



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ROP2 DE  
*Toxoplasma gondii* EN *Escherichia coli*."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

Luis Gerardo Molina Roque



MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Jurado asignado:

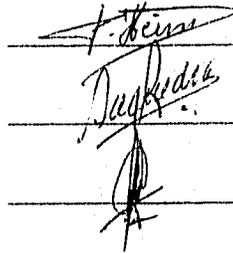
Presidente	Prof. VELASCO CASTREJÓN OSCAR
Vocal	Prof. HERNÁNDEZ MONTES HOMERO
Secretario	Prof. HÉRION SCOHY PASCAL RENÉ PAUL.
1er. suplente	Prof. RESÉNDIZ VÁZQUEZ BERTHA
2o. suplente	Prof. ROMERO ÁVILA MARÍA TERESA

Sitio donde se desarrolló el tema: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM.

Asesor: Dr. PASCAL RENÉ PAUL HÉRION SCOHY

Supervisor técnico: Dr. RAFAEL S. SAAVEDRA DURÁN

Sustentante: LUIS GERARDO MOLINA ROQUE



The image shows three handwritten signatures, each written over a horizontal line. The top signature is in cursive and appears to be 'P. Hérion'. The middle signature is also in cursive and appears to be 'Rafael S. Saavedra Durán'. The bottom signature is in cursive and appears to be 'Luis Gerardo Molina Roque'.

*A mis mamá y papá, por darme  
la gran oportunidad de vivir  
y estar con ellos.*

*A mis hermanos Reyna, Rosario y Pepe,  
por aceptarme tal como soy y  
ayudarme en todo momento.*

*A Berenice, por su paciencia inmensa.*

*A los Doctores Pascal Hérion y Rafael Saavedra,  
por darme la primera oportunidad.*

*A todas las personas que me han ayudado a  
comprender la vida y enfrentarla.*

## ÍNDICE

	Página
<b>CAPÍTULO I</b>	
INTRODUCCIÓN	7
1 TOXOPLASMOSIS	7
2 <i>Toxoplasma gondii</i>	8
2.1 Estructura	8
2.2 Ciclo de vida	9
3 CEPAS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	12
4 EXPRESIÓN GENÉTICA EN <i>Toxoplasma gondii</i>	13
5 RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>Toxoplasma gondii</i>	15
5.1 Respuesta Inmune Humoral	15
5.2 Respuesta Inmune Celular	15
6 ANTÍGENOS	17
7 PROTEÍNA ROP2	18
7.1 Aspectos Biológicos	18
7.2 Aspectos Inmunológicos	19
7.3 Estructura de ROP2	20
7.5 Expresión de ROP2 en <i>E. coli</i>	21
8 SISTEMAS DE EXPRESIÓN	22
8.1 Plásmidos	23
8.2 Plásmido pRSETA	24
<b>CAPÍTULO II</b>	
OBJETIVO	27
<b>CAPÍTULO III</b>	
MATERIAL Y MÉTODOS	28
1 CEPAS BACTERIANAS-PLÁSMIDOS-FAGOS	28

1.1 Bacteria <i>E. coli</i> XL1-Blue	28
1.2 Plásmido pRSETA	28
1.3 Plásmido pBKSTg34	30
1.4 Fago M13T7	30
2 MEDIOS DE CULTIVO	33
2.1 Medio Luria-Bertani (L.B)	33
2.2 Medio L.B agar	33
2.3 Medio L.B-tetraciclina-ampicilina	33
2.4 Medio L.B agar-tetraciclina-ampicilina	33
2.5 Medio SOB	33
2.6 Medio SOB-tetraciclina-ampicilina	33
2.7 Medio L.B agar de superficie	33
3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i> CON DNA PLASMÍDICO	33
4 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO. MÉTODO DE MINI-PREP	34
5 ANÁLISIS DE DNA POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 %	35
6 DIGESTIÓN DE DNA PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	35
7 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO CON COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO QIAGEN-tip 100 (MÉTODO DE MIDI-PREP)	36
8 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DE DNA OBTENIDO POR MIDI-PREP (MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO)	37
9 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA PLASMÍDICO	38
9.1 Digestión con enzimas de restricción	38

9.2 Purificación de fragmentos de DNA con matriz Prep-A-Gene	38
10 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA CON LA ENZIMA T4 DNA LIGASA	39
11 PREPARACIÓN Y TITULACIÓN DEL "STOCK" DEL FAGO M13/T7	40
11.1 Aislamiento de placas	40
11.2 Comprobación de la presencia del fago M13/T7	40
11.3 Preparación del "stock" del fago M13/T7	40
11.4 Titulación del "stock"	41
12 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN BACTERIAS TRANSFORMADAS CON EL VECTOR pRSETA	41
13 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS	42
14 TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS CON AZUL DE COOMASSIE	43
15 WESTERN BLOT	43
15.1 Electrotransferencia	43
15.2 Inmunodetección de la proteína ROP2 sobre el blot	44
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>I EXPRESIÓN DE UNA FORMA RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA ROP2 USANDO EL PLÁSMIDO pRSETA</b>	<b>45</b>
1.1 Diseño de la construcción	45
1.2 Producción y purificación del plásmido pRSETA	48
1.3 Clonación del DNA que codifica para la síntesis de la proteína ROP2 en el plásmido pRSETA	51
1.4 Expresión de la proteína ROP2 en <i>E. coli</i> XL1-Blue pRSETA Tg34/M/II	60

2	MODIFICACIÓN DEL VECTOR pRSETA	66
2.1	Diseño para la modificación del plásmido pRSETA	66
2.2	Construcción del vector pRSETAR	68
3	EXPRESIÓN DE UNA FORMA RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA ROP2 USANDO EL VECTOR pRSETAR	77
3.1	Construcción del plásmido pRSETAR Tg34/M/H	77
3.2	Expresión de la proteína recombinante ROP2 en <i>E. coli</i> XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H	84
4	COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN <i>E. coli</i> XL1-Blue pRSETA Tg34/M/H y pRSETAR Tg34/M/H	85
<b>CAPÍTULO V</b>		
	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
<b>CAPÍTULO VI</b>		
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>97</b>
	<b>APÉNDICE</b>	<b>101</b>

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### I TOXOPLASMOSIS

La toxoplasmosis es una infección causada por el protozooario *Toxoplasma gondii* (Velasco y col., 1992). Cursa de manera asintomática en la mayor parte de los individuos que la adquieren, sin embargo, puede causar serios daños a individuos inmunocomprometidos o cuando se presenta de manera congénita (Wong y Remington, 1993). La toxoplasmosis congénita se presenta cuando, en mujeres embarazadas infectadas, el parásito atraviesa la placenta y llega al feto causándole daños que dependen del periodo de gestación en que se encuentre. Los daños son más severos si la infección ocurre durante las primeras semanas de la gestación, causando el aborto o los daños neurológicos en el producto se manifiestan al nacer o después. La principal manifestación de la toxoplasmosis congénita es la retinocoroiditis. Por ser un parásito inocuo para la mayoría de la población, la infección postnatal cursa asintomáticamente o con síntomas leves e inespecíficos, por lo que es difícil su diagnóstico. En individuos inmunocomprometidos (personas con SIDA o pacientes con trasplantes que reciben terapia inmunosupresora) la infección primaria o la reactivación de una infección latente son causa de cuadros severos como la encefalitis toxoplásmica o incluso la toxoplasmosis generalizada (Jackson y Hutchison, 1989). La forma principal de transmisión de la infección es por medio de la ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida que contiene quistes tisulares del parásito o por la ingestión de agua o alimentos contaminados por oocistos del parásito (Dubey, 1993).

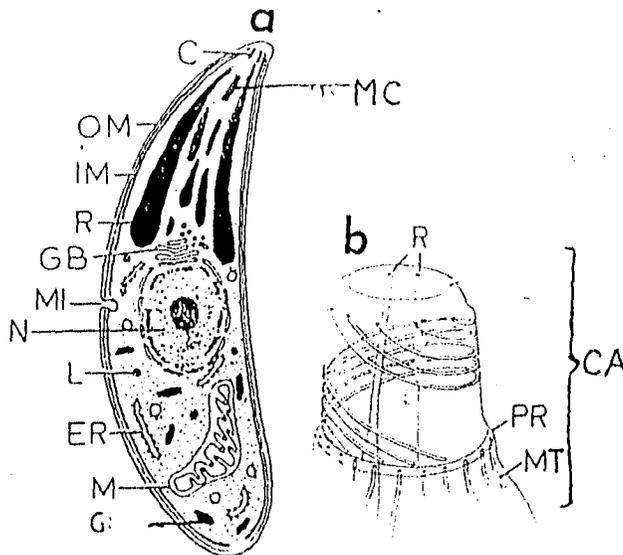
Es difícil determinar la incidencia de la toxoplasmosis sintomática en una población, debido a la ausencia de síntomas específicos. En México, en 1990 el IMSS clasificó a la toxoplasmosis como una enfermedad transmisible y reportó 1.9 casos clínicos por cada 100 000 derechohabientes y tan sólo 17 casos de toxoplasmosis congénita en una población de 37 millones de habitantes (Instituto Mexicano del Seguro Social, 1990). En un estudio seroepidemiológico realizado en México entre 1989 y 1990, se determinó que la prevalencia de individuos seropositivos (infectados crónicamente) era del 32%, como consecuencia, en el país habría cerca de 26 millones de personas infectadas (Velasco y col., 1992). En

estudios basados también en pruebas serológicas, se ha reportado que la incidencia mundial promedio de toxoplasmosis humana es de 33%, pero la incidencia varía entre los distintos países según sus condiciones ambientales, fauna, higiene y los hábitos alimenticios de sus habitantes; por ejemplo, en Francia la alta seroprevalencia (80 %) se debe a la costumbre de comer carne insuficientemente cocida; en cambio, en América Latina se debe a la contaminación del ambiente y alimentos por oocistos (Jackson y Hutchison, 1989).

## **2 *Toxoplasma gondii***

### **2.1 Estructura**

El *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un protozoo intracelular obligado, de forma arqueada (Figura 1.1) y capaz de infectar varios tipos de células. Como las demás células eucariotas, tiene núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, ribosomas, lisosomas y mitocondrias, pero en su periferia posee un conjunto de tres membranas llamado pellicula (Wong y Renington, 1993); la membrana más externa es continua, mientras las dos membranas internas son discontinuas en el centro del parásito, generando el microporo; y también son discontinuas en los extremos anterior y posterior (Dubey, 1993). En el extremo anterior del parásito se encuentra el complejo apical que comprende el anillo polar rodeando a una estructura llamada conoide (un cono truncado compuesto de fibras en un arreglo en espiral); a partir de este anillo polar surgen microtúbulos que se extienden a lo largo de la célula y constituyen un citoesqueleto subpelicular involucrado en la locomoción del parásito. En el interior del conoide desembocan de 4 a 8 estructuras en forma de saco alargado llamadas roptrias; cerca de las roptrias se encuentran algunas estructuras globulares llamadas micronemas. El parásito también contiene gránulos densos distribuidos en todo su citoplasma. Las roptrias, los micronemas y los gránulos densos son estructuras que tienen funciones secretoras importantes durante la invasión de la célula huésped por el parásito (Wong y Renington, 1993).



**Figura 1.1.** Estructura de un taquizofo de *Toxoplasma gondii*. (a) Microorganismo completo. (b) Extremo anterior del taquizofo. Abreviaturas: C: conoide, CA: complejo apical, ER: retículo endoplásmico, GB: aparato de Golgi, G: gránulos densos, IM: membranas internas, L: lisosomas, M: mitocondrias, MT: microtúbulos, MC: microenemas, MI: microporo, N: núcleo, OM: membrana externa, PR: anillo polar, R: roptrias (tomado de Dubey, 1993).

## 2.2 Ciclo de vida

En el ciclo de vida de *T. gondii* (Figura 1.2) se pueden identificar tres estadios del parásito: el taquizofo, el bradizofo y el esporozofo (Dubey, 1993). El taquizofo es la forma asexual infectiva del parásito (Wong y Remington, 1993), invade a la célula en un proceso que inicia con la adherencia entre la superficie celular y el complejo apical, fenómeno en el que participan algunas proteínas de superficie como los receptores de la laminina en la célula huésped, la laminina, algunas proteínas semejantes a las lectinas y la proteína P30 del parásito (Kasper y Mineo, 1991). La entrada del parásito a la célula es favorecida por eventos mecánicos como la protrusión del conoide, el movimiento en espiral del parásito (los movimientos dependen del gradiente de pH y la concentración extracelular de iones) y la exocitosis

del contenido de las roptrias y de los micronemas. Cuando el parásito penetra a la célula, se forma una vacuola en la que reside (vacuola parasitófora). Dentro de esta vacuola hay antígenos secretados por el parásito (entre los que se encuentran las proteínas de superficie P43, P35, P30, P22 y una proteína presente en el extremo posterior del parásito conocida como P28), estos antígenos forman una red reticular (Kasper y Boothroyd, 1993). La membrana de la vacuola parasitófora carece de proteínas de superficie de la célula huésped, pero contiene proteínas del parásito. Se ha mostrado la participación de otras proteínas en el proceso de invasión, como el factor acrecentador de penetración (PEF o ROP1), localizado en las roptrias, o la fosfolipasa A2 de la célula huésped (Kasper y Minco, 1991). Se ha encontrado que el taquizoito puede bloquear la unión entre los lisosomas y la vacuola parasitófora, y también bloquea la acidificación de ésta, permitiendo la sobrevivencia del parásito dentro de la célula huésped (Kasper y Boothroyd, 1993). Una vez dentro de la célula, el taquizoíto se multiplica asexualmente por endodiogenia, causando la muerte de la célula huésped y la liberación de los nuevos taquizoístos (Dubey, 1993).

