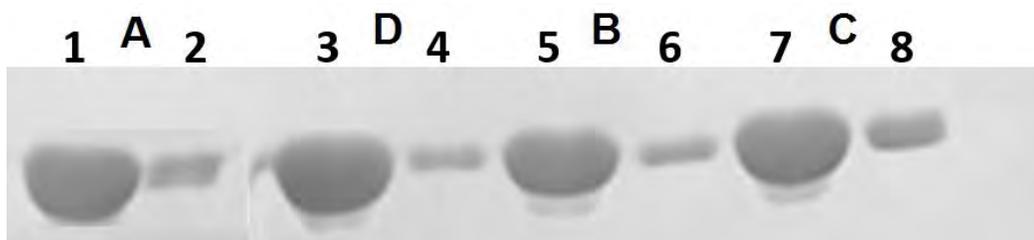


Figura 14. Estandarización de la unión de proteína 57a10 a la resina acoplada con Níquel. Muestras incubadas toda la noche a 4 °C en agitación. **Condiciones: A:** 35 μ l de resina + 0.5 mg de proteína, **B:** 250 μ l de resina + 2.5 mg de proteína, **C:** 350 μ l de resina + 5 mg de proteína, **D:** 100 μ l de resina + 1 mg de proteína. Carriles 1 y 2: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición A), carriles 3 y 4: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición D), carriles 5 y 6: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición B), carriles 7 y 8: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición C).

Las figuras 15, 16 y 17 presentan los geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) donde se analizaron diferentes cantidades de darpina y diferentes volúmenes de resina en relaciones 1:200 (Fig. 15 carriles 1 - 4; Fig. 16 carriles 1 - 4; Fig. 17 carriles: 1 - 6) y 1:250 (Fig. 15 carriles 5 y 6; Fig. 16 carriles 5 y 6). Estas relaciones se encuentran por debajo de la capacidad de unión de la resina acoplada a níquel. Al igual que las figuras 12 y 13 se evaluaron diferentes condiciones de incubación, modificando la temperatura y el tiempo de incubación y se evaluó la fracción de proteína no unida a la resina y la fracción del lavado de cada condición.

Las relaciones utilizadas resultaron favorables ya que al analizar la fracción no unida a la resina (Fig. 15 carriles 1, 3 y 5, Fig. 16 carriles 1, 3 y 5, Fig. 17 carriles 1, 3 y 5) se observa una menor pérdida de proteína con respecto a la cantidad presente en el control (Fig. 13 carril 1), lo que nos indica que la gran mayoría de la proteína está adherida a la columna. Por otro lado, en la fracción del lavado (Fig. 15 carriles 2, 4 y 6; Fig. 16 carriles 2, 4 y 6; Fig. 17 carriles 2, 4 y 6), se observa una mínima pérdida de proteína. De todas estas relaciones la más favorable fue 250 μ l de resina + 1 mg de proteína, incubados durante 2 horas a 25°C en agitación (Fig. 16 carriles 5 y 6).



Figura 15. Estandarización de la unión de proteína 57a10 a la resina acoplada con Níquel. Muestras incubadas durante 1 hora a 25 °C en agitación. **Condiciones:** E: 50 µl de resina + 250 µg de proteína, F: 100 µl de resina + 500 µg de proteína, G: 250 µl de resina + 1 mg de proteína. Carriles 1 y 2: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición E), carriles 3 y 4: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición F), carriles 5 y 6: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición G).

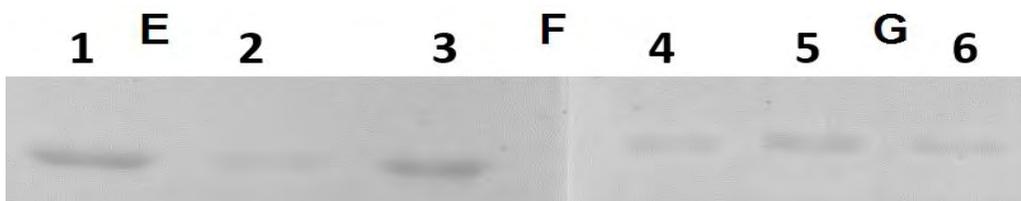


Figura 16. Estandarización de la unión de proteína 57a10 a la resina acoplada con Níquel. Muestras incubadas durante 2 horas a 25 °C en agitación. **Condiciones:** E: 50 µl de resina + 250 µg de proteína, F: 100 µl de resina + 500 µg de proteína, G: 250 µl de resina + 1 mg de proteína. Carriles 1 y 2: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición E), carriles 3 y 4: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición F), carriles 5 y 6: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición G).

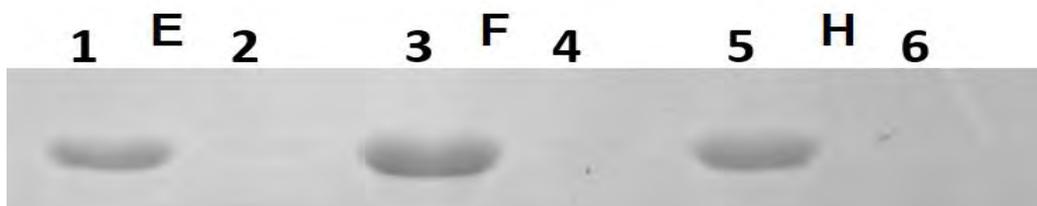


Figura 17. Estandarización de la unión de proteína 57a10 a la resina acoplada con Níquel. Muestras incubadas durante toda la noche a 4 °C en agitación. **Condiciones:** E: 50 µl de resina + 250 µg de proteína, F: 100 µl de resina + 500 µg de proteína, H: 20 µl de resina + 100 µg de proteína. Carriles 1 y 2: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición H), carriles 3 y 4: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición E), carriles 5 y 6: Fracción no unida a la resina (NU) y lavado (L) (condición F).

5.6.2 Interacción entre la darpina 57a10 y proteínas de la fracción soluble de *Giardia lamblia*

La interacción se llevó a cabo incubando la darpina 57a10 con la fracción soluble del lisado de *Giardia* para después adherirla a la resina utilizando la mejor condición obtenida en el experimento de la sección 5.6.1, figura 16, carril 5 y 6 (250 μ l de resina y 1 mg de proteína). Esto se llevó a cabo por duplicado y se analizó mediante SDS-PAGE al 16%, las proteínas candidatas se seleccionaron con base a 2 criterios: 1) la banda candidata no debe estar presente en el carril donde se cargó la 57a10 control (sin interacción con el lisado de *Giardia*) y 2) la banda candidata también debe estar presente en la fracción soluble del lisado de *Giardia*. Los resultados se muestran en las figuras 18 y 19.

Como controles se utilizaron 10 μ g de la darpina 57a10 con etiqueta de histidinas (Fig. 18 Carril 2; Fig. 19, carril 1) y 25 μ g de extracto de *Giardia* (Fig. 18, Carril 3; Fig. 19 carril 2). Por último, se analizó la interacción entre la darpina 57a10 y las proteínas de la fracción soluble de *Giardia*, para lo cual se cargaron en el gel concentraciones crecientes de la fracción de la interacción. Se cargaron 3, 5, 7 y 9 μ g de la interacción (Fig. 18 carriles 6, 7, 8 y 9; Fig. 19 carriles 5, 6, 7 y 8), en los que se aprecia en ambos experimentos una banda de alto peso molecular que se eluyó junto con la darpina al agregar imidazol 200 mM. En las figuras 18 y 19, se resalta una proteína de interés con una flecha. Es importante resaltar que la proteína de interés no aparece en el extracto de la proteína control (Fig. 18 Carril 2; Fig. 19 carril 1) y si está presente en el extracto de proteínas obtenidas de *Giardia* (Fig. 18, carril 3; Fig. 19, carril 2).

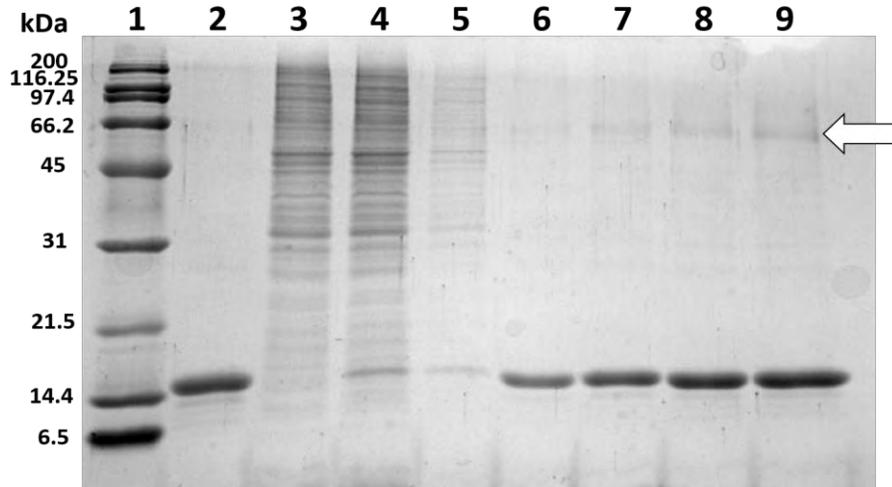


Figura 18. Interacción entre de la darpina 57a10 y la fracción soluble del lisado celular de *G. lamblia*. Gel SDS -PAGE al 16% y teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standard Broad Range, BIO-RAD, (MPM), Carril 2: Control, darpina 57a10 con etiqueta de histidinas purificada (10 µg), Carril 3: Control, extracto de la fracción soluble de lisado celular (25 µg), Carril 4: fracción no unida a la columna (NU) de la interacción (20 µl), Carril 5: Lavado (L) de la interacción (20 µl), Carriles 6, 7, 8 y 9: Interacción, 57a10 con extracto de *G.lamblia* (3 µg, 5 µg, 7 µg, 9 µg). La flecha indica la proteína candidata que se propone.

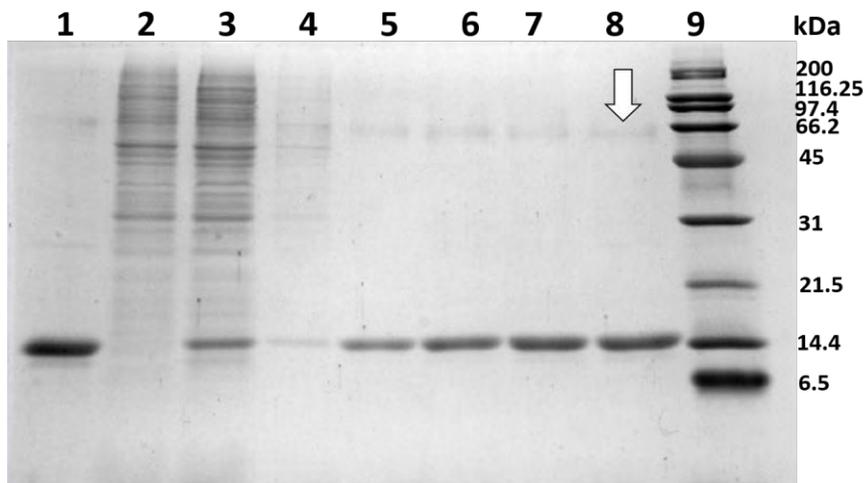


Figura 19. Interacción entre de la darpina 57a10 y la fracción soluble de lisado celular de *Giardia lamblia*. Gel al 16% SDS -PAGE y teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Control, darpina 57a10 con etiqueta de histidinas purificada (10 µg), Carril 2: Control, extracto de la fracción soluble de lisado celular (25 µg), Carril 3: fracción no unida a la columna (NU) de la interacción (20 µl), Carril 4: Lavado (L) de la interacción (20 µl), Carriles 5, 6, 7 y 8: Interacción, 57a10 con extracto de *G.lamblia* (3 µg, 5 µg, 7 µg, 9 µg), Carril 9: Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standard Broad Range, BIO-RAD (MPM). La flecha indica la proteína candidata que se propone.

5.6.3 Evaluación de la unión inespecífica de proteínas solubles de *Giardia lamblia* a la resina acoplada a níquel.

Con el objetivo, de descartar que la banda de interés observada en los experimentos de la sección 5.6.2 fuera producto de la unión inespecífica de proteínas solubles de *G. lamblia* a la resina IMAC. Se llevó a cabo un control experimento que se presenta en la figura 20. En este control se incubó la fracción soluble de lisado celular de *G. lamblia* con la resina acoplada a níquel. De esta forma se pudo corroborar que la proteína candidata no es producto de una unión inespecífica, ya que, en la fracción de proteínas de *Giardia* eluidas de la resina (carril 2), no se observa ninguna proteína con un peso similar al peso aproximado de la proteína candidata (66 kDa). Por otro lado, en la fracción de proteínas no unidas a la resina (carril 3), se observa una gran pérdida de proteína, lo que indica que gran parte de las proteínas de *Giardia* no se unen por si solas a la resina IMAC.