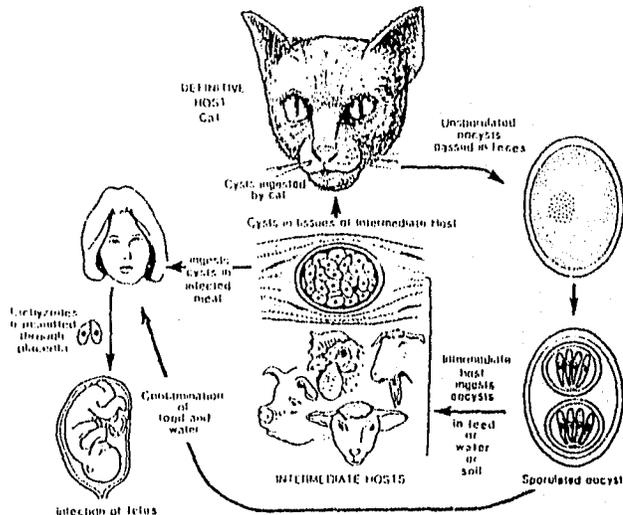


Figura 1.2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Tomada de Dubey, 1993)

En respuesta a señales aún no determinadas, el taquizoito se diferencia en bradizofo. Este último se encuentra dentro de estructuras conocidas como quistes tisulares que se forman en el citoplasma de la célula infectada. Los quistes tienen una pared formada con componentes del parásito y de la célula huésped. Los quistes varían en tamaño y en el número de bradizofoitos contenidos, llegando a tener hasta cientos de estos (Wong y Remington, 1993). Los quistes tisulares se pueden encontrar en distintos órganos (pulmón, hígado, riñones), pero principalmente en los tejidos nervioso y muscular, donde pueden permanecer durante toda la vida del huésped sin causarle daño (Dubey, 1993), dando lugar a una infección latente o crónica. Se piensa que en un individuo inmunocomprometido los quistes tisulares son fuente de reactivación de la infección (Wong y Remington, 1993). Los bradizofoitos estructuralmente difieren muy poco de los taquizofoitos, contienen vacuolas con carbohidratos (probable fuente de energía durante la infección latente), su reproducción es muy lenta y son más resistentes a la digestión con enzimas (Dubey, 1993).

En la vida del parásito se han identificado dos ciclos: el ciclo enteroepitelial u sexual, presente en los felinos, y el ciclo extraintestinal o asexual que se presenta en cualquier animal de sangre caliente (aves y mamíferos) (Jackson y Hutchison, 1989). Generalmente, el ciclo enteroepitelial o sexual se inicia con la ingestión de quistes tisulares (en la carne cruda) por un felino (generalmente un gato); la pared del quiste es disuelta por enzimas gástricas, los bradizofoitos son liberados, invaden a las células del epitelio intestinal en las que se reproducen y se diseminan (Wong y Remington, 1993). En el intestino, algunos bradizofoitos presentan un proceso de gametogénesis, en la cual el parásito atraviesa por varias etapas hasta su diferenciación en gametos femeninos (macrogametos de forma semiesférica) o masculinos (microgametos o células biflageladas con material nuclear principalmente) (Dubey, 1993). Al encontrarse, ambos gametos se unen formando un cigoto, el cual se rodea por una pared protectora dando lugar a un ooquiste esférico que es excretado al ambiente en las heces del felino (Wong y Remington, 1993). La maduración o esporulación del ooquiste requiere de 1 a 5 días de exposición al ambiente; en este periodo se forman dos esporoquistes en su interior que, a su vez, contienen cuatro esporozofoitos cada uno. Los esporozofoitos son estructuralmente semejantes al taquizofoito, excepto en el número de micronemas y roptrias (Dubey, 1993). Los ooquistes maduros son altamente infectivos y pueden permanecer viables por varios años en el suelo. Durante una infección un gato puede excretar hasta  $10^8$  ooquistes por día (Kasper y Boothroyd, 1993).

El ciclo extraintestinal ocurre en los huéspedes definitivos (los felinos) y en los huéspedes intermediarios como el hombre, otros mamíferos (perros, cerdos, vacas) y ocasionalmente en aves. Este ciclo se inicia cuando el huésped ingiere ooquistes esporulados (en los alimentos o el agua contaminados) o quistes tisulares (en la carne mal cocida); la pared del quiste es digerida por las enzimas gástricas y los parásitos liberados invaden células epiteliales y células fagocíticas, y se diseminan por vía linfática y sanguínea a otros órganos (Jackson y Hutchison, 1989). Durante la fase aguda de la infección, el parásito invade las células de diferentes tejidos y se reproduce rápidamente en forma de taquizoito (Wong y Remington, 1993). Los parásitos pueden ser eliminados por la respuesta inmune del huésped o pueden formar quistes tisulares ocasionando una infección crónica. En el hombre, la infección también puede deberse a trasplantes de tejidos infectados por el parásito (Jackson y Hutchison, 1989).

Cuando una mujer embarazada tiene toxoplasmosis aguda, el parásito puede atravesar la placenta llegando a la circulación sanguínea fetal y provocando una infección generalizada en el feto para posteriormente localizarse en los tejidos visceral y nervioso. Como se mencionó, las consecuencias de la infección congénita dependen de la etapa de embarazo en que ésta se presente (Dubey, 1993), siendo más severas si ocurre en las primeras semanas de la gestación, pudiendo ser causa de aborto, daños neuronales, trombosis o retinocoroiditis en el producto (Jackson y Hutchison, 1989).

### 3 CEPAS DE *Toxoplasma gondii*

Se han descrito varias cepas de *T. gondii* que difieren en su grado de virulencia en animales de laboratorio. Las cepas de *T. gondii* mantenidas en el laboratorio suelen tener distinta virulencia al ser comparadas con los parásitos aislados de la naturaleza. Por ejemplo, la cepa RH ha sido mantenida durante más de 50 años en cultivos de fibroblastos y en la cavidad peritoneal de ratones, es muy virulenta e incapaz de formar quistes tisulares u ooquistes. Para explicar la diferencia en la virulencia se han tratado de identificar antígenos específicos de cada cepa. Se sabe que los sueros contra la cepa RH y contra otras cepas menos virulentas (C36 o C57) reaccionan contra los mismos antígenos de superficie (Kasper y Boothroyd, 1993) y que los antígenos principales de *T. gondii* están presentes en

las diversas cepas (Wong y Remington, 1993). En contraste, algunos experimentos mostraron diferencias antigénicas entre la cepa RH y otras cepas (P y C) (Kasper y Boothroyd, 1993), y se observó la probable ausencia de un antígeno de 23 kDa en cepas avirulentas (Wong y Remington, 1993). La probable diferencia antigénica entre las cepas de *T. gondii* puede estar apoyada por los resultados obtenidos al analizar su polimorfismo en el patrón de restricción de DNA; en este análisis se encontró una posible correlación entre la virulencia y la existencia de un alelo específico del gen de la proteína P30 (Kasper y Boothroyd, 1993). El resultado obtenido en el análisis isoenzimático de *T. gondii* también muestra diferencias entre cepas virulentas y no virulentas (Wong y Remington, 1993).

#### 4 EXPRESIÓN GENÉTICA EN *Toxoplasma gondii*

El genoma de *T. gondii* es haploide (McLeod y col., 1991) y contiene  $8 \times 10^7$  pb repartidas en 11 cromosomas, 10 de ellos de 2-10 Mpb y uno de 40 Mpb. Aparentemente el cariotipo varía muy poco entre las distintas cepas del protozooario y no se altera en aquellas que han sido mantenidas durante mucho tiempo en laboratorio (Kasper y Boothroyd, 1993). El DNA de *T. gondii* no tiene bases metiladas, lo cual es importante en la regulación de la transcripción de su información genética (McLeod y col., 1991). *T. gondii* tiene además DNA circular mitocondrial de 36 kpb con una secuencia de 10 kpb repetida (Kasper y Boothroyd, 1993).

Se han secuenciado algunos genes de *T. gondii* (tabla 1.1). Al analizarlos no se encontraron secuencias consenso parecidas a las existentes en genes de otras células eucariotes y que funcionan como promotores o activadores; sólo se ha identificado una secuencia CAAT en el extremo 5' del gen p23, y un conjunto de 27 pb repetido en el extremo 5' del gen p30, pero la función de estas secuencias es desconocida. El genoma de del parásito posee sólo una copia de los genes identificados, a excepción del gen B1 que está repetido varias veces y cuya proteína aún no se ha identificada en el parásito (McLeod y col., 1991). No se han detectado RNA polimerasas especiales de *T. gondii*, pero se sabe que su mRNA es poliadenilado. Algunos genes de *T. gondii* tienen intrones, lo que hace evidente la existencia de modificaciones postranscripcionales ("splicing") del mRNA, además, en el RNA se han encontrado señales para estas modificaciones, comunes en otras células eucariotas (Kasper y Boothroyd, 1993).

Tabla 1.1. Genes de *T. gondii* clonados y caracterizados (Tomada de Cesbron-Delauw y col., 1993).

NOMBRE	OTROS NOMBRES	LOCALIZACIÓN	PROTEÍNA (kDa)	mRNA (kb)
SAG1	P30	superficie	30	1.5
SAG2	P22	superficie	22	1.6
SAG3	P43	superficie	43	
GRA1	P23, P27	gránulos densos	22, 23, 27	1.4
GRA2	P28	gránulos densos	28, 28.5	1.1
GRA3		gránulos densos	30	
GRA4		gránulos densos	40	
GRA5	P21	gránulos densos	21	
ROP1	PEF	roptrias	60, 60.5	2.1
ROP2	P54, TG34	roptrias	54, 55	1.6
MIC1		micronemas	60	
TUB1	a - tubulina	microtúbulos		1.4
TUB2	b - tubulina	microtúbulos		1.4
DTS1	DIFR			
NTP1	NTPasa, P63	secretada	63	2.8
B1				1.6

Para la traducción del mRNA, *T. gondii* emplea el código genético universal. Después de determinar la secuencia del gen de la proteína P30 y predecir su secuencia de aminoácidos, se encontró que, en el precursor de la proteína, probablemente existe un péptido señal que es eliminado postraduccionalmente (Kasper y Boothroyd, 1993). Otras evidencias de modificaciones postraduccionales han sido obtenidas en los experimentos para la caracterización de proteínas de las roptrias (Sadak y col., 1988). El codón de iniciación de traducción de algunos genes de *T. gondii* ha sido predicho usando la regla de Kozack. En los genes con mayor expresión en el parásito (P30, NTPasa), el tercer nucleótido de los codones es preferentemente una G o C (Kasper y Boothroyd, 1993). Las secuencias del gen repetido B1 o de p30 han sido utilizadas para el desarrollo de técnicas de diagnóstico por PCR en las que se detecta DNA del parásito en el líquido amniótico, en el líquido cefalorraquídeo y en las muestras de tejidos (Wong y Remington, 1993).

## 5 RESPUESTA INMUNE CONTRA *Toxoplasma gondii*

### 5.1 Respuesta Inmune Humoral

En la toxoplasmosis el individuo produce inmunoglobulinas contra antígenos de superficie y secretados (Wong y Remington, 1993). Empleando la técnica de Western blot, en sueros de personas infectadas de manera natural se han podido identificar anticuerpos contra las proteínas P22 y P30. No obstante, las fracciones IgG e IgM, recuperadas de sueros de personas con infección aguda o crónica, pueden tener distintas especificidades: la fracción IgM reacciona principalmente con un antígeno de 6 kDa, mientras la fracción IgG reacciona con proteínas de pesos moleculares entre 22 y 67 kDa. Se ha encontrado IgA específica contra *T. gondii* en ratones infectados con bradizoítos y en personas seropositivas para *T. gondii*, e incluso la detección de IgA específica para la proteína de superficie P30 ha sido empleada en la serodiagnos de la toxoplasmosis aguda y congénita. La producción de IgA ha sido corroborada en modelos experimentales al analizar suero, leche y secreciones intestinales de ratones infectados (Kasper y Boothroyd, 1993).

La probable participación de la respuesta inmune humoral en el control de la infección es sugerida por algunos experimentos de transferencia pasiva de inmunidad en ratones: se observó que la transferencia de anticuerpos monoclonales o suero inmune contra antígenos de *T. gondii* confiere cierto grado de protección a ratones infectados; *in vitro*, anticuerpos monoclonales, sueros anti-P30 (Kasper y Boothroyd, 1993) o suero anti-*T. gondii* son capaces de lisar taquizoítos en presencia de complemento (Wong y Remington, 1993). *In vitro*, la opsonización del parásito, antes de su entrada a la célula, estimula la fusión de la vacuola parasitófora con el lisosoma, causando la muerte intracelular del parásito. No obstante, la respuesta inmune humoral no tiene un papel importante en la protección contra la toxoplasmosis (Kasper y Boothroyd, 1993).

### 5.2 Respuesta Inmune Celular

La reactivación de la toxoplasmosis crónica en las personas con SIDA, la protección contra la infección como consecuencia de la transferencia adoptiva de linfocitos inmunes a animales de laboratorio, la respuesta proliferativa de los linfocitos al contacto con antígenos de *T. gondii*, (Suzuki y col., 1988)

y la muerte de ratones con toxoplasmosis aguda o crónica debida a la eliminación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> (Kasper y Boothroyd, 1993), entre otros hallazgos, han llevado a la conclusión de que la inmunidad celular es el principal mecanismo de resistencia contra la toxoplasmosis (Suzuki y col., 1988).

En ratones, la infección con *T. gondii* aumenta la actividad citotóxica que las células NK tienen *in vitro*, aún contra taquizoítos libres; este aumento de citotoxicidad se correlaciona con el aumento del nivel de INF- $\gamma$  (Kasper y Boothroyd, 1993). Sin embargo, en el hombre aumentan los niveles de células NK, pero no tienen actividad citotóxica contra el parásito *in vitro*, a menos de ser activados con IL-2. No obstante, la actividad de células NK no es suficiente para la protección del huésped contra la infección (Wong y Remington, 1993).

A partir de células de sangre periférica de personas seropositivas para *T. gondii*, se aislaron clones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que proliferan al ser expuestos a taquizoítos atenuados o antígenos de *T. gondii*. Estas clones son productoras de INF- $\gamma$  y/o IL-2 y, algunas de ellas, limitan el crecimiento de taquizoítos al ser cocultivadas con éstos (Saavedra y col., 1991; Cannesa y col., 1988).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son importantes en la inmunidad celular protectora contra la infección, lo cual es demostrado por un experimento realizado en ratones, en el que la resistencia inducida por vacunación contra *T. gondii* disminuye al eliminar estos linfocitos T con anticuerpos monoclonales (Gazzinelli y col., 1991). Además, se ha visto que; aumenta el número absoluto y la cantidad relativa de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la sangre periférica de ratones y de humanos infectados (Kasper y Boothroyd, 1993), que estas células tienen actividad citotóxica sobre células infectadas de ratones (Hakim y col., 1991) y que estos linfocitos sintetizan INF- $\gamma$ , el cual es el principal mediador de actividad protectora contra la toxoplasmosis (Gazzinelli y col., 1994).

La actividad protectora del INF- $\gamma$  fue demostrada en experimentos en los que la administración de anticuerpos anti-INF- $\gamma$  a ratones infectados con una cepa avirulenta de *T. gondii* ocasiona la muerte de estos. El efecto principal de esta citocina es la activación de macrófagos, aumentando su capacidad parasitocida (Suzuki y col., 1988). Al parecer, el aumento de esta capacidad se debe a una mayor producción de metabolitos intermediarios de oxígeno y nitrógeno, letales para el microorganismo

intracelular (Murray y Cohn, 1979; Wong y Remington, 1993). El efecto antiparasitario inducido por esta citocina también se observa cuando es añadida en cultivos de fibroblastos; este efecto fue relacionado a alteraciones en el metabolismo del triptofano en la célula huésped, ocasionando la disminución intracelular de este aminoácido, sugiriendo que el parásito puede ser incapaz de sintetizarlo (Pfefferkorn y col., 1986).

La IL-2 juega un papel importante en la inmunidad contra la toxoplasmosis, pues la administración de esta citocina reduce la mortalidad en ratones infectados con dosis letales (Kasper y Boothroyd, 1993).

Se ha observado que el TNF- $\alpha$  no tiene actividad directa sobre la reproducción del parásito en los macrófagos extraídos del peritoneo de ratones infectados o en los fibroblastos cultivados e infectados. En ratones, la susceptibilidad a encefalitis toxoplásmica se ha asociado a la presencia de un patrón de restricción determinado del gen del TNF- $\alpha$  y a una elevada síntesis de su mRNA. En distintos experimentos se ha encontrado que el TNF- $\alpha$  puede regular la acción del INF- $\gamma$  sobre los macrófagos (Kasper y Boothroyd, 1993).

La IL-10 inhibe la producción de INF- $\gamma$  por células T y bloquea la actividad del INF- $\gamma$  sobre los macrófagos (Kasper y Boothroyd, 1993). En cambio, la IL-12 participa en la respuesta protectora contra la toxoplasmosis aguda (la mortalidad aumenta en ratones infectados que han sido tratados con anticuerpos anti-IL 12) y un probable mecanismo es su acción sinérgica con el INF- $\gamma$  para inducir selección de linfocitos protectores Th1 (Gazzinelli y col., 1994).

## 6 ANTÍGENOS

Ha sido investigada la diferencia antigénica entre los tres distintos estadios del parásito. Se identificaron dos proteínas de 67 y 25 kDa exclusivas de la membrana de los esporozoitos, y se encontró que los sueros de personas que fueron infectadas con ooquistes reaccionan contra estos antígenos. La baja reactividad de los bradizoitos con los sueros preparados contra ooquistes, los sueros contra taquizoitos o los anticuerpos monoclonales contra antígenos de taquizoitos, sugiere la existencia de

diferencias antigénicas entre el bradizoíto y los otros estadios. Además, se han identificado algunos antígenos peliculares de 36, 34, 21 y 18 kDa específicos del bradizoíto. En experimentos con anticuerpos monoclonales se encontró que las proteínas P30 y P22 son exclusivas de los taquizoítos (Kasper y Boothroyd, 1993).

La proteína P30 es la principal proteína de superficie del parásito, reacciona con sueros de humanos con infección aguda o crónica. En el modelo murino, P30 puede estimular la producción de inmunoglobulinas, activar linfocitos productores de  $\text{IL-}\gamma$  e inducir proliferación de células T citotóxicas. Se logró proteger a ratones contra un reto con una dosis letal del parásito por medio de la inmunización con la proteína P30, pero la protección dependió de la vía de inmunización, del adyuvante empleado y de la vía de inoculación del parásito.

Anticuerpos contra la proteína P22 sólo son encontrados en etapas avanzadas de la infección. La P22 ha sido empleada en la detección de IgA e IgM. Los antígenos excretados o secretados (ESA) por el parásito, como los que se encuentran en la red reticular en la vacuola parasitófora, parecen inducir respuesta inmune humoral y/o celular (Wong y Remington, 1993).

Parece existir un conjunto de antígenos comunes en los tres estadios (22-34 kDa) y pueden ser importantes para el desarrollo de una vacuna (Kasper y Boothroyd, 1993). También se han estudiado los aspectos inmunológicos de algunas proteínas de las roptrias como ROP1 y ROP2 (Wong y Remington, 1993).

## **7 PROTEÍNA ROP2**

### **7.1 Aspectos Biológicos**

Tomando en cuenta la importancia de las roptrias en la invasión de la célula por *T. gondii*, Sadak y col. (1988) identificaron 3 proteínas exclusivas de las roptrias de *T. gondii*; estas proteínas tienen pesos moleculares de 55, 59 y 60 kDa, y aparentemente provienen de precursores de 65, 71 y 68 kDa respectivamente. Se sugirió que estos precursores son modificados postraduccionalmente en un proceso

proteolítico que puede ocurrir durante el tránsito de las proteínas en el aparato de Golgi o durante su empaque en las roptrias. Las tres proteínas fueron encontradas en los tres estadios del parásito y se observó que algunas probablemente tienen epítomos comunes.

Lerich y Dubremetz (1991), a partir de taquizoítos cultivados, aislaron roptrias y gránulos densos por centrifugación en gradiente. Identificaron un conjunto de 5 proteínas (entre las que se encontraban las 3 proteínas anteriormente descritas) y determinaron su punto isoeléctrico (Pi). Estas proteínas son: ROP1 (60.5 kDa, Pi 5.8), ROP2 (55 kDa), ROP3 (59 kDa), ROP4 (60 kDa) y ROP5 (59.5 kDa), las cuatro últimas con un Pi mayor a 8.0.

En vista de que la membrana lipídica que rodea la vacuola parasitófora seguramente media las interacciones entre el parásito y la célula huésped; Beekers y col. (1994) proponen que las proteínas del parásito localizadas en la membrana de la vacuola pueden tener funciones de transporte de nutrientes o interactuar con organelos celulares del huésped. En la membrana de la vacuola parasitófora encontraron proteínas de las roptrias (sueros preparados contra gránulos densos y roptrias reaccionan con componentes de esta membrana). Usando sueros policlonales, determinaron que estas proteínas son ROP2, ROP4 y/o ROP7, y están distribuidas en un arreglo bien definido en la membrana de la vacuola parasitófora. Estos investigadores emplearon un suero policlonal contra una forma recombinante de la proteína ROP2 para detectar, por inmunoelectromicroscopía e inmunofluorescencia, la presencia de ROP2 en la membrana de la vacuola parasitófora de fibroblastos infectados con taquizoítos. También demostraron que ROP2 está firmemente asociada a la membrana de las roptrias y de la vacuola parasitófora.

## 7.2 Aspectos Inmunológicos

Debido a que la inmunidad celular, mediada por IFN- $\gamma$ , es el principal mecanismo de protección contra *T. gondii*, la identificación de antígenos del parásito activadores de linfocitos T productores de INF- $\gamma$  es importante para el desarrollo de una vacuna. Saavedra y col. (1991), a partir de una librería de cDNA de *T. gondii* en el fago  $\lambda$ gt11, aislaron una clona (Tg34) que contiene la información genética que codifica para un antígeno de 54 kDa; éste fue expresado, como péptido de fusión con la

$\beta$ -galactosidasa, en lisógenos de *E. coli* Y1089. La proteína recombinante expresada reaccionó con suero murino y humano anti-*T. gondii*. Esta proteína también indujo proliferación de una clona de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (clona TCC32), productora de IFN- $\gamma$  y que fue aislada de una persona seropositiva para *T. gondii*. El epítopo reconocido por la clona TCC 32 está presente en cepas avirulentas y virulentas del parásito, y la presentación de este epítopo a la clona TCC 32 está restringida por la molécula del MHC DPw4, un alelo muy común en la población. Héron y col. (1993) determinaron que este antígeno está localizado en las roptrias de *T. gondii* y que se trata de la proteína identificada anteriormente como ROP2.

Van Gelder y col. (1993), empleando un fragmento de ROP2 (330 aminoácidos del extremo carboxi-terminal) expresado en *E. coli*, demostraron la presencia de anticuerpos anti-ROP2 en el suero de más del 89% de las personas seropositivas para *T. gondii*, por lo que este antígeno es capaz de activar una respuesta inmune humoral en la mayor parte de individuos que han sido infectados.

Becerril (1996) identificó tres secuencias de aminoácidos de la proteína ROP2 que contienen epítopos reconocidos por linfocitos T de individuos seropositivos a *T. gondii* y encontró que estos epítopos inducen respuesta proliferativa en linfocitos del 63% de estos individuos.

### 7.3 Estructura de ROP2

A partir de la clona Tg34, Saavedra y col. (1991) subclonaron el cDNA aislado (con la información genética para ROP2) en el plásmido pBKS(+) y secuenciaron esta información. La secuencia comprende 1803 pb (ver figura 3.3, página 35) y contiene un marco abierto de lectura de 1620 pb que codifica para un polipéptido de 66 kDa, pero no posee el codón inicial, por lo que se trata de una clona parcial que no contiene toda la información codificadora para ROP2. Beckers y col. (1994) también clonaron un segmento interno del gen de ROP2 en el fago  $\lambda$ gt11 y aislaron, de una librería de DNA genómico, una clona con el gen de ROP2 completo. La secuencia reportada por estos investigadores sólo difiere de la reportada antes (Saavedra y col., 1991) por la presencia del codón de

iniciación ATG. Al comparar la secuencia del cDNA y del DNA genómico correspondiente, se observó que el gen de ROP2 no contiene intrones.

Al analizar la secuencia de 561 aminoácidos de ROP2, predicha a partir de la secuencia de nucleótidos reportada, se observa que existen dos regiones hidrofóbicas; una de ellas comprende los primeros 26 residuos y se trata de una secuencia clásica de señalización (péptido señal) que probablemente es cortada de la proteína dando lugar al precursor de 61 kDa ya identificado. La segunda región hidrofóbica se encuentra entre los residuos 466 y 486, y probablemente es una región transmembranal (que explicaría la asociación de ROP2 con la membrana de la roptria y de la vacuola parasitófora). Una probable remoción de 50 a 80 residuos, resultado de una modificación postraduccional, daría origen a la proteína ROP2 madura (55 kDa) identificada en las roptrias y lisados del parásito, sin embargo aún no se conoce la secuencia de la proteína madura. El resto de la proteína ROP2 está caracterizado por la presencia de muchos aminoácidos cargados y residuos de prolina (Beckers y col., 1994; Saavedra y col., 1991).

#### 7.4 Expresión de ROP2 en *E. coli*

La presencia de ROP2 en los distintos estadios y cepas de *T. gondii*, y su probable participación en la inducción de la respuesta inmune celular protectora, han llevado a estudiar esta proteína con más detalle y considerarla como candidato a formar parte de una vacuna contra la toxoplasmosis, por lo que es necesario disponer de cantidades abundantes de la proteína ROP2. Para lograr este objetivo se podría purificar la proteína a partir de taquizoitos cultivados, pero esto es poco práctico debido al costo elevado del cultivo del parásito, a la pequeña cantidad de proteína ROP2 que se puede obtener y a la complejidad del proceso de purificación. Otra opción es producirla como proteína recombinante en algún sistema de expresión.

Van Gelder y col. (1993) clonaron la información genética de ROP2 (aislada en la clona Tg34) en el vector de expresión pGALMPH y expresaron la proteína recombinante en *E. coli*, pero tuvieron dos problemas: un bajo nivel de expresión y la degradación intracelular de la proteína recombinante.

Estos investigadores subclonaron un fragmento de cDNA de ROP2 (aquel que codifica para los 330 aminoácidos del extremo amino de esta proteína) en el vector de expresión pIGAL.MPH y lograron expresar la proteína (como péptido de fusión) en la cepa de *E. coli* DH1, en un alto nivel de expresión y con mínima degradación. Después de su purificación, esta proteína recombinante conservó su reactividad con suero de personas seropositivas para *T. gondii* y fue empleada para serodiagnóstico de la infección. Sin embargo, esta forma recombinante de la proteína no contiene uno de sus principales epítomos T, lo que constituye una importante desventaja para su evaluación como candidato a vacuna.

## 8 SISTEMAS DE EXPRESIÓN

Para obtener una proteína o algún péptido en cantidades suficientes para distintos fines, se pueden purificar a partir del organismo que los produce o se puede recurrir a la ingeniería genética. En esta área se han diseñado sistemas de expresión caracterizados por tener dos elementos principales: el **vector** de expresión, capaz de recibir el **inserto** o información genética para la síntesis de la proteína, y la célula huésped en donde se hace posible la expresión de la proteína. A la proteína producida con estos sistemas de expresión se le conoce como **proteína recombinante**. Entre los sistemas de expresión disponibles, existen aquellos que hacen uso de células eucariotas (levaduras, células de mamífero o de insecto) o células procariotas. En los sistemas eucariotes los vectores empleados pueden ser virus o plásmidos; tienen la ventaja de que pueden llevarse a cabo cambios postraduccionales de las proteínas en la célula huésped (formación de puentes disulfuro, glicosilación, inserción en membranas, fosforilación) y son empleados para estudiar la biosíntesis de la proteína, su transporte en la célula o para la obtención de proteínas funcionales, entre otros fines (Singer y Berg, 1991; Altling-Mees y col., 1993).

Para la expresión en células procariotes se emplea comúnmente a la bacteria *E. coli* y los vectores empleados son plásmidos específicos de esta bacteria. En estos sistemas, la proteína puede ser expresada como proteína nativa o como una **proteína de fusión**, codificada en parte por la información genética del inserto y en parte por el vector, esto con el fin de lograr un alto nivel de transcripción, traducción y estabilidad de la proteína sintetizada (Alberts y col., 1989).

Para la elección de un sistema de expresión se deben analizar varios aspectos: la finalidad de la expresión, la estructura de la proteína (si necesita modificaciones postraduccionales, su carga, su estabilidad), el tamaño y el tipo de información genética del inserto, el nivel de expresión deseado y la necesidad de regular la expresión (Aiting-Mees y col., 1993).