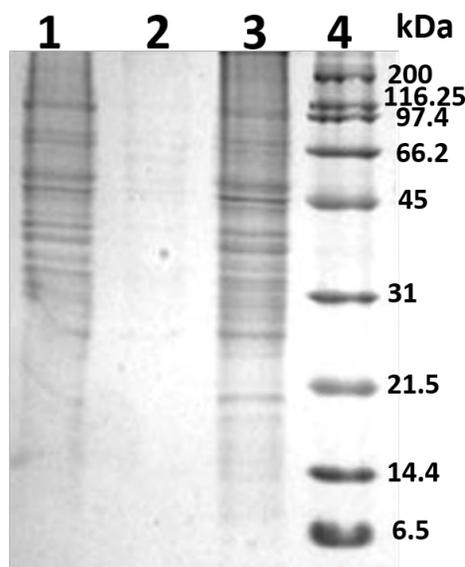


Figura 20. Experimento control para evaluar la unión inespecífica de proteínas de *Giardia lamblia* a la columna acoplada a níquel. Carril 1: Control, extracto de la fracción soluble de *G. lamblia* (30 µg), Carril 2: Eluido del experimento control (proteínas de *Giardia* eluidas de la resina), Carril 3: Proteínas de *Giardia* no unidas a la resina, Carril 4: Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standard Broad Range, BIO-RAD (MPM).

5.7 Análisis a través del tiempo de la posible proteólisis de la etiqueta de histidinas de la darpina 57a10.

La proteína 57a10 con etiqueta de histidinas posee un peso molecular de 12.24 kDa. Con el paso del tiempo se observó la aparición de una banda con peso molecular menor por lo que se sugiere que podría tratarse de la darpina 57a10 sin la etiqueta de histidinas cuyo peso correspondería a 9.7 kDa.

Debido a lo anterior, se decidió monitorear a esta proteína a lo largo del tiempo para evaluar el momento en el que aparece la banda de 9.7 kDa. En la figura 21 se presenta el gel SDS-PAGE donde se observa la presencia de esta banda (marcada con una flecha), en diferentes muestras de darpina 57a10 purificada con etiqueta de histidinas y analizada en diferentes días posteriores a la purificación.

Después de 7 días de purificar a la proteína 57a10 (Fig. 21, carriles 2 y 3) ya presenta la banda de 9.7 kDa aunque en escasa proporción. Debido a que una banda de menor peso molecular a la darpina se observó después de una semana de haberla purificado, se pensó en la posibilidad de que al estar en solución se estuviera favoreciendo la proteólisis de la etiqueta de histidinas. Por lo anterior se realizó otra purificación, y, en lugar de concentrar la proteína con centricon se precipitó con sulfato de amonio al 70% y se almacenó durante siete días. Al término de ese tiempo, la proteína precipitada se centrifugó y el botón resultante se resuspendió en amortiguador de Trizma 50 mM, pH:8.5, NaCl 100 mM y se cargó en los carriles 4 y 5 (Fig. 21) en donde también se aprecia la banda de peso molecular menor en una cantidad similar a la observada en los carriles 2 y 3 por lo que se este experimento nos demostró que precipitar a la proteína con sulfato de amonio no evita la aparición de la banda de menor peso molecular.

Así mismo, se tenían almacenadas muestras de la proteína 57a10 después de 30 días (Fig. 21, carriles 6, 7, 8 y 9) y 42 días (Fig. 21, carril 10) transcurridos después de su purificación y en ambas muestras se observa la presencia de la banda de 9.7 kDa, incluso en la muestra con mayor tiempo esta banda es mayor

también. Se estima que en la proteína almacenada durante 42 días la proporción de la proteína sin etiqueta de histidinas corresponde aproximadamente a un 50%. De acuerdo a lo observado en este gel se demuestra que en la proteína 57a10 se proteoliza de manera espontánea la etiqueta de histidinas conforme pasa el tiempo. No obstante para corroborarlo se requieren hacer otros experimentos, por ejemplo un análisis de Western blot utilizando anticuerpos anti-histidinas para corroborar que la generación de la segunda banda sea producto de la pérdida de la etiqueta de histidinas.

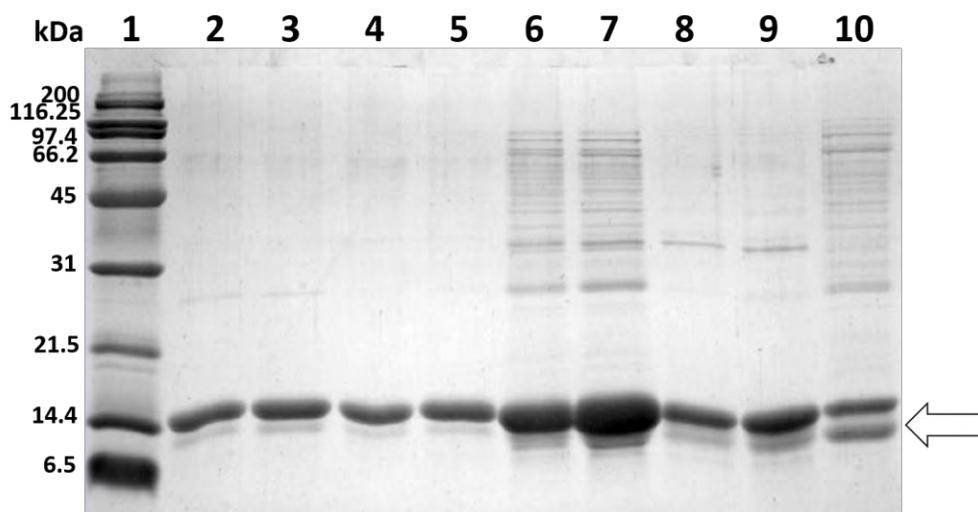


Figura 21. Comportamiento de la darpina 57a10 después de ser purificada a través del tiempo. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM), Carriles 2 y 3: 57a10 con etiqueta de histidinas y concentrada en tubo CENTRICON (7 días purificada) 8 µg y 10 µg, Carriles 4 y 5: 57a10 con etiqueta de histidinas y concentrada con sulfato de amonio al 70 % (7 días purificada) 8 µg y 10 µg, Carril 6 y 7: 57a10 con etiqueta de histidinas (30 días purificada) 4.1 µg y 7.2 µg, Carril 8 y 9: 57a10 con etiqueta de histidinas (30 días purificada) 5.1 µg y 8.3 µg, Carril 10: 57a10 con etiqueta de histidinas (42 días purificada) 6.2 µg. La flecha indica la banda correspondiente a la darpina sin la etiqueta de histidina.

6. Discusión

Dadas sus características tan peculiares, como son su estabilidad y afinidad con alta especificidad, las darpinas son moléculas con un gran número de aplicaciones. En la actualidad, estas proteínas se utilizan en áreas muy distintas de las cuales podemos resaltar el área de investigación biomédica. Los principales estudios reportados a la fecha incluyen diagnóstico de cáncer de mama (Nikolas Stefan *et al*, 2011) y tratamientos de edema macular diabético (Campochiaro P. *et al*, 2013). En el área de bioquímica de proteínas, las darpinas también se han utilizado para fomentar la cristalización de proteínas difíciles de cristalizar (Monroe N., *et al*, 2011).