### 8.1 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA de doble cadena, con un tamaño de 1 a 200 kpb; se encuentran en varias bacterias en donde funcionan como unidades genéticas accesorias capaces de replicarse de forma independiente al DNA cromosómico, pero usando enzimas bacterianas para su replicación y transcripción. Los plásmidos tienen genes que codifican para proteínas con funciones que, bajo ciertas circunstancias, son ventajosas para la bacteria, por ejemplo: genes de resistencia a antibióticos o genes de colicinas (Sambrook y col., 1989; Singer y Berg, 1991).

Los plásmidos contienen un sitio de origen de replicación y los elementos para el control de la misma, conformando una unidad llamada replicón; ejemplos de replicones son: pMB1 o Col E1. Éstos pueden ser funcionales aún en ausencia de síntesis de proteínas en la bacteria. El número de copias de un plásmido en una bacteria puede variar desde una hasta cientos, dependiendo del replicón que contiene (Sambrook y col., 1989).

Se han modificado los plásmidos artificialmente: a aquellos con replicones que determinan un alto número de copias se les ha introducido algún marcador, es decir, DNA con información para algún carácter fenotípico que será presentado por la bacteria que posee el plásmido y que permite diferenciarla y seleccionarla (los marcadores más comunes son los genes de resistencia a antibióticos); también se les han eliminado secuencias de DNA no necesarias, de esta manera se reduce su tamaño y aumenta su capacidad de recibir insertos más grandes. Además, se ha racionalizado la distribución de ciertos sitios de restricción, confinándolos a una secuencia pequeña conocida como "poli-linker" o sitio múltiple de clonación. Adyacentes a estos sitios de clonación, se han colocado secuencias promotoras específicas derivadas de genes de bacterias o de fagos, de tal forma que la transcripción del inserto estará

controlada por estos promotores. Un buen número de vectores poseen poderosos promotores capaces de dirigir una alta transcripción del mRNA sintetizado a partir del inserto, con el objeto de expresar grandes cantidades de la proteína recombinante. La existencia de ciertos promotores (como el promotor del operón lac) ha permitido que la transcripción y la expresión del inserto puedan ser controladas experimentalmente (sistema inducible). Para la expresión de insertos provenientes de segmentos internos de algún gen, se han construido plásmidos que contienen, hacia 3' del promotor, secuencias conocidas como sitios de unión al ribosoma (RBS); estos sitios comprenden un codón de iniciación de la traducción (ATG) precedido por una secuencia de 9 nucleótidos complementaria al RNA ribosomal (16s) de *E. coli*; esta secuencia permite la unión del mRNA al ribosoma, necesaria para iniciar la traducción (Sambrook y col., 1989).

## 8.2 Plásmido PRSET

Se han diseñado vectores de expresión que contienen promotores de la RNA polimerasa del fago T7, como los plásmidos pET y pT7. La T7 RNA polimerasa (producto del gen 1 del fago T7) reconoce eficientemente a sus promotores y transcribe las secuencias controladas por éstos, incluso secuencias que no son eficientemente transcritas por la RNA polimerasa de *E. coli*. A la bacteria transformada con uno de estos plásmidos se le puede proveer de la T7 RNA polimerasa con la introducción de un segundo vector, generalmente un fago lisogénico, que tiene insertado el gen 1. Si la proteína a expresar es tóxica para la bacteria, la adición del fago puede llevarse a cabo en una etapa adecuada del crecimiento bacteriano (Hausmann, 1988; Dunn y Studier, 1983; Studier y col., 1990; Sambrook y col., 1989; Tabor y Richardson, 1985).

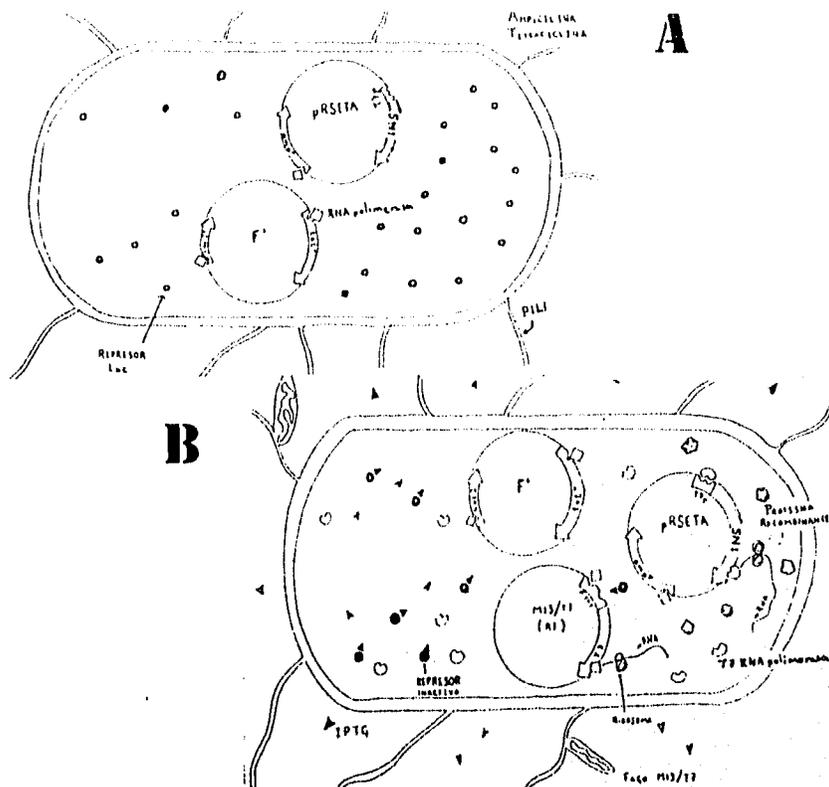
Los vectores pRSETA,B y C (figura 2.1), derivados de los plásmidos pUC, fueron diseñados para obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Poseen el replicón Col E1, el marcador de resistencia a la ampicilina y la secuencia F1 ori (origen de replicación para la síntesis de DNA de cadena simple). La transcripción del inserto está controlada por el promotor  $\phi 10$  de la T7 RNA polimerasa. La proteína recombinante se expresa en forma de una proteína de fusión que contiene, en su extremo amino-terminal, un péptido codificado por el vector. El plásmido posee la

información para el sitio de unión al ribosoma en el mRNA sintetizado a partir del promotor. En el plásmido, la información genética que codifica para el péptido del extremo amino-terminal incluye: un conjunto de 6 codones que codifican la incorporación de 6 residuos consecutivos de histidina (dominio de unión a metal) y otro conjunto de codones que codifican la incorporación de residuos de aminoácidos que forman la secuencia de reconocimiento de la enzima proteolítica enterocinasa. El dominio de unión a metal (o poli-his) sirve para purificar la proteína por cromatografía de afinidad sobre metal inmovilizado y el sitio de reconocimiento de la enterocinasa permite remover la secuencia N-terminal del péptido de fusión.

Los vectores de expresión pRSET A, B y C difieren en la secuencia de su sitio múltiple de clonación, de tal manera que los sitios de restricción se encuentran desplazados con respecto a la fase de lectura. Una vez que se ha seleccionado el sitio de restricción adecuado para la clonación del inserto, la elección del vector apropiada (A, B, o C) permitirá que la traducción del inserto se haga en la fase de lectura correcta.

Las cepas de *E. coli* empleadas para expresión con estos vectores deben ser susceptibles de infectarse con el fago M13/T7 y, por lo tanto, deben expresar pili sexual codificado por el episoma F'. El fago M13/T7 no causa lisis de la bacteria y tiene la información genética para la síntesis de la enzima T7 RNA polimerasa bajo control del promotor lac, por lo que, en presencia del represor lac no hay expresión de la enzima.

En la regulación de la expresión de la proteína recombinante en este sistema participan tres elementos importantes: la bacteria *E. coli*, el plásmido y el fago M13/T7. Los tres elementos interactúan de la siguiente forma (Figura 1.3): en un cultivo de la bacteria *E. coli* transformada con el plásmido pRSET con el inserto (por ejemplo Tg34), la adición de algún inductor del promotor lac, como el IPTG, inactivará las moléculas del represor lac sintetizadas constitutivamente por la bacteria. La infección de este cultivo con el fago M13/T7 conducirá a la expresión de la enzima T7 RNA polimerasa en la bacteria. Como consecuencia, la enzima T7 RNA polimerasa transcribirá la secuencia de DNA que contiene la información para la síntesis de la proteína recombinante y, por tanto, también hará posible la expresión de esta proteína en la bacteria.



**Figura 1.3.** Expresión de una proteína recombinante empleando el sistema de expresión pRSETA. (A) En un cultivo en medio con tetraciclina y ampicilina, la bacteria *E. coli* XL1-Blue transformada con el vector pRSETA con el inserto (INS) produce grandes cantidades del represor lac (●) (información codificada por el gen *lac I* del plásmido F' y transcrita por la RNA polimerasa (○) de *E. coli*). En ausencia de la T7 RNA polimerasa, no hay transcripción del inserto del plásmido pRSETA. (B) Al añadir una cantidad suficiente de IPTG (▲) al cultivo, éste inactiva todas las moléculas del represor lac. Después de infectar a la bacteria con el fago M13/T7, se produce la forma replicativa (RI) del fago. En ausencia del represor lac activo, la RNA polimerasa bacteriana transcribe el gen de la T7 RNA polimerasa (T7) insertado en el genoma del fago y los ribosomas (⊗) traducen el mRNA sintetizado. La T7 RNA polimerasa (⊕) sintetizada reconoce al promotor T7 (T7p) del plásmido pRSETA y transcribe el inserto, lo que lleva a la síntesis de la proteína recombinante (⊙). Otras abreviaturas: *nimp*: gen de resistencia a ampicilina, *tet*: gen de resistencia a tetraciclina.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVO

Con el fin de producir la proteína ROP2 de *T. gondii* en cantidad abundante y en una forma susceptible de ser purificada fácilmente para disponer de ella para la evaluación de su actividad inmunoprotectora en modelos experimentales, nos proponemos expresar una forma recombinante de la proteína ROP2 que carezca de su péptido señal en la bacteria *E. coli*, empleando el sistema pRSETA. La decisión de remover el péptido señal está basada en la observación de que regiones hidrofóbicas presentes en proteínas recombinantes tienen un efecto tóxico en la célula bacteriana, probablemente debido a la asociación de estas proteínas con sistemas membranales que son vitales para la bacteria, por lo que es deseable remover péptidos señal y regiones transmembranales si éstas no son de interés.

De manera general, el trabajo experimental consta de las siguientes etapas:

- a) Obtener el vector de expresión pRSETA en cantidad suficiente para los experimentos de clonación de la información genética que codifica para la proteína ROP2 sin su péptido señal.
- b) Clonar la información genética para la síntesis de la proteína ROP2 en el vector de expresión.
- c) Analizar la expresión de la proteína recombinante en bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido construido, para ello emplearemos las técnicas de:
  - electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie
  - Western blot.

## CAPÍTULO III

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### I CEPAS BACTERIANAS - PLÁSMIDOS - FAGOS

**1.1 Bacteria *E. coli* XL1-Blue** (Stratagene, La Jolla, CA., U.S.A.). La cepa *E. coli* XL1-Blue posee el plásmido F' que codifica para la síntesis de los pilis sexuales necesarios para la infección por el fago filamentosos M13. Además, este plásmido contiene el gen *lacI<sup>q</sup>* que dirige una sobreproducción del represor lac (10 veces mayor que en la bacteria huésped) y contiene el gen de resistencia a la tetraciclina (*tet<sup>r</sup>*), por lo que las bacterias con el plásmido F' pueden seleccionarse en un medio con este antibiótico. *E. coli* XL1-Blue tiene la mutación *hdsR17* de la subunidad Hds de la enzima EcoK, la cual previene la digestión, por el sistema endonucleasa EcoK, del DNA clonado en la bacteria. La deficiencia en el sistema de recombinación (*recA1*) asegura la estabilidad del inserto y la deficiencia en endonucleasa (*endA1*) aumenta la estabilidad del DNA plasmídico de la bacteria. Genotipo: *recA1. endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI<sup>q</sup> ΔM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)*

**1.2 Plásmido pRSETA** (Invitrogen, San Diego, CA., U.S.A.). El vector de expresión pRSETA tiene un tamaño de 2949 pb y en su secuencia posee (ver figura 3.1):

- a) El promotor  $\phi 10$  del fago T7, capaz de controlar la transcripción de secuencias de DNA insertadas en el sitio múltiple de clonación del plásmido (posición 2914-2931).
- b) La secuencia sitio de unión al ribosoma que comprende una serie de nucleótidos localizados antes del codón inicial ATG (posición 2882-2870).
- c) El codón inicial de traducción ATG (posición 2867).
- d) La secuencia con información para la incorporación de 6 residuos de histidina en el péptido de fusión (dominio polí-His), éstos permiten purificar la proteína recombinante (posición 2824-2841).
- e) La secuencia con la información para la síntesis del sitio de hidrólisis por la enzima proteolítica enterocinasa (posición 2761-2775).
- f) El sitio múltiple de clonación (posición 2709-2774).

5' 3'

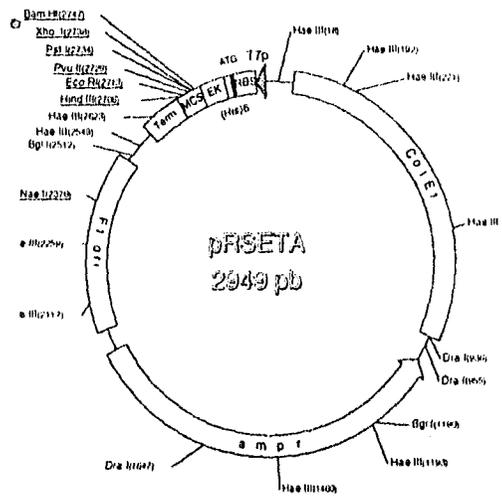
2949 ATCTCGAICCCGGGAAATTAATACCGACICACTAATAGGGGAGACCACAACGGGTTCCTCCICAGATAATTTTGHTTAACTTT  
T7p

2870 AAGAACCGAGATATACATATG CCG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG  
RBS M B R G S H H H H H H G M A S M T G G Q  
(HIS)6

2797 CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC  
Q M G R D L Y D D D K D P S G S E L E I C  
EK

2727 TGGTACCATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGCTAA~~CAAAAGCCCGAAACGGAAGCTGAGTTGGCTGCCGCCACCCGC~~  
Term

2650 GAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGQCCTGAAACGGGCTCTTQAGGGGIIIIIGCTGAAAGGAGGAACTATAI  
Term



**Figura 3.1.** Mapa de restricción del plásmido pRSETA. Abreviaturas: T7p: promotor del fago T7, RBS: sitio de unión al ribosoma, ATG: codón de iniciación de la traducción, (HIS)6: secuencia con información para la incorporación de 6 residuos de histidina, EK: secuencia con información genética para la síntesis del sitio de hidrólisis por la enzima proteolítica enterocinasa, MCS: sitio múltiple de clonación, Term: secuencia para finalización de la transcripción, ColE1: origen de replicación del plásmido, F1 ori: origen de replicación del fago f1 con el cual es posible la síntesis de DNA de cadena simple cuando la bacteria que contiene el plásmido es coinfectada con un fago cooperador, amp<sup>r</sup>: gen de resistencia al antibiótico ampicilina y su promotor. Los sitios de restricción únicos están subrayados. En la parte superior de la figura está escrita la secuencia de nucleótidos de la región del plásmido que va desde el promotor T7 hasta la secuencia de terminación de la transcripción. También está escrita el extremo amino-terminal del péptido de fusión que es codificado por el plásmido de acuerdo al código genético universal (Ver en el apéndice).

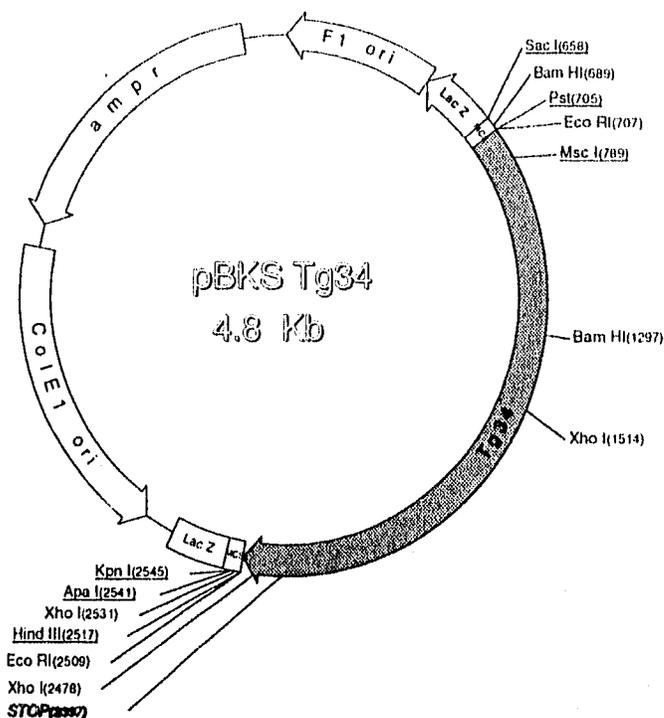
- g) La secuencia para la finalización de la transcripción (posición 2592-2690).
- h) La secuencia origen de replicación del fago T1, con la que es posible la síntesis de DNA plásmidico de cadena simple al infectar con un fago cooperador a la bacteria transformada (posición 2042-2497).
- i) El gen de resistencia a la ampicilina ( *amp<sup>r</sup>* ), permite la selección de bacterias transformadas con este plásmido en un medio con este antibiótico (posición 996-1986, incluye su promotor).
- j) La secuencia Col E1, origen de replicación del plásmido (posición 55-935).

En la figura 3.1 se muestra el mapa de restricción de este plásmido y la secuencia de nucleótidos de la hebra codificante desde el promotor T7 hasta la secuencia señal de terminación de la transcripción.

**1.3 Plásmido pBKS Tg34.** El plásmido pBKS Tg34 contiene la secuencia de DNA que codifica para la síntesis de la proteína ROP2 (salvo la metionina inicial) insertada en el sitio Eco RI del sitio múltiple de clonación del plásmido pBluescript KS\* (Stratagene). El mapa del plásmido se muestra en la figura 3.2 en la que están indicados la localización del inserto y algunos sitios de restricción. La secuencia de DNA del inserto y su traducción se encuentran en la figura 3.3.

**1.4 Fago M13/T7 (Invitrogen).** M13/T7 es un fago filamentosos con DNA circular de cadena simple (6400 nucleótidos de largo) capaz de infectar bacterias que expresan pili sexual en su superficie. Cuando el DNA del fago es introducido a una bacteria, se sintetiza la hebra complementaria formándose DNA de cadena doble que constituye la forma replicativa (RF). A diferencia de otros bacteriófagos, éste no ensambla nuevas partículas virales intracelularmente; el DNA de cadena sencilla, sintetizado en etapas posteriores, es conducido a la membrana bacteriana donde se va cubriendo de proteínas virales y al mismo tiempo es expulsado de la bacteria. Este modo de replicación del fago hace que la bacteria no sea lisada y continúe su crecimiento aunque a una velocidad menor. Debido a que el genoma del fago no se inserta en una estructura preformada, no hay restricción en el tamaño de DNA que puede ser empaquetado, por lo que este virus ha sido usado como vector de expresión. Para ello, se han desarrollado fagos con promotores y regiones de clonación en su genoma (Sambrook y col., 1989; Model y Russel, 1988; Denhardt y col., 1978). En nuestro caso particular, en el genoma del fago

M13/T7 ha sido insertada la secuencia de DNA con la información para la síntesis de la enzima T7 RNA polimerasa cuya transcripción se encuentra controlada por el promotor lac.



**Figura 3.2.** Mapa de restricción del plásmido pBKS Tg34. Tg34: secuencia de DNA que contiene la información para la síntesis de la proteína ROP2, MCS: sitio múltiple de clonación, Lac Z: secuencia promotora del operón de lactosa y fragmento del gen Lac Z, ColE1 ori: origen de replicación del plásmido, F1 ori: origen de replicación del fago F1 con el que es posible la síntesis de DNA de cadena sencilla cuando la bacteria que contiene el plásmido es coinfectada con un fago cooperador, amp<sup>r</sup>: gen de resistencia al antibiótico ampicilina. Los sitios de restricción únicos están subrayados.

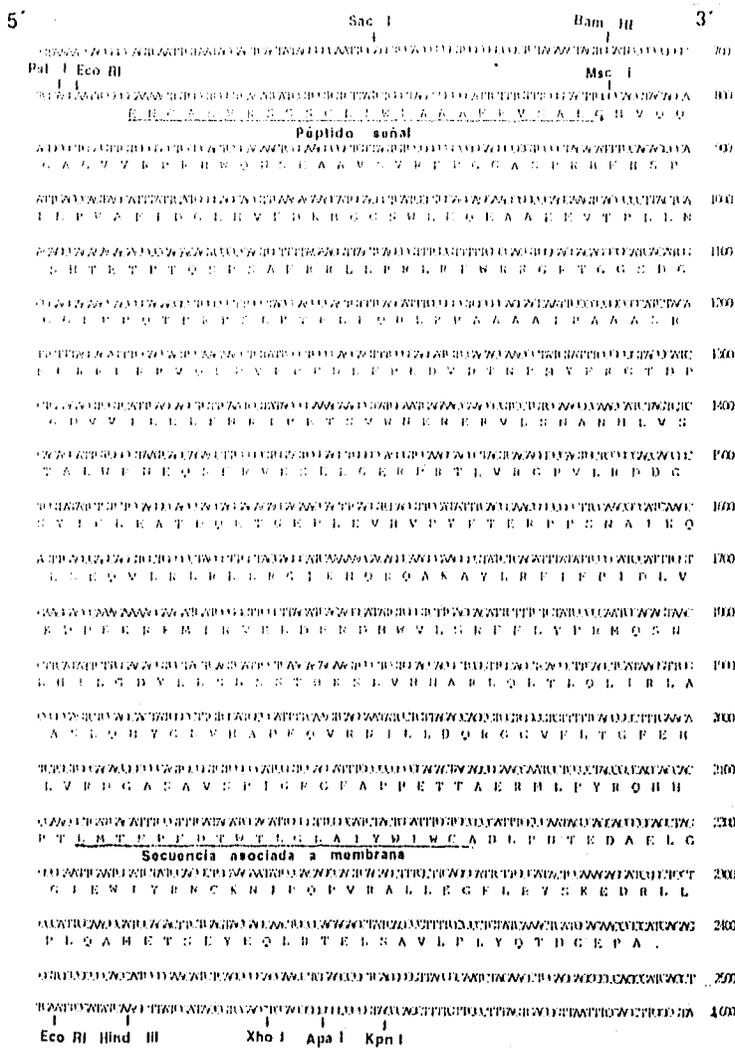


Figura J.3. Secuencia nucleotídica del inserto y de las regiones adyacentes del plásmido pBKS Tg34 y secuencia deducida de aminoácidos de la proteína ROP2. Se indican las dos secuencias hidrofóbicas correspondientes al péptido señal y al péptido asociado a la membrana, algunos sitios de restricción del sitio múltiple de clonación del plásmido pBKS y el sitio Msc I que se encuentra en el extremo 3' de la secuencia que codifica para el péptido señal.

## 2 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

2.1 **Medio Luria-Bertani (L.B):** Bacto-tryptone 1 %, Bacto extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1%, pH 7.0.

2.2 **Medio LB agar:** Medio LB adicionado con 1.5 % de bacto-agar.

2.3 **Medio LB-tetraciclina-ampicilina:** Medio LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml de tetraciclina.

2.4 **Medio LB agar-tetraciclina-ampicilina:** Medio LB agar fundido y equilibrado a 48°C, adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml de tetraciclina.

2.5 **Medio SOB:** Bacto-tryptone 2 %, Bacto extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.05 %, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.0.

2.6 **Medio SOB-tetraciclina-ampicilina:** Medio SOB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml de tetraciclina.

2.7 **Medio LB agar de superficie:** Medio LB adicionado con 0.7 % de bacto-agar.

## 3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* CON DNA PLASMÍDICO

En todo experimento de transformación debe incluirse dos controles: en uno de ellos, se transforman células competentes con una cantidad determinada de una preparación estándar de DNA plasmídico y, en el otro, células competentes no reciben DNA.

En el experimento de transformación, se derrite el contenido de un tubo con células competentes

de *E. coli* congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El tubo se incuba en hielo durante 10 min, se le agrega el DNA plasmídico (1 ng en un volumen máximo de 5  $\mu\text{l}$ ), se mezcla el contenido girando el tubo lentamente y se realizan las siguientes incubaciones: 30 min en baño de hielo, 90 s en baño de agua a  $42^{\circ}\text{C}$  y 5 min en baño de hielo. Se le añaden 900  $\mu\text{l}$  de medio LB y se incuba 45 min en baño a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación a 200 rpm. En una caja petri con medio selectivo LB agar, adicionado con los antibióticos adecuados, se siembra una alícuota de 100 a 200  $\mu\text{l}$  de células transformadas y con una varilla de vidrio se extiende el inóculo sobre la superficie del medio. Las bacterias transformadas restantes se guardan a  $4^{\circ}\text{C}$  y las cajas con medio inoculado se incuban una noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 4 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO. MÉTODO DE MINI-PREP

En 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos adecuados, se realiza un cultivo de toda la noche ( $37^{\circ}\text{C}$ , agitación a 300 rpm) de la colonia bacteriana elegida. Se transfieren 3 ml del cultivo a 2 tubos de 1.5 ml para microfuga y se guarda el resto del cultivo a  $4^{\circ}\text{C}$ . En los tubos, se separan las células por centrifugación en microfuga (1 min a 9,250g) y se remueve el medio completamente. Se resuspenden las bacterias en 50  $\mu\text{l}$  de solución I a  $0^{\circ}\text{C}$  (lisozima 4 mg/ml en buffer de glucosa 50 mM, EDTA 100 mM, Tris 250 mM, pH 8.0). Se juntan las suspensiones de ambos tubos y se incuban 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agregan 200  $\mu\text{l}$  de solución II (NaOH 40 mM, SDS 1 %), se mezcla el contenido invirtiendo el tubo 3 veces y se incuba 5 min en hielo. Se agregan 150  $\mu\text{l}$  de solución III (Acetato de potasio pH 4.8, 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato), se mezcla con vortex a baja velocidad (10 s) y se incuba 5 min en hielo. Para eliminar el precipitado formado, se centrifuga en microfuga 5 min a 16,250g. El sobrenadante se transfiere a un tubo para microfuga limpio y se realizan dos extracciones agregando 450  $\mu\text{l}$  de solución de fenol-clorofornio-álcohol isoamílico (25:24:1), mezclando con vortex, centrifugando en microfuga (5 min, 16,250g, TA) y transfiriendo la fase acuosa a otro tubo limpio. Se realizan dos extracciones con 450  $\mu\text{l}$  de éter saturado con agua, pero eliminando la fase superior de éter por aspiración. A la fase acuosa final se le añaden 700  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto a TA, se mezcla con vortex, se incuba 2 min a TA, se centrifuga (10 min, 16,250g, TA) y se descarta el sobrenadante. Al precipitado resultante se le agrega 1 ml de etanol al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$  y, sin agitar, se centrifuga (5 min, TA, 16,250g). Se descarta el sobrenadante, se seca el

precipitado a TA durante 15 min y se resuspende en 50 µl de solución RNAsa 50 µg/ml en bufer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Se incuba durante 2 h a 37°C y se guarda a -20°C.

## 5 ANÁLISIS DE DNA POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 %

Se pesa 1.2 g de agarosa en una botella con tapón de rosca, se añaden 80 ml de buffer TAE (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM, pH 8.0), se pesa la botella con su contenido y se disuelve la agarosa en un horno de microondas. Con agua bidestilada se restituye al peso original. La solución se equilibra en un baño a 50°C y se vierte en el molde para geles (con el peine para formar los pozos), obteniendo un gel de 5 mm de grueso y dejándolo solidificar durante 20 minutos. Se retira el peine y el molde con el gel se sumerge en la cámara de electroforesis llena con buffer TAE.