Dado lo anterior, las darpinas también podrían utilizarse en la detección de blancos proteicos que faciliten el diagnóstico de organismos patógenos como bacterias u organismos parasitarios de los cuales actualmente no se tiene información. El gran número de información acerca de aplicaciones de las darpinas ponen de manifiesto la versatilidad de estas proteínas así como los campos que aún no han sido explorados utilizando a las darpinas para la búsqueda y detección de blancos terapéuticos o de diagnóstico.

En este trabajo se sobreexpresó y purificó la darpina 57a10 con un módulo de repetición de anquirina y se seleccionó a partir de una biblioteca de proteínas de un módulo de repetición previamente obtenida en el laboratorio.

La darpina 57a10 pertenece a un grupo de proteínas cuyo módulo variable se obtuvo mediante PCR a una temperatura de alineamiento de 57°C. Esta darpina fue seleccionada debido a su variedad de aminoácidos que presenta en el módulo variable con respecto a las otras proteínas obtenidas a la misma temperatura de alineamiento.

Los aminoácidos que presenta la darpina 57a10 en las posiciones variables del módulo de anquirina son RGGREGH de tal forma, que tiene aminoácidos con cadenas laterales no polares como la glicina (carga neutra), aminoácidos con cadenas laterales ácidas como el ácido glutámico (carga negativa) y también presenta aminoácidos con cadenas laterales básicas como la arginina e histidina (carga positiva).

Las otras proteínas obtenidas utilizando la misma temperatura de alineamiento presentan aminoácidos con cadenas laterales no polares y con cadenas laterales básicas, como la darpina 57a36 cuya secuencia de aminoácidos variables es AARAGRH, o la darpina 57a39 que presenta los aminoácidos GRARTAN. En el caso de las darpinas 57b1 y 57b10 básicamente todos sus aminoácidos variables son residuos de triptófano y serinas (WWWWWSN y SWSSWWN, respectivamente)

De acuerdo a lo anterior, las darpinas 57a10, 57a36, 57a39 presentan mayor diversidad de aminoácidos. Sin embargo, la 57a10 es la única que presenta un aminoácido con carga negativa, el ácido glutámico. De esta forma, la darpina 57a10 se seleccionó por presentar una mayor diversidad de aminoácidos en sus posiciones variables que sus contrapartes.

La purificación de 57a10 corroboró lo propuesto por Binz *et al* en el año 2003, donde se menciona que las cubiertas de 28 aminoácidos en los extremos amino y carboxiloterminales de las darpinas estabilizan y promueven que sean solubles en medios acuosos. Previamente Leila K. Mosavi en el año 2002 describió que un sólo módulo de repetición era altamente inestable y no podía purificarse bajo ninguna condición. Sin embargo, en este trabajo utilizando la estrategia de Binz se pudo sobreexpresar y purificar la darpina 57a10, la cual presenta un sólo módulo de repetición de anquirina flanqueado por las cubiertas amino y carboxilo terminal, como se muestra en la figura 7. Así mismo, cabe resaltar que esta proteína se pudo obtener a partir de la fracción soluble con lo que pudimos comprobar que las

cubiertas de los extremos amino y carboxilo terminal favorecieron su solubilidad. Por otro lado esta proteína pudo ser purificada en un solo paso, mediante cromatografía de afinidad obteniendo un rendimiento promedio de 28 mg/L de cultivo celular.

Uno de los métodos de cuantificación de proteínas más confiable es aprovechar la absorptividad a 280 nm de aminoácidos aromáticos de los que se obtiene su coeficiente de extinción molar. Sin embargo, para determinar dicho coeficiente es indispensable la presencia de dichos aminoácidos como el triptófano (W), la tirosina (Y) y la fenilalanina (F), así como de cisteínas (C) (Pace C. *et al*, 1995).

La mayoría de las darpinas con un módulo de repetición de anquirina obtenidas en el laboratorio, presentan un porcentaje muy reducido de aminoácidos aromáticos y carecen de cisteínas en toda su estructura. La proteína 57a10 presenta un total de 93 aminoácidos, de los cuales, sólo dos son aminoácidos aromáticos: 2 fenilalaninas (F). Carece en toda su secuencia de triptófanos (W), tirosinas (Y) y cisteínas (C). Al analizar la secuencia de aminoácidos de 57a10 con el servidor ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>), no se pudo obtener un coeficiente de extinción molar a 280 nm ya que dicho servidor arrojó un valor 0.000.

Por lo anterior se evaluaron 3 métodos de cuantificación de proteínas alternativos que se basan en la detección colorimétrica: el método de Lowry, Bradford y del ácido bicinconínico (BCA). BCA fue el método seleccionado para determinar la concentración de proteína en este trabajo ya que con este método pudimos tener una aproximación mejor de la concentración de proteína en comparación con los otros dos métodos. En los geles donde se analizaron estos resultados, la concentración proporcionada por el método de BCA fue la más aproximada a la cantidad de proteína presente en el gel, tomando como referencia la concentración conocida y observada para la GITIM (proteína de referencia).

Por otro lado, este método presenta otras ventajas respecto a los métodos de Bradford y Lowry entre las que se incluyen que el método de BCA presenta un margen de error bajo el cual puede ser causado por la interferencia que pueden producir los componentes del amortiguador en el que se encuentra la muestra, mientras que en Lowry y Bradford el margen de error causado por estas interferencias es alto. Otra ventaja es que el ácido bicinconínico no presenta una toxicidad aguda como es el caso del reactivo de Folin Ciocalteu el cual es el principal reactivo del método de Lowry y de acuerdo a su hoja de seguridad es categoría 4 en toxicidad aguda, categoría 2 en corrosión cutánea e irritación ocular y categoría 3 en toxicidad específica para determinados órganos. Por su parte el ácido bicinconínico puede generar corrosión cutánea e irritación ocular en grandes cantidades (hoja de seguridad de G-Biosciences, 2016). Fue por esto que BCA fue el método utilizado en las cuantificaciones de la darpina 57a10, debido al bajo sesgo y toxicidad que presenta.

Cómo ha sido documentado, la estructura de las darpinas está compuesta en su mayoría por hélices alfa ya que posee 2 hélices alfa antiparalelas y un giro beta. El barrido de longitud de onda en el UV lejano para 57a10 seguido por dicroísmo circular corrobora esto, como se observa en la figura.9 donde 57a10 presenta los mínimos característicos de hélices alfa a 208 y 222 nm.

La T_m de la darpina 57a10 fue de 51.83°C, este es un dato que contrasta con lo descrito por Leila K. Mosavi respecto a la inestabilidad de las darpinas con un módulo de repetición de anquirina. 57a10 pese a ser una darpina con un solo módulo que tiene 93 residuos de aminoácidos, presenta una termoestabilidad considerable. Su T_m no está muy alejada de las T_m 's reportadas para darpinas de 2, 3 y 4 módulos de anquirina cuyas temperaturas medias de desnaturalización van desde 66 a 89°C (Binz., *et al.*, 2003, Zahnd C., *et al.*, 2007).