Se preparan las muestras a analizar adicionándoles una décima parte del volumen de "loading buffer" 10x (azul de bromofenol 2.5 mg/ml, SDS 1%, glicerol 50 %, TAE 10x). Las muestras se centrifugan y se aplican en los pozos del gel de agarosa. Se coloca la tapa de la cámara de electroforesis y se conectan los electrodos con el ánodo del lado opuesto a las muestras. Se corre la electroforesis a 150 V (corriente libre) durante 1.25 h. Después de la electroforesis, el gel se tinte sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml en buffer TAE) durante 15 min, con agitación lenta y en la oscuridad. El gel se decolora sumergiéndolo en agua durante 15 min, con agitación lenta y en la oscuridad. El gel se coloca sobre una hoja de celofán en el transiluminador, se ilumina con luz U.V. (302 nm) y se fotografa.

## 6 DIGESTIÓN DE DNA PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Si se desconoce la concentración de DNA en la solución a analizar, ésta puede estimarse sometiéndolo a una muestra de volumen conocido a una electroforesis en gel de agarosa junto con una cantidad conocida de DNA y comparando la intensidad luminosa de las bandas producidas.

En orden, se añaden los siguientes reactivos a un tubo de 1.5 ml para microfuga, limpio y estéril:

- 1 µl de buffer 10x adecuado para la enzima de restricción (ver cuadro 3.1).

- Una cantidad aproximada de 200 ng de DNA plasmídico.
- Agua bixestilada chp 10 µl.
- 5 ó 10 U de la enzima de restricción seleccionada.

Se mezcla el contenido del tubo con vortex, se incuba durante 2 a 4 h a temperatura adecuada (ver cuadro 3.1) y la muestra digerida se analiza por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

**Cuadro 3.1.** Enzimas de restricción y composición de buffers empleados.

Enzima de restricción	Buffer 10x	Temperatura	Sitios de corte
Bam HI	B	37 °C	G ↓ GATCC
Bgl I	II	60 °C	GCCN>NNN ↓ NGGC
Dra I	M y A	37 °C	T ↓ TT ↓ AAA
Eco RI	II	37 °C	G ↓ AATTC
Hae III	M	37 °C	RGCGC ↓ Y
Hind III	B y M	37 °C	A ↓ AGCTT
Msc I	reac. buf. 2	37 °C	TGG ↓ CCA
Nae I	A	37 °C	GCC ↓ GGC
Pst I	II	37 °C	CTGCA ↓ G
Pvu II	M	37 °C	CAG ↓ CTG
Xho I	II	37 °C	C ↓ TCGAG

Buffer A 10x: Tris-acetato 330 mM, acetato de Mg 100 mM, acetato de K 660 mM, dithioeritol 5 mM, pH 7.9

Buffer B 10x: Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 1 M, 2-mercaptoetanol 10 mM, pH 8.0

Buffer II 10x: Tris-HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NaCl 1 M, dithioerythritol 10 mM, pH 7.5.

Buffer M 10x: Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NaCl 500 mM, dithioerythritol 10 mM, pH 7.5  
reac. buf. 2 10x: Tris-HCl 500mM, MgCl<sub>2</sub> 100mM, NaCl 500 mM, pH 8.0

## 7 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO CON COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO QIAGEN-tip 100 (MÉTODO DE MIDI-PREP)

En 25 ml de medio L.B. adicionado con los antibióticos adecuados, se prepara un cultivo de toda la noche (37°C, agitación a 300 rpm) de la colonia bacteriana elegida. El cultivo se transfiere a un tubo de polipropileno estéril con tapón de rosca, se separan las células por centrifugación (3,000g, 10 min, 4°C) y se elimina completamente el medio sobrenadante. Las células se resuspenden en 4 ml de buffer P1-RNasa (RNasa 100 µg/ml, Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), se agregan 4 ml de buffer P2

(NaOH 200 mM, SDS 1%). se mezcla invirtiendo el tubo 3 veces. se incuba 5 min a TA. se agregan 4 ml de buffer P3 frío (Acetato de potasio 3M, pH 5.5). se mezcla suavemente. se incuba 15 min en hielo y, para separar el precipitado formado, se centrifuga (30,000g, 30 min, 4°C). El sobrenadante se pasa a un tubo de policarbonato estéril y se vuelve a centrifugar (30,000g, 15 min, 4°C) recuperando nuevamente el sobrenadante transparente.

En este orden, a una columna QIAGEN-tip 100 se le aplican las siguientes soluciones dejando que, por gravedad, cada una entre totalmente a la columna antes de aplicar la siguiente:

- 4 ml de buffer QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7.0, Etanol 15%, Triton-x100 0.15 %).
- El sobrenadante obtenido.
- 10 ml de buffer QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM pH 7.0, etanol 15%).
- 10 ml de buffer QC.
- 5 ml de buffer QF (NaCl 1.25 M, Tris 50 mM pH 8.5, etanol 15%).

En el último paso, en un tubo corex estéril se recupera el eluido que contiene el DNA. Éste se precipita agregando 3.5 ml de isopropanol a TA, mezclando, centrifugando (15,000g, 30 min, 4°C) y eliminando el sobrenadante. El DNA precipitado se lava agregando 5 ml de etanol al 70% a -20°C, centrifugando (15,000g, 15 min, 4°C) y eliminando el sobrenadante. Se deja secar el precipitado 15 min a TA, se disuelve en 400 µl de buffer TE. se incuba 30 min a TA y agitando esporádicamente con vortex. La solución de DNA se transfiere a un tubo para microfuga y se centrifuga (5 min, 16,250g). Se recupera el sobrenadante (solución de DNA), se cuantifica el DNA y se almacena a -20°C.

## **8 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DE DNA OBTENIDO POR MIDI-PREP (MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO)**

A partir de la solución de DNA obtenida por midiprep, se prepara 1 ml de una dilución 1/20 en buffer de TE. Se mide la absorbancia (A) de esta dilución a longitudes de onda de 280 nm y 260 nm, empleando una celda de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico y usando como blanco buffer TE. Se emplea como índice de pureza la relación  $A^{\lambda=260\text{ nm}}/A^{\lambda=280\text{ nm}}$  (debe ser mayor a 1.8). La concentración de DNA

se determina tomando en consideración que  $A^{\lambda=260\text{ nm}}=1.0$  corresponde a una concentración de DNA de  $50\ \mu\text{g/ml}$ .

## 9 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA PLASMÍDICO

### 9.1 Digestión de DNA con enzimas de restricción

En un tubo de 1.5 ml para microfuga, se agregan en el siguiente orden:

- El volumen determinado del buffer adecuado para las enzimas de restricción a emplear.
- Agua bidestilada si es necesaria \*\*.
- 5  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico.
- 20 U de cada una de las enzimas de restricción.

La mezcla de reacción se incuba de 7 a 12 h a temperatura adecuada para las enzimas. Después de la digestión, se inactivan las enzimas durante 10 minutos a  $70^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se somete a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (empleando gel y soluciones recién preparadas). El gel se tinte con una solución de bromuro de etidio fresca ( $10\ \mu\text{g/ml}$  en buffer TAE).

### 9.2 Purificación de fragmentos de DNA con matriz Prep-A-Gene

Con protección adecuada (bata, guantes y lentes), se ilumina el gel de agarosa con luz U.V. mientras se corta, con una navaja de bisturí estéril, la porción del gel de agarosa que contiene el fragmento de DNA que se quiere aislar. La porción del gel se corta en pedazos más pequeños que se colocan en un tubo para microfuga y se determina su peso y volumen (considerando su densidad igual a

---

\*  $A^{\lambda=260\text{ nm}}$ : Absorbancia a longitud de onda de 260 nm,  $A^{\lambda=280\text{ nm}}$ : Absorbancia a longitud de onda de 280 nm.

\*\* Las enzimas de restricción están disueltas en buffer con glicerol al 50 % que es inhibidor de la actividad de la enzima. Para diluir lo suficiente el glicerol, el volumen total de la mezcla de reacción debe ser por lo menos 10 veces mayor al volumen total agregado de los stocks de las enzimas y esto determina los volúmenes a añadir de agua bidestilada (si es necesaria) y de buffer para las enzimas de restricción.

1 g/ml). Se añaden 3 volúmenes de "binding buffer" (NaClO<sub>4</sub> 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) y se funde la agarosa incubando a 55°C. Se agrega la suspensión de la matriz Prep-A-Gene (1 µl por cada 200 ng de DNA<sup>\*</sup>), se incuba 10 min a TA con agitación constante y se separa la matriz (con el DNA adsorbido) por centrifugación en microfuga (16.250g, 30 s) y eliminando el sobrenadante. La matriz separada se lava 3 veces suspendiéndola en 50 volúmenes (con respecto al volumen agregado de la matriz) de "wash buffer" (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, etanol 50 %), centrifugando (16.250g, 30 s) y eliminando el sobrenadante. La matriz separada se seca 5 min a TA, se resuspende en un volumen (con respecto a la matriz) de "elution buffer" (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM), se vuelve a separar por centrifugación (30 s, 16.250g) y se recupera el sobrenadante en un tubo para microfuga. Se repite la operación anterior. Se juntan los sobrenadantes en un tubo de microfuga, se centrifuga nuevamente para recuperar un sobrenadante final. Una muestra de esta solución se analiza por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y el resto se guarda a -20°C.

## 10 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA CON LA ENZIMA T4 DNA LIGASA

A un tubo para microfuga se le añaden cantidades equimolares y suficientes de los fragmentos de DNA purificados y en un volumen total de 11 µl (completar el volumen con agua bidestilada si es necesario). Si se van a ligar fragmentos con extremos pegajosos, el DNA se incuba a 60°C durante 10 min para separar los extremos que se hayan alineado entre sí y después se enfría a TA durante 20 min. Se añaden 3 µl de buffer de ligación 5x (Polietilenglicol al 25 % en Tris-HCl 330 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, ATP 5 mM, dithioerythritol 5 mM, pH 7.5) y 1 U de la enzima T4 DNA ligasa diluida en 1 µl de buffer de ligación 1x. Se incuba durante 1 noche a 14°C. Al terminar la ligación se inactiva la enzima por incubación a 60°C durante 10 min.

---

<sup>\*</sup> Para estimar la cantidad de DNA en el gel de agarosa se toma en consideración: la proporción del tamaño del fragmento de DNA a purificar con respecto al tamaño del plásmido y la cantidad total digerida del plásmido. También puede estimarse por comparación de la intensidad luminosa de las bandas del DNA a purificar con una banda producida al analizar una cantidad conocida de DNA.

## **11 PREPARACIÓN Y TITULACIÓN DEL "STOCK" DE FAGO M13/T7**

### **11.1 Aislamiento de placas**

En 5 ml del medio LB-tetraciclina, se prepara un cultivo de 7 h de la bacteria *E. coli* XL1-Blue. Usando medio LB, se preparan diluciones seriadas en potencias de 10 del "stock" del fago M13/T7, desde  $10^{-5}$  a  $10^{10}$ . A tubos con 3 ml de medio LB-agar de superficie, fundido y equilibrado a 47°C, se les añaden 100 µl de cada dilución del fago y 100 µl del cultivo de *E. coli* XL1-Blue, se mezclan perfectamente y se vierte su contenido sobre cajas petri con medio LB-agar. Se deja solidificar el agar de superficie y se incuban las cajas durante 1 noche a 37°C.

### **11.2 Comprobación de la presencia del fago M13/T7**

De la caja petri con placas aisladas se eligen 10 de éstas. El pedacito de agar con cada placa se toma con la punta de una pipeta Pasteur estéril y se deposita en tubos con 2 ml de medio LB inoculado con 50 µl del cultivo de *E. coli* XL1-Blue (preparado anteriormente). Los tubos se incuban 5 h a 37°C. Las células contenidas en 1.5 ml de cada uno de los cultivos se separan por centrifugación (5 min, 16.250g), guardando el sobrenadante a 4°C. Se extrae el DNA viral de doble cadena (forma replicativa) a partir de las células separadas usando el método de Miniprep. Muestras de 5 µl del DNA extraído se digieren con 5 U de cada una de las enzimas de restricción Hind III y Eco RI, y se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La existencia de un fragmento de DNA de 2.7 kpb, correspondiente al DNA con la información genética para la síntesis de la enzima T7 RNA polimerasa, confirma la presencia e integridad del fago M13/T7.

### **11.3 Preparación del "stock" del fago M13/T7**

En 3 ml de medio SOB-tetraciclina, se hace un cultivo (37°C, 300 rpm) de *E. coli* XL1-Blue hasta que alcance una DO a 600 nm igual a 0.3. Con 10 µl de este cultivo se inoculan 100 ml de medio SOB-tetraciclina y se añaden 100 µl del medio sobrenadante seleccionado en la etapa anterior por

contener el fago M13/17. Se incuba a 37°C durante toda la noche con agitación a 300 rpm. El cultivo es traspasado a tubos de policarbonato estériles y se separan las células por centrifugación (10,000g, 15 min, 4°C). El sobrenadante se recupera en condiciones de esterilidad y se incuba a 70°C durante 20 min. Este nuevo "stock" del fago se separa en alícuotas que se guardan a 4°C.

#### 11.4 Titulación del "stock"

Se procede de la misma forma que para el aislamiento de placas (11.1). El título del "stock" se determina con el número de placas presentes en la caja adecuada (aquella que tiene de 20 a 200 placas), multiplicándolo por el factor de dilución respectivo y expresando el resultado en unidades formadoras de placas por ml del "stock" (pfu's/ml).

## 12 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN BACTERIAS TRANSFORMADAS CON EL VECTOR pRSETA

En medio LB-tetraciclina-ampicilina, se prepara un cultivo de toda la noche de la colonia transformada. Con 300 µl de este cultivo se inocula un matraz con 15 ml de medio SOB-tetraciclina-ampicilina y se inicia el cultivo a 37°C con agitación a 300 rpm. Se sigue el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm. Cuando se llega al inicio de la fase de crecimiento exponencial (DO= 0.3) se colecta una muestra de 1 ml que se procesa de la siguiente manera:

- Se mide la DO a 600 nm para determinar el número de células en la muestra (DO= 1.0 corresponde a  $10^9$  células/ml).
- Se traspasa la muestra a un tubo para microfuga y se separan las células por centrifugación (1 ml, 16,250g), eliminando el sobrenadante.
- Se resuspenden las células en buffer muestra (SDS 2.5%, Tris HCl 65.2 mM pH 6.8, 2-mercaptoetanol 5 % v/v, azul de bromofenol 5 mg/100 ml, glicerol 10%) ajustando su concentración a  $2 \times 10^9$  células/ml.
- Se hierva la muestra en baño María durante 5 min, se enfría en hielo y se guarda a -20°C.