La termoestabilidad de 57a10 se atribuye principalmente a su secuencia de aminoácidos. Se ha reportado que uno de los múltiples factores que pueden influir

en la termoestabilidad proteica es la presencia de aminoácidos hidrofóbicos, los cuales pueden ser alifáticos o aromáticos. La energía liberada por las cadenas hidrofóbicas son factores que mejoran la termoestabilidad de las proteínas (Atsushi ikai y Miyazaki., *et al* 2006).

A ese respecto, 57a10 tiene en su mayoría aminoácidos hidrofóbicos alifáticos los cuales son: 12 alaninas (A), 5 valinas (V), 11 leucinas (L), 5 isoleucinas (I), 2 metioninas (M) y 1 prolina (P). En menor cantidad presenta aminoácidos hidrofóbicos aromáticos los cuales son: 2 fenilalaninas (F). 57a10 presenta 38 aminoácidos hidrofóbicos del total de 93 que conforma su estructura, por lo que podemos decir que el 40.86% de los amino ácidos de 57a10 son hidrofóbicos. Al comparar esto con lo descrito por Ikai y Miyazaki, podemos atribuir que su composición de aminoácidos, es uno de los factores principales de la termoestabilidad presentada por 57a10.

Otras de las darpinas de un módulo de anquirina estudiadas en el laboratorio, también presentaron alta termoestabilidad, sin embargo, las temperaturas medias de desnaturalización difieren dependiendo de los aminoácidos que contienen en el módulo variable. De las 7 posiciones variables de 57a10 (RGGREGH), 3 son aminoácidos alifáticos los cuales son glicinas, teniendo así una T_m de 51.83 ° C. La darpina 55-6 con una termoestabilidad mayor que 57a10, que aún a 90 °C no se desnaturalizó en su totalidad, de sus 7 posiciones variables (LVKLVLN) 5 son aminoácidos alifáticos, 3 leucinas y 2 valinas. Por otro lado, 5834 tuvo una T_m inferior a 57a10 de 40.6 °C, y en sus 7 posiciones variables (IDEHEVH) contiene 2 aminoácidos alifáticos, una isoleucina y una valina. Comparando estas tres darpinas, se corrobora el hecho que los aminoácidos alifáticos contribuyen a la termoestabilidad de las proteínas y en el caso específico de estas darpinas es debido sólo a los aminoácidos alifáticos que se encuentran en el módulo variable.

Otra característica notable de la proteína 57a10 que se derivó de los estudios estructurales seguidos por difracción circular, fue que posteriormente a su desnaturalización y una vez que la temperatura disminuyó hasta alcanzar la

temperatura ambiente (25°C aproximadamente), 57a10 recuperó su estructura secundaria en un 80 %. De acuerdo a algunos reportes, el hecho que las proteínas puedan replegarse después de su desnaturalización térmica es atribuido a los aminoácidos hidrofóbicos alifáticos que presenta. H. Jane Dyson *et al* en el año 2006, mencionan que es posible que se lleve a cabo la formación de la estructura nativa de una proteína a partir de su estructura no plegada, esto debido a la formación de cavidades hidrofóbicas, estas cavidades se forman por interacciones débiles entre residuos de aminoácidos hidrofóbicos, que se agrupan en secciones de la cadena polipeptídica. Las cavidades hidrofóbicas pueden actuar como sitios de inicio del plegamiento (sitios de nucleación) y favorecer la formación de la estructura nativa de la proteína a partir de su estructura no plegada. 57a10 tiene aminoácidos hidrofóbicos en 40.86% de su secuencia, por lo que el replegamiento de su estructura secundaria podría ser producto de las interacciones hidrofóbicas que presenta.

En este trabajo de investigación, fue de nuestro interés buscar blancos proteicos de *Giardia lamblia* mediante su interacción con la darpina 57a10. En primer lugar, resulta importante abordar enfermedades parasitarias utilizando estas proteínas ya que no existen estudios a este respecto. Por otro lado, cabe mencionar que este parásito, causante de la giardiasis, afecta principalmente al sector infantil. Dentro de los principales síntomas se encuentra el síndrome de mala absorción que puede traer consecuencias perjudiciales para el infante. De esta forma, evaluar la interacción de 57a10 con las proteínas de la fracción soluble de lisado de *Giardia*, es un paso inicial, para el posible desarrollo a futuro de un marcador específico para este parásito, que pueda ser usado en el diagnóstico o a nivel terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad.

57a10 presentó afinidad por una proteína con un peso molecular aproximado de 66 kDa. La unión entre la darpina 57a10 con esta proteína de *Giardia* se corroboró gracias a los controles utilizados, ya que esta proteína está presente en el extracto de *Giardia lamblia*, y no en la darpina purificada no. Por otro lado el experimento

control donde se evaluó la unión no específica de proteínas de *Giardia* a la resina acoplada a níquel, tampoco mostró tener la banda de esta proteína, por lo que podemos decir que la presencia de esta proteína en los carriles de las interacciones mostradas en las figuras 17 y 18, se debió a la interacción directa con 57a10. Para poder corroborar la identidad de esta proteína afín a 57a10 y conocer sus características particulares, es necesario identificarla por medio de espectrometría de masas.

A lo largo de los experimentos realizados hasta este punto, 57a10 mostró un fenómeno particular, pese a estar precipitada en sulfato de amonio; 57a10 aparentemente autohidroliza su etiqueta de histidinas y, de acuerdo a la figura 19, esto se acentúa con el tiempo, A partir de 7 días, se observó la presencia de una banda de peso molecular menor al de la proteína 57a10, el peso molecular de esta banda extra coincide con el peso molecular de 57a10 sin etiqueta de histidinas el cual es de 9.7 kDa. Además, se observó que la intensidad de esta banda se intensificaba al paso del tiempo.

Otras de las darpinas de un módulo obtenidas en el laboratorio, presentaron este mismo fenómeno, sin embargo, 57a10 fue la que comenzaba a mostrar esta banda extra en un periodo más corto, ya que después de 7 días posteriores a la purificación comienza la aparición de la banda de 9.7 kDa

Una de las posibilidades que podría explicar este fenómeno es que los aminoácidos de las posiciones variables de la proteína 57a10 pudieran llevar a cabo la hidrólisis de la etiqueta de histidinas en un mecanismo similar al que lleva a cabo la proteasa del virus del tabaco (TEVp).