Después, se agrega al cultivo una solución de IPTG (100 mM) en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 1 mM. Se continúa el cultivo durante 1 h, se toma una muestra y se procesa de igual forma. En esta etapa, se determina la concentración de bacterias y se infecta el cultivo con el fago M13/T7, añadiendo el volumen del "stock" del fago necesario para alcanzar una proporción de 5 unidades formadoras de placas (pfu's) por célula bacteriana. Se continúa el crecimiento del cultivo y se procesan de igual forma muestras tomadas 1, 2, 3 y 5 h después de la infección.

Con los datos de densidad óptica, se construye una gráfica de crecimiento bacteriano. Las muestras procesadas se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con tinción con azul de Coomassie o por Western blot.

### 13 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Se prepara el gel de corrida con 30 ml de una solución desgasificada de acrilamida-bisacrilamida (acrilamida 10%, bisacrilamida 0.27 %, Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0.1 %) añadiendo 150 µl de persulfato de amonio al 10% y 10 µl de TEMED. El gel se vierte en el molde armado con los vidrios, espaciadores, pinzas y la base para preparación de geles; se cubre con una capa de butanol saturado con agua y se deja polimerizar durante 1 h. Se elimina el isobutanol de la superficie del gel, ésta se enjuaga con agua bidestilada y se seca con papel Whatman. Se coloca el peine entre los vidrios, se vierte el gel concentrador preparado con 12.5 ml de una solución desgasificada de acrilamida-bisacrilamida (acrilamida 4 %, bisacrilamida 0.1 %, Tris-HCl 128 mM pH 6.8, SDS 0.1 %), 62 µl de persulfato de amonio al 10% y 6.2 µl de TEMED. El gel se deja polimerizar 30 min, se retira el peine y se enjuagan los espacios para las muestras con agua bidestilada y buffer de electrolitos (Tris 0.3 %, glicina 1.44%, SDS 0.1 %). Al final, los espacios se dejan llenos con bufer de electrodos.

Las muestras a analizar se aplican en los pozos; se arma la cámara del electrodo superior (cátodo) sobre el molde con el gel, ambos se transfieren a la cámara inferior equipada con un magneto, el electrodo inferior (ánodo) y llena de buffer de electrodos. Se instala la tapa de la cámara conectando correctamente las terminales a la fuente de poder y la electroforesis se lleva a cabo durante una noche, a

una corriente de 7.5 mA, voltaje máximo de 60 V y con agitación del buffer de electrolitos.

Al final de la electroforesis se desconectan los electrodos, se extrae la cámara superior y el molde con gel, éste último se desarma para obtener el gel íntegro sobre uno de los vidrios.

#### **14 TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS CON AZUL DE COOMASSIE**

Después de la electroforesis, se elimina el gel concentrador y el resto del gel se coloca en un recipiente de polipropileno. Se fijan las proteínas contenidas en el gel con 75 ml de solución de tinción (ácido acético 5% v/v, metanol 10% v/v) e incubando a 55°C durante 20 min con agitación lenta. Se tñe el gel con una solución de Coomassie Brilliant blue R250 al 0.1 % en solución de tinción, incubando 30 min, a 55°C con agitación lenta. El gel se decolora con una solución para enjuague (ácido acético 7% v/v) incubando a 55°C con agitación lenta.

#### **15 WESTERN BLOT**

##### **15.1 Electrotransferencia**

Después de la electroforesis, se elimina el gel concentrador; el resto del gel se lava 3 veces con buffer de lavado (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3) durante 15 min. En una charola llena con buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3, metanol 20 %), en forma de "sandwich" se colocan bien centrados y previamente remojados con el mismo buffer: una reja para electrotransferencia, una esponja, el papel para blot, la membrana de nitrocelulosa cortada al tamaño del gel, el gel, el papel Whatman, una esponja y otra reja. La cámara de transferencia se llena con buffer de transferencia a 4°C, se equipa con un magneto y un refrigerante mantenido a 4°C. Se introduce el "sandwich" en la cámara de transferencia (la membrana de nitrocelulosa del lado del ánodo) y se coloca la tapa-fuente de poder. La transferencia se lleva a cabo durante dos horas a 90 V y 0.7 A con agitación del buffer.

Al terminar la transferencia se desconectan los electrodos, se extrae y se desarma el "sandwich", y de la membrana, se corta la tira correspondiente al carril de marcadores de peso molecular. La tira de marcadores se tiñe con una solución de rojo de Ponceau al 0.3% (en ácido tricloroacético al 3%) durante 10 min, y se decolora con ácido acético al 5%. El resto de la membrana se somete a inmunodetección.

### 15.2 Inmunodetección de la proteína ROP2 sobre el tilot

La membrana de nitrocelulosa se enjuaga con solución TNT (NaCl 0.15M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, Tween 20 0.05 % v/v) y se bloquea con 30 ml de solución de albúmina sérica bovina (BSA al 1% en TNT) incubando 2 h a TA con agitación lenta. Se lava la membrana con TNT (2 enjuagues rápidos y 3 lavados de 10 min en agitación suave). La membrana se incuba con 30 ml de una dilución  $10^5$  de líquido de ascitis con el anticuerpo 2D1<sup>\*</sup> (Leriche y Dubremetz, 1991; Sadak y col., 1988) en BSA al 1% , con agitación suave, a TA durante 1 h (o 4°C durante 1 noche). La membrana se lava con TNT y se añade 30 ml de una dilución  $10^4$  del conjugado GAM-AP (anticuerpo de cabra anti-IgG murina conjugado a fosfatasa alcalina) en BSA al 1%, se incuba 2 h a TA con agitación lenta. La membrana se lava con TNT y se le agregan 30 ml de la solución de sustrato (nitroazul de tetrazolio, NBT, 0.33 mg/ml, bromo-cloro-indolil-fosfato, BCIP, 0.16 mg/ml, Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9.5), se incuba 5 min. a TA, en la oscuridad y con agitación suave. Se descarta la solución de sustrato. La reacción se detiene incubando la membrana con 10 ml de solución de EDTA 5 mM pH 8.0 durante 10 min. Finalmente, se enjuaga la membrana con agua bidestilada y se seca a TA.

---

\* Anticuerpo monoclonal murino anti-ROP2

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

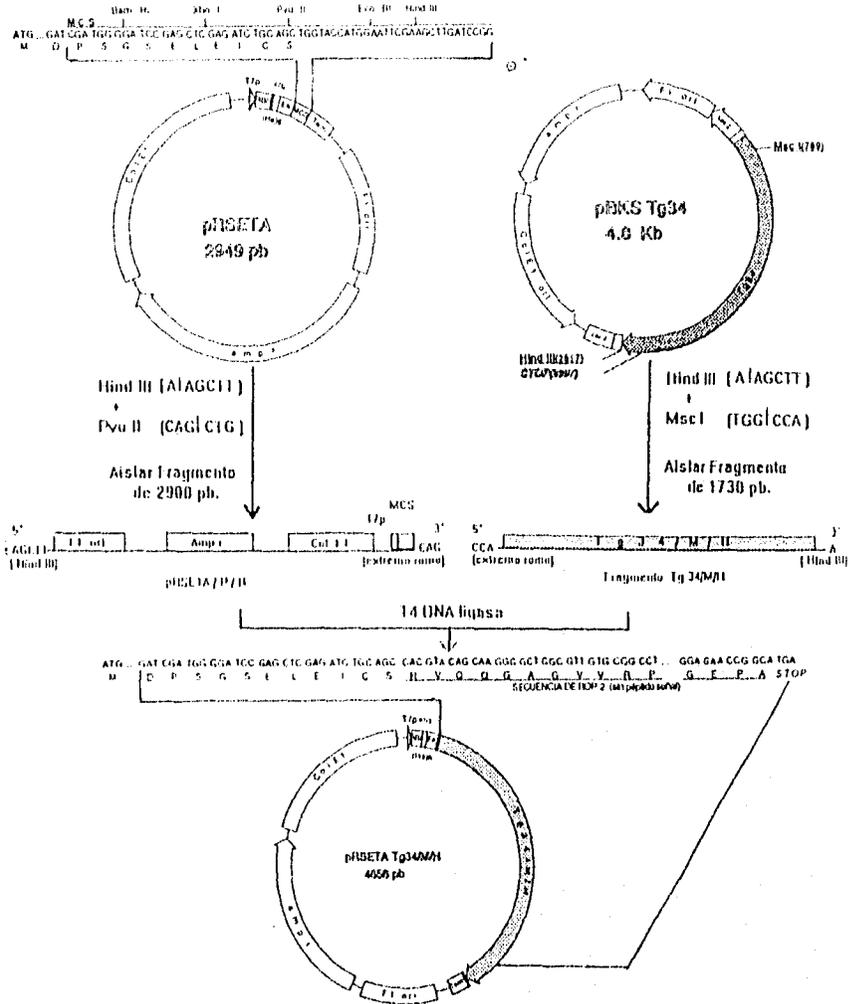
#### I EXPRESIÓN DE UNA FORMA RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA ROP2 USANDO EL PLÁSMIDO pRSETA

##### I.1 Diseño de la construcción

Para expresar la proteína ROP2 sin su péptido señal en *E. coli*, usando el vector pRSETA, se diseñó la construcción que se representa en la figura 4.1.

El plásmido pBKS Tg34 contiene la información genética para la síntesis de la proteína ROP2 (sin el codón inicial). La digestión de este plásmido con las enzimas de restricción Hind III y Msc I produce dos fragmentos de DNA de 1730 y 3030 pb de tamaño, respectivamente. El fragmento de 1730 pb (Tg34/M/H) contiene la información genética para la síntesis de la proteína ROP2 sin su péptido señal y contiene un extremo rasurado en 5' y un extremo Hind III pegajoso en 3'.

En el plásmido pRSETA la localización y orientación del promotor T7 determinan el inicio y la dirección de la transcripción de secuencias de DNA insertadas en el sitio múltiple de clonación y, por lo tanto, también determinan la orientación en que debe ser colocado el inserto para la adecuada expresión. En el sitio múltiple de clonación del plásmido pRSETA existe un sitio único de corte para la enzima Pvu II (enzima que produce extremos rasurados) y otro sitio único de corte para la enzima Hind III (ver más detalles en la figura 3.1). Al digerir el plásmido pRSETA con las enzimas Hind III y Pvu II, éste se lineariza teniendo un extremo rasurado cercano al promotor T7 y otro extremo Hind III pegajoso. La ligación del fragmento Tg34/M/H con el plásmido pRSETA linearizado llevará a la formación de un nuevo plásmido (pRSETA Tg34/M/H) que posee el inserto en el marco de lectura adecuado para que se exprese la proteína ROP2 sin su péptido señal como una proteína de fusión. La figura 4.2 muestra la secuencia de aminoácidos y el peso molecular esperados para la proteína de fusión.



**Figura 4.1.** Construcción del plásmido de expresión pRSETA Tg34/M11. Abreviaturas: 17p: promotor T7. RBS: sitio de unión al ribosoma. ATG: codón de inicio de traducción. (His)<sub>6</sub>: información para incorporación de 6 residuos de histidina. EK: información para la síntesis del sitio de hidrólisis por la enzima proteolítica enterocinasa, MCS: sitio múltiple de clonación. Term: señal para la finalización de transcripción. Col E1 ori: origen de replicación del plásmido, F1 ori: origen de replicación del fago f1 con el que es posible la síntesis de DNA de cadena sencilla, amp<sup>r</sup>: gen de resistencia a la ampicilina, Lac Z: promotor del operón lac y fragmento del gen Lac Z. Tg34: secuencia de DNA con la información para la síntesis de la proteína ROP2. STOP: codón terminación de traducción del gen ROP2.

<u>MRGSHHHHHHIGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELEI</u>	40
(His)6	EK
<u>CSHVOOGAGVVRPRHWONSEAAVSVREFGGASPRHFHSPI</u>	80
<u>EPVAFIDGEHVEDKHGGSWLEQEAEEVTPLLNSHTETPT</u>	120
<u>QSPSAFRRLRLRRLRFWRRGRRTGGSDGGGEPPTPPRPSLPT</u>	160
<u>RLFOHLRRAAAAIPAAAASRFFRRFRRVQEPVFPDPDEFPED</u>	200
<u>VDTNPMYFRGTDPGDVVIEELFNRIPETSVWNERVLSN</u>	240
<u>ANHLVSTALWRNEQSFVESELGERPRTLVRGPVLRDDGS</u>	280
Proteína ROP2 (sin péptido señal)	
<u>YICLEATDOETGEPLEVHVVPYFTERPPSNAIKOLSEQVLR</u>	320
<u>LRLLRGIKNORQAKAYLRFIFPIDLVKDPKKRKMIRVRLD</u>	360
<u>ERDMWVLSRFFLYPRMQSNLHILGDVLLSHSSTHKSLVHH</u>	400
<u>ARLQTLQILRLAASLOHYGLVHADFOVRNILLDQGGVF</u>	440
<u>LTGFEHLVRDGASAVSPIGRGFAPPETTAERMLPYQHHP</u>	480
<u>TLMTFPEDTWTGLAIYWIWCADLPNTEDAELGGIEWIYR</u>	520
<u>RCKNIPOPVRALLEGFLRYSKEDRLLPLOAMETSEYEOLR</u>	560
<u>TELSAVLPLYOTDGEPA</u>	577

Peso Molecular calculado : 66 kDa

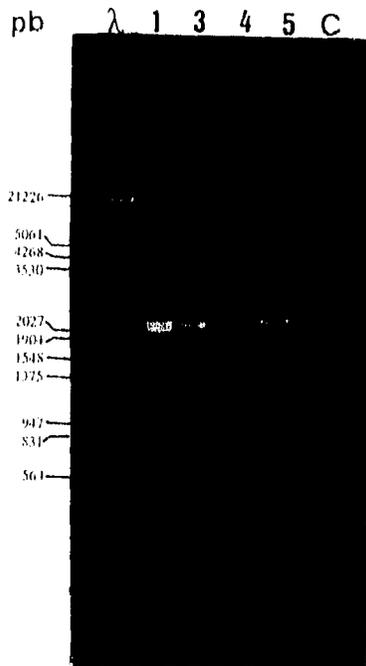
*Figura 4.2.* Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión recombinante. En la figura está escrita la secuencia esperada de aminoácidos de la proteína de fusión recombinante codificada por el plásmido pRSETA Tg34/MH. Se indican las distintas regiones de esta proteína y el peso molecular calculado. Abreviaturas: (His)6: dominio poli-his o de unión a metal, EK: sitio de hidrólisis de la enzima enterocinasa. Con \* se indica el residuo correspondiente al aminoácido 27 de la secuencia de la proteína ROP2.