Basándose en el mecanismo de hidrólisis que tiene la TEVp, en el que se sabe que sus aminoácidos histidina₄₆ (H) y ácido aspártico₈₁ (D), desempeñan un papel fundamental en la hidrólisis de la etiqueta de histidinas (Hedstrom L., 2002). Con esto sabemos que 57a10 tiene en sus 7 posiciones variables dos argininas, tres

glicinas, una histidina y un ácido glutámico (R₃₁G₃₃G₃₄R₃₆E₄₄G₄₅H₅₇). Estas 7 posiciones variables son las que se encargan de llevar a cabo la interacción con los blancos. La histidina (H) que presenta 57a10 también podría desempeñar las funciones que lleva a cabo la histidina₄₆ (H) de TEVp, y el ácido glutámico (E) de 57a10 al ser un aminoácido con carga negativa podría actuar como un homólogo del ácido aspártico₈₁ (D) que presenta la TEVp. Sin embargo para corroborar lo antes mencionado, hacen falta varios estudios.

Este fenómeno no esperado, resulta muy relevante ya que puede dar pauta a estudios posteriores, dónde se pueda estudiar y conocer de manera precisa, el mecanismo por el cual las darpinas de un módulo están llevando a cabo este proceso de hidrólisis espontánea. Entre los experimentos que se pueden llevar a cabo para corroborar este fenómeno, se podría realizar un Western blot, utilizando anticuerpos anti-histidinas para corroborar que la generación de la segunda banda sea producto de la pérdida de la etiqueta de histidinas.

7. Conclusiones

La darpina 57a10 se sobreexpresó y purificó con alto grado de pureza, con un rendimiento promedio de 28.49 mg por litro de cultivo. Este trabajo constituye uno de los primeros reportes acerca de la caracterización de una darpina con un módulo de anquirina, de las cuales no hay reporte en la literatura ya que se les consideraba muy inestables.

La proteína 57a10 además de tener una termoestabilidad similar a la reportada para darpinas con mayor número de módulos, puede recuperar su estructura secundaria en un 80 % después de ser desnaturalizada por temperatura, lo que abre la posibilidad de emplear esta proteína en condiciones extremas de temperatura.

Además, 57a10 es afin a una proteína de *G.lambli*a, la cual tiene un peso aproximado de 66 kDa. Una vez que se conozca la identidad de esta proteína nos podría conducir a utilizarla como blanco potencial en el diagnóstico y/o tratamiento de la giardiasis.

57a10 aparentemente muestra una capacidad de autohidrólisis, lo cual resulta un fenómeno biológico muy particular ya que esta característica no se ha reportado aún para las proteínas con repeticiones de anquirina.

8. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis de licenciatura, los estudios a futuro con la darpina 57a10 pueden ser los siguientes.

- a) Identificar por medio de espectrometría de masas la proteína de *Giardia lamblia* que tuvo afinidad por la darpina 57a10.
- b) Por medio de un Western blot utilizando anticuerpos anti histidina, identificar si la población de darpina 57a10 presente en la banda con peso menor efectivamente está perdiendo la etiqueta de histidinas o bien que se esté hidrolizando en otro sitio.
- c) Estudiar los dominios involucrados en el fenómeno de hidrólisis espontánea de la etiqueta de histidinas por medio de la resolución de su estructura cristalográfica.
- d) Si se confirma la actividad proteolítica de 57a10, se podría poner a reaccionar con otras proteínas con etiqueta de histidinas y estudiar dicha actividad.

9. Referencias

- A. S. Zdanov, (2003), Tobacco Etch Virus Protease: Crystal Structure of the Active Enzyme and Its Inactive Mutant, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Vol. 29, No. 5, 2003, pp. 415–417.
- Andonegui J., Jiménez L., (2008), Edema macular diabético, An. Sist. Sanit. Navar, Vol. 31, Suplemento 3, 35-44.
- Binz H., *et al*, (2003), Designing Repeat Proteins: Well-expressed, Soluble and Stable Proteins from Combinatorial Libraries of Consensus Ankyrin Repeat Proteins, 490-501.
- Blandina T *et al*, (2017) Cryptosporidium and Giardia Infections in Children: A Review, Pediatric Clinics of North America, Vol. 64, 837-850.
- Bradford, M.M., (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anual. Biochem. 72, pp: 248-254.
- Campochiaro P. *et al*, (2013), Treatment of Diabetic Macular Edema With a Designed Ankyrin Repeat Protein That Binds Vascular Endothelial Growth Factor: A Phase I/II Study, American Journal of Ophtalmology, Vol. 155, No. 4, 697-704.
- Enríquez-Flores S. *et al*, (2011), Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite Giardia lamblia: A study for antiparasitic drug design, Proteins; 79:2711–2724.

- Escobedo AA, *et al*, (2018), Giardiasis: a diagnosis that should be considered regardless of the setting, *Epidemiol Infect*, 1-3.
- David S. Waugh, (2011), An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags, *Protein Expr Purif*, 80(2): 283–293.
- Gallagher P., *et al*, (1997), Structure and Organization of the Human Ankyrin-1 Gene, *the journal of biological chemistry*, Vol. 272, No. 31 ,19220-19228.
- Hedstrom L., (2002), Serine Protease Mechanism and Specificity, *Chemical Reviews*, Vol. 102, No. 12, pp. 4501–4523.
- Hjøllø T *et al*, (2018), Longitudinal cohort study of serum antibody responses towards *Giardia lamblia* variant-specific surface proteins in a non-endemic área, *Experimental Parasitology*, Vol. 191, 66-72.
- Humberto García Arellano y Rafael Vázquez Duhalt (1998), Cuantificación de proteínas: Una revisión, *Bio Tecnología*, Vol.3, 77-84.
- Hoja de seguridad de G-Biosciences, (2012), Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay, Safety Data Sheet according to Federal Register / Vol. 77, No. 58, pp:2.
- H. Jane Dyson *et al*, (2006), The role of hydrophobic interactions in initiation and propagation of protein folding, *PNAS*, vol.103, no.35, pp: 13057-13061.
- Ikai A. *et al*, (1980), Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins, Department of Biophysics and Biochemistry, *J. Biochem.* 88, 1895-1898.

- Iris Koch, Heinz, Schwarz, Dirk Beuchle, Bernd Goellner, Maria Langeegger, Hermann Aberle, (2008), *Drosophila Ankyrin 2 Is Required for Synaptic Stability*, cell press, Neuron 58, 210–222.
- Jernigan K. et al., (2014), *Ankyrin domains across the Tree of Life*. PeerJ 2:e264; DOI 10.7717/peerj.264
- J.S.C. Olson, John Markwell (2007), *Assays for Determination of Protein Concentration*, Current Protocols in Protein Science, Vol. 3, No. 1, pp. 3–29.
- Monroe N., *et al*, *Designed ankyrin repeat protein binders for the crystallization of AcrB: Plasticity of the dominant interface*, Journal of Structural Biology, No.174,269–281.
- Moody P., *et al*, (2014), *A rapid, site-selective and efficient route to the dual modification of DARPins*, Chem. Commun., 50, 4898-4900.
- Mosavi L., *et al*, (2002), *Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif*, PNAS, vol. 99, no. 25, 16029 –16034.
- Milovnik P., *et al*, (2009), *Selection and characterization of DARPins specific for the neurotensin receptor 1*, Protein Engineering, Design & Selection, vol. 22, no. 6, pp. 357–366.
- Miyazakia K. *et al*, (2006), *Thermal Stabilization of Bacillus Subtilis Family-11 Xylanase by Directed Evolution*, The Journal of Biological Chemistry, 281, pp: 10236-10242.
- Michaely P., *et al*, (2002) *Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR*, The EMBO Journal Vol. 21 No. 23, 6387 - 6396.

- Peace C., *et al*, (1995), How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Science*, no.4, 2411-2423.
- Pluckthun A., (2015), Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55:489-511.
- Poljack R., *et al*, (1974), The Three-Dimensional Structure of the Fab' Fragment of a Human Myeloma Immunoglobulin at 2.0-Å Resolution, *Proc. Nat. Acad. Sci*, Vol. 71, No. 9, 3440-3444.
- Secretaria de salud México, (2018), Boletín Epidemiológico Vigilancia Epidemiológica Semana 28, Vol.35, No.12, 18-20.
- Sedgwick G., Smerdon J., (1999), The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework, *TIBS*, Vol.24, 311-316.
- Seeger M., *et al*, (2013), Design, construction, and characterization of a second-generation DARPin library with reduced hydrophobicity, *Protein Science*. Vol 22, 1239-1257.
- Sun-Hee Leem *et al*, (1998), Meiotic role of SWI6 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Research*, Vol. 26, No. 13, 604-714.
- Stumpp M. *et al*, (2008), DARPs: A new generation of protein therapeutics, *Drug Discovery Today*, Vol. 13, No. 15/16, 695-701.
- Tamaskovic R. *et al*, (2012), Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): From Research to Therapy, 102-112.

- T Merz *et al.* (2007), Stabilizing Ionic Interactions in a Full-Consensus Ankyrin Repeat Protein, 232-240.
- Ykelien L Boersma y Andreas Plückthun, (2011), DARPins and other proteins scaffolds: Advance In engineering and applications, Current Opinion in Biotechnology , 22:849–857.
- Zahnd C., et al, (2007), A Designed Ankyrin Repeat Protein Evolved to Picomolar Affinity to Her2, J. Mol. Biol.369, 1015-1028.
- Zahnd C, Amstutz P, Plückthun A., (2007) Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target, Nat Methods, 269-279.

Anexo: Resumen de la elaboración de la biblioteca de darpinas de 1 módulo de repetición

La biblioteca de darpinas de un módulo de repetición, se elaboró previamente en el laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría por la Dra. Itzhel García Torres. A continuación se presenta los pasos que se llevaron a cabo para la elaboración de la biblioteca, como fue la síntesis de las secuencias de las cubiertas amino y carboxilo terminal, su posterior ligación en el plásmido pET3a Δ , la obtención de los módulos de repetición de anquirina a partir de 3 oligonucleótidos (int1, int2, int3), y posteriormente la unión del módulo de anquirina al plásmido que contiene las cubiertas amino y carboxilo terminal. Finalmente, se hablará de las diferentes clonas que se obtuvieron y la razón por la que 57a10 fue seleccionada para este trabajo de investigación.

Ligación de las secuencias de las cubiertas de los extremos amino y carboxilo terminal al plásmido pET3a Δ

Las secuencias de DNA codificantes para las cubiertas amino y carboxilo terminal que flanquean a las darpinas fueron sintetizadas comercialmente en la compañía Genscript (Piscataway, Nueva Jersey, EUA). Para ello, se diseñó un gen que contenían estas secuencias flanqueadas con los sitios de restricción NdeI y Bpu1102I, así mismo entre ambas cubiertas se insertaron los sitios de restricción BsaI y BpiI con la finalidad de insertar entre las cubiertas el módulo variable de anquirina. El arreglo del gen sintetizado en el Genscript se esquematiza en la figura A1.

Una vez sintetizado, este gen fue clonado en el plásmido pET3a Δ utilizando los sitios de restricción NdeI y Bpu1102I. El plásmido pET3a Δ , carece de sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BsaI y BpiI, este plásmido fue mutado previamente también por la compañía Genscript, ya que de manera original el plásmido pET3a contiene 2 sitios para la enzima BsaI y tres sitios para

Bpil. Por tal motivo estos sitios se mutaron para que al clonar los genes que codifican para las cubiertas amino y carboxilo terminal en el plásmido pET3aΔ, sólo existiera un sitio de restricción para Bsal y Bpil y poder insertar ahí el módulo variable de anquirina.



Figura A1. Representación de la secuencia de las cubiertas amino y carboxilo terminal, sintetizada en la compañía Genscript. Las cubiertas amino y carboxilo terminal se muestran en verde, secuencia espaciadora en amarillo y los sitios de restricción que flanquean las secuencias se muestran en azul.

Amplificación del módulo de repetición por medio de la unión de 3 oligonucleótidos por medio de PCR de ensamble

El siguiente paso fue la elaboración del módulo variable de anquirina, el cual se obtuvo mediante PCR de ensamble utilizando 3 oligonucleótidos denominados Int1, Int2 e Int3.

Int1 e int2 en sentido 5´ a 3´ mientras que int3 en sentido inverso, estos 3 oligonucleótidos presentan codones degenerados en posiciones específicas, las cuales corresponden a los aminoácidos variables de las darpinas (figura A2).

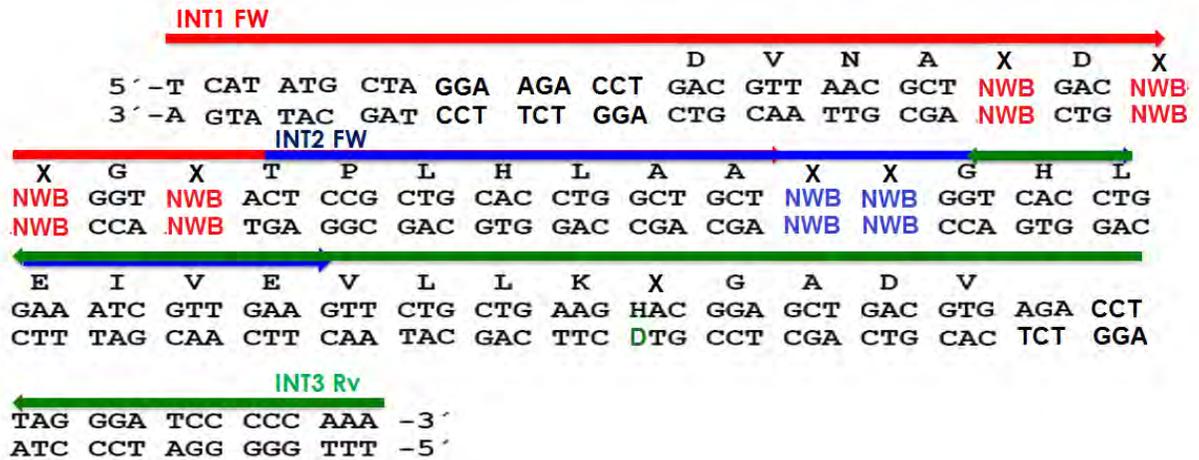


Figura A2. Secuencia completa del módulo de repetición de una darpina, formada a partir del ensamble de 3 oligonucleótidos. Se ilustra el Oligonucleótido int1 (rojo), int2 (azul) e int3 (verde), las posiciones de aminoácidos marcados como X representan los tripletes degenerados contenidos en los 3 oligos, int1(rojo), int2(azul) e int3(verde). Así mismo las X en las posiciones de aminoácidos indican que se pueden generar diferentes aminoácidos de estas combinaciones.

En la figura A3, se presentan las combinaciones que presentan los 3 oligonucleótidos en sus posiciones degeneradas. Int1 e int2 tiene la combinación NWB, donde N puede generar las bases adenina, timina, guanina y citosina, W adeninas y timinas y B guaninas, timinas y citosinas, por otro lado int1a e int2a presentan la combinación RSR, donde R puede generar adeninas o guaninas y S guaninas y citosinas, por último int1b e int2b presentan la combinación TSG donde T y G hacen referencia a las bases timina y guanina, mientras que en S se pueden presentar las bases guanina y citosina. El oligonucleótido int3 no presenta variantes, como en el caso de int1 e int2, su única posición degenerada denominada D puede generar guaninas, adeninas o timinas.

Int1	
T CAT ATG CTA GGA AGA CCT GAC GTT AAC GCT NWB GAC	
NWB NWB GGT NWB ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT	
Int1a	NWB
T CAT ATG CTA GGA AGA CCT GAC GTT AAC GCT RSR GAC	N= A+G+C+T
RSR RSR GGT RSR ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT	W= A+T
Int1b	B= G+T+C
T CAT ATG CTA GGA AGA CCT GAC GTT AAC GCT TSG GAC	RSR
TSG TSG GGT TSG ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT	R= A+G
Int2	S= G+C
ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT NWB NWB GGT CAC CTG	TSG
GAA ATC GTT GAA	T= Timina
Int2a	S= G+C
ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT RSR RSR GGT CAC CTG GAA	G= Guanina
ATC GTT GAA	
Int2b	
ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT TSG TSG GGT CAC CTG GAA	
ATC GTT GAA	
Int3	
TTT GGG GGA TCC CTA AGG TCT CAC GTC AGC TCC GTD CTT	
CAG CAT AAC TTC AAC GAT TTC CAG GTG ACC	
D= G+A+T	

Figura A3. Secuencias de los oligonucleótidos Int1, int2 e int3. Oligonucleótido Int1 y sus combinaciones (rojo), Oligonucleótido int2 y sus combinaciones (azul), Oligonucleótido int3 y su posición degenerada (verde).

La secuencia completa de las darpinas de un módulo de repetición tiene un total de 7 posiciones degeneradas, las cuales corresponden a los 7 aminoácidos variables característicos de las darpinas, los cuales usan para interactuar con sus blancos, las combinaciones de bases que se dan en estas posiciones generan diversos aminoácidos, los cuales se presentan en la tabla A1.

Oligonucleótido	Combinación	Aminoácidos
In1	NWB	Ile, Met, Asn, Lys, Val, Asp, Glu, Leu, His, Gln, Phe, Tyr
In1a	RSR	Arg, Thr, Gly, Ala
In1b	TSG	Ser, Trp
In2	NWB	Ile, Met, Asn, Lys, Val, Asp, Glu, Leu, His, Gln, Phe, Tyr
In2a	RSR	Arg, Thr, Gly, Ala
In2b	TSG	Ser, Trp
In3	D	Asn, His, Tyr

Tabla A1. Aminoácidos que se pueden obtener a partir de las diferentes combinaciones de bases en las posiciones degeneradas de los 3 oligonucleótidos.

Con todo esto, se probaron diferentes combinaciones de estos oligonucleótidos a diferentes temperaturas de alineamiento (tabla A2) en la reacción de PCR, para obtener así diferentes secuencias de darpinas de un módulo, las cuales se insertaron en el plásmido pET3a (Tabla A2).

Temperatura de alineamiento	Oligonucleótidos
	Int
45 a	1a,2a,3
55	1,2,3
55 a	1a,2a,3
55b	1b,2b,3
56	1,2,3
57	1,2,3
57 a	1a,2a,3
57b	1b,2b,3
58	1,2,3

Tabla A2. Combinaciones de oligonucleótidos generadas a diferentes temperaturas de alineamiento.

La secuencia de los módulos de repetición se encuentra flanqueada por los sitios de restricción Bsal y Bpi1, como se mencionó anteriormente las secuencias de las cubiertas amino y carboxilo terminal presentan los sitios Bsal y Bpi1 por lo que para insertar la secuencia del módulo variable, el plásmido pET3aΔ que contenía las cubiertas fue digerido con las enzimas de restricción Bsal y Bpi1, de esta manera la secuencia del módulo variable se insertó en estos sitios, con ayuda de la T4 DNA ligasa, teniendo así la secuencia completa de la darpina con su módulo de repetición y sus cubiertas en los extremos amino y carboxilo terminal, todo esto contenido en el plásmido pET3aΔ.

Para este trabajo se utilizaron únicamente los módulos variables obtenidos a una temperatura de alineamiento de 57°C, con la combinación de oligonucleótidos int 1a, 2a y 3, a esta temperatura y con estos oligos, se obtuvieron 7 clonas, de las cuales 5 resultaron positivas, los aminoácidos variables obtenidos de las secuencias de estas clonas positivas se muestran en la tabla A3.

Nombre	Amino ácidos variables
57 a10	R₃₁G₃₃G₃₄R₃₆E₄₄G₄₅H₅₇
57 a36	AARAGRH
57 a39	GRARTAN
57 b1	WWWWWSN
57 b10	SWSSWWN

Tabla A3. Aminoácidos variables de las clonas obtenidas a una temperatura de alineamiento de 57°C.

57a10 fue la darpina seleccionada ya que tiene una mayor diversidad de aminoácidos en sus posiciones variables, al contar con aminoácidos de cadenas laterales no polares como la glicina (carga neutra), aminoácidos con cadenas laterales ácidas como el ácido glutámico (carga negativa) y también presenta aminoácidos con cadenas laterales básicas como la arginina e histidina (carga positiva), a diferencia de las demás clonas que únicamente cuentan con aminoácidos de carga positiva y neutra.