## 1.2 Producción y purificación del plásmido pRSETA

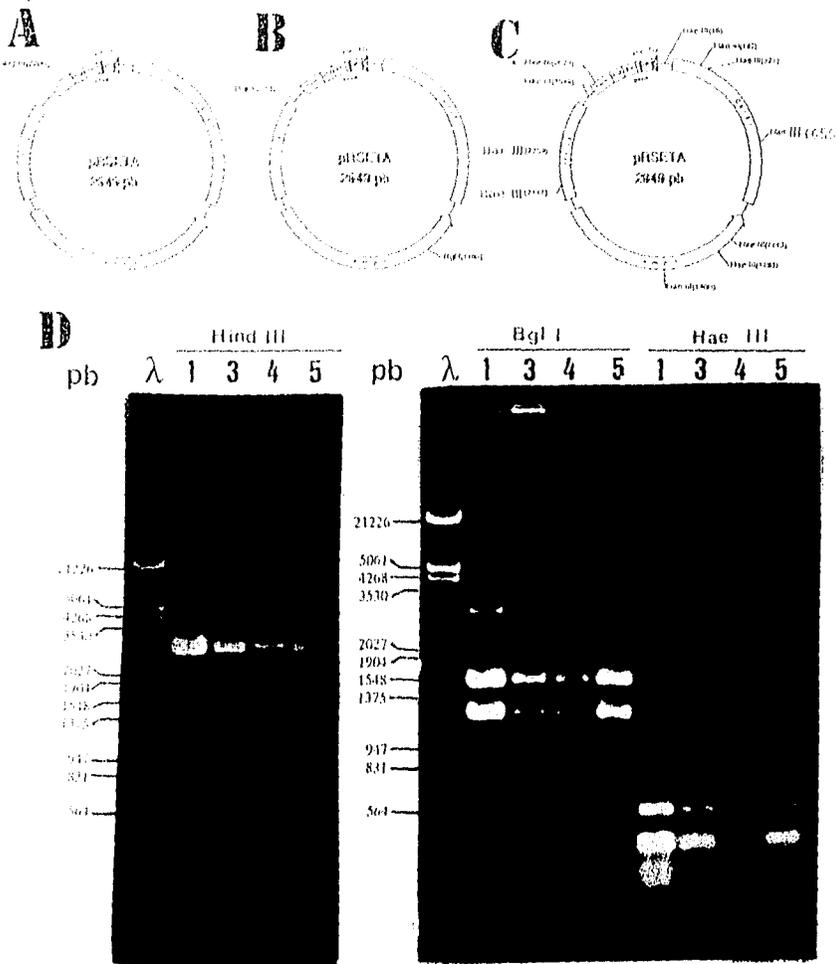
Como primer paso para realizar la construcción diseñada, fue necesario amplificar y purificar el plásmido pRSETA. Se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* XL1-Blue con el plásmido pRSETA; como control se hizo una transformación de las mismas células, pero sustituyendo el plásmido con buffer de TE. Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB agar-tetraciclina-ampicilina. Crecieron 240 colonias en la placa sembrada con bacterias tratadas con el plásmido y no se observó crecimiento en la placa sembrada con las bacterias del control, demostrando que el crecimiento de las bacterias en este medio se debe al tratamiento con el plásmido pRSETA.

Para verificar la presencia del plásmido pRSETA en las colonias obtenidas, se obtuvo DNA plasmídico de 4 de estas colonias por el método de Miniprep. Como control, se sometieron al mismo protocolo bacterias *E. coli* XL1-Blue no transformadas. El DNA plasmídico se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.3). Observamos dos bandas intensas de DNA en los carriles correspondientes a cada una de las muestras de DNA extraído de las 4 colonias de bacterias transformadas. Cada banda corresponde a una de las dos conformaciones que puede adquirir el plásmido, ya sea circular o superenrollada. No se observa DNA en el carril correspondiente al Miniprep realizado con las bacterias *E. coli* XL1-Blue no transformadas, demostrando la extracción selectiva de DNA plasmídico por este método.

Para verificar que el plásmido extraído de las 4 colonias bacterianas transformadas tenía el patrón de restricción esperado para el plásmido pRSETA, el DNA plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción Hind III, Bgl I o Hae III y los productos de cada digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.4). En la tabla 4.1 se reporta el número y tamaño aproximado de los fragmentos de DNA producidos experimentalmente en las digestiones, así como el número y tamaño de los fragmentos de DNA esperados. Es importante mencionar que la digestión del DNA plasmídico con la enzima Hae III produce fragmentos de un tamaño menor a 300 pb, no detectables en el gel de agarosa usado. Los resultados en la tabla muestran la presencia, en las 4 colonias de bacterias *E. coli* XL1-Blue transformadas, de un plásmido cuyo tamaño y mapa de restricción corresponde al esperado para el plásmido pRSETA. A estas colonias se les denominó *E. coli* XL1-Blue pRSETA.



**Figura 4.3.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 4 colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con el plásmido pRSETA. Muestras de 8 µl de DNA plasmídico obtenido por Miniprep de las colonias número 1 (carril 1), 3 (carril 3), 4 (carril 4) 5 (carril 5) de bacterias transformadas con el plásmido pRSETA y de una colonia de bacterias no transformadas (carril C) fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En el carril λ se aplicó una muestra de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.



**Figura 4.4.** (A, B y C) Mapas del plásmido pRSETA mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción Hind III, Bgl I y Hae III. (D) Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 4 colonias de bacterias *E. coli* XL1-Blue transformadas con el plásmido pRSETA y digerido con las enzimas Hind III, Bgl I o Hae III. Muestras de 8 µl del DNA plasmídico, extraído de las colonias número 1 (1), 3 (3), 4 (4) y 5 (5) de bacterias transformadas con el plásmido pRSETA, fueron digeridas con Hind III (Hind III), Bgl I (Bgl I) o Hae III (Hae III). Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En los carriles marcados con λ, se aplicaron muestras de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

**Tabla 4.1.** Caracterización con enzimas de restricción del DNA plasmídico extraído de 4 colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con el plásmido pRSETA.

Enzima de restricción	Hind III	Bgl I	Hae III
Tamaño de los fragmentos esperados	2949 pb	1620 y 1320 pb	657, 458, 434, 334, 290, 267, 174, 142, 80, 74 y 29 pb
Tamaño aproximado de los fragmentos observados	2.8 kpb	1.5 y 1.2 kpb (2.8 kpb)	0.6-1, 0.52, 0.43, 0.39 y 0.31 kpb

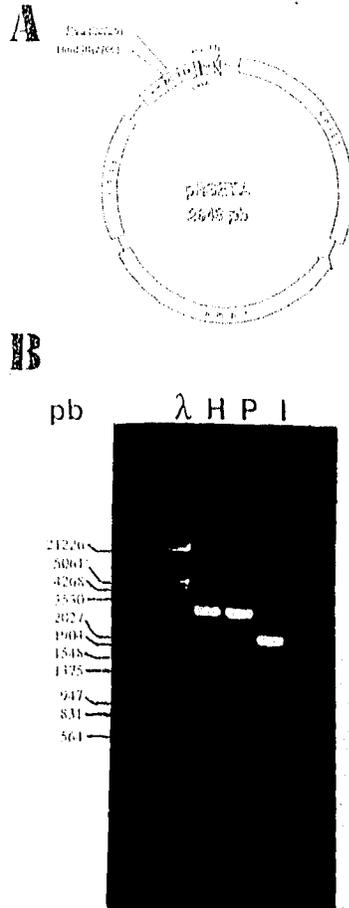
El fragmento marcado con \*, visto en la muestra de la columna 1, corresponde al plásmido linealizado producido por digestión incompleta.

Para disponer de DNA del plásmido pRSETA de calidad adecuada y en cantidad suficiente para los siguientes experimentos, se purificó DNA plasmídico de la colonia número 1 de *E. coli* XL1-Blue pRSETA empleando el método de Midiprep. Se cuantificó el DNA obtenido y se evaluó su pureza por método espectrofotométrico. La relación  $A^{260}/A^{280}$  fue de 1.94 (debe ser mayor a 1.8) y la cantidad total obtenida de DNA purificado fue de 38.8 µg.

Para verificar la calidad del DNA plasmídico purificado, muestras de éste fueron digeridas con las enzimas de restricción Pvu II o Hind III y fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa; también se analizó una muestra de DNA plasmídico intacto purificado (Figura 4.5). En el carril donde fue aplicada la muestra de DNA plasmídico intacto, se observó una banda intensa de DNA (correspondiente a DNA plasmídico en su forma circular superenrollada) y otra de menor intensidad (correspondiente a DNA plasmídico en su forma circular). En los carriles donde fueron aplicadas las muestras digeridas con cada una de las dos enzimas, se observó una banda de DNA de un tamaño aproximado de 2.7 kpb que corresponde al plásmido linealizado (de un tamaño real de 2949 pb).

### 1.3 Clonación del DNA que codifica para la síntesis de la proteína ROP2 en el plásmido pRSETA

Se aisló y purificó el fragmento de DNA de 1730 pb denominado Tg34/M/H1, producto de la digestión del plásmido pBKS Tg34 con las enzimas Hind III y Mse I. También se aisló y purificó el fragmento de 2900 pb denominado pRSETA/P/H, producto de la digestión del plásmido pRSETA con



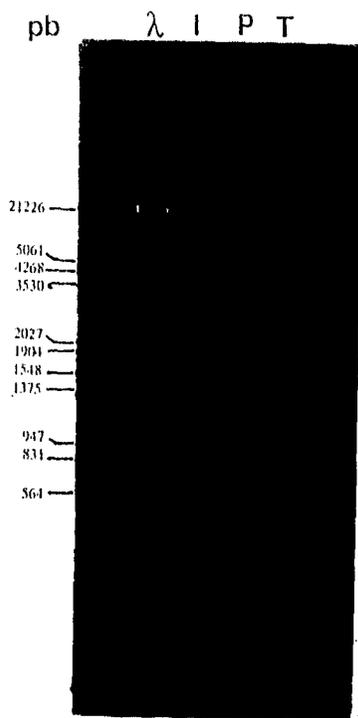
**Figura 4.5.** ( A ) Mapa del plásmido pRSETA mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción Hind III y Pvu II. ( B ) Análisis por electroforesis en gel de agarosa del plásmido pRSETA purificado por Midiprep y digerido con las enzimas de restricción Hind III o Pvu II. Muestras de 2  $\mu$ l de plásmido pRSETA (97 ng/ $\mu$ l), purificado por cromatografía de intercambio aniónico Qiagen-tip 100 (Midiprep), fueron digeridas con 5 U de la enzima Hind III (carril H) o con 5 U de la enzima Pvu II (carril P). Después de la digestión, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En el carril  $\lambda$  fue aplicada una muestra de 500 ng de DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño y en el carril I fue aplicada una muestra de 2  $\mu$ l del plásmido pRSETA purificado e intacto. A la izquierda se muestra el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

las enzimas Hind III y Pvu II. Para verificar la presencia de los fragmentos de DNA purificados y estimar sus concentraciones, muestras de las soluciones de los dos fragmentos purificados fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa, junto con una muestra de 200 ng de plásmido pRSETA intacto (Figura 4.6). En el carril correspondiente al DNA Tg34/M/H se observó una banda de DNA de tamaño estimado de 1.7 kpb y en el carril correspondiente al DNA pRSETA/P/H se observó una banda de DNA de tamaño estimado de 2.9 kpb. La semejanza entre la intensidad luminosa de las bandas de DNA de cada muestra y la intensidad luminosa de la banda de DNA correspondiente a la muestra de 200 ng del plásmido pRSETA intacto nos permitió estimar que, en las soluciones, la concentración de cada fragmento era de 40 ng/µl.

Para construir el plásmido recombinante, cantidades equimolares de los fragmentos Tg34/M/H y pRSETA/P/H se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa. Se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* XL1-Blue con una alícuota de cada una de las reacciones del experimento de ligación; se incluyeron los controles necesarios para el experimento de transformación. Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB agar-tetraciclina-ampicilina. El experimento de ligación y los resultados de la transformación se reportan en la tabla 4.2. En este experimento de ligación dos eventos pueden ocurrir: en el primero se logra la ligación de ambos fragmentos de DNA formando así el plásmido pRSETA Tg34/M/H y, en el segundo evento, el plásmido pRSETA linearizado por digestión con una sola de las enzimas (Hind III o Pvu II) se recirculariza por acción de la ligasa. En el experimento desarrollado, el control de recircularización nos permite evaluar la frecuencia del segundo evento.

De los resultados reportados en la tabla 4.2 podemos concluir:

1. La transformación de las bacterias fue eficiente (mayor a 200 colonias en la transformación número 4 con el DNA control).
2. La mayoría de las colonias obtenidas en la transformación 1 (aproximadamente el 75 %), deben contener el plásmido recombinante esperado (pRSETA Tg34/M/H), ya que en el experimento control de recircularización, donde sólo se incluyó el plásmido linearizado, se obtuvieron 4 veces menos colonias (44 colonias en la transformación 2 vs. 187 colonias en la transformación 1).



**Figura 4.6.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos pRSETA/P/I y Tg34/M/H. Muestras de 5  $\mu$ l de las soluciones de DNA pRSETA/P/I (carril P) y Tg34/M/H (carril T), purificado con la matriz Prep-A-Gene, fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En el carril I se aplicó una muestra de 200 ng del plásmido pRSETA purificado por Midiprep. En el carril  $\lambda$  se aplicó una muestra de 500 ng de DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

**Tabla 4.2.** Construcción del plásmido pRSETA Tg34/M/H: experimentos de ligación y transformación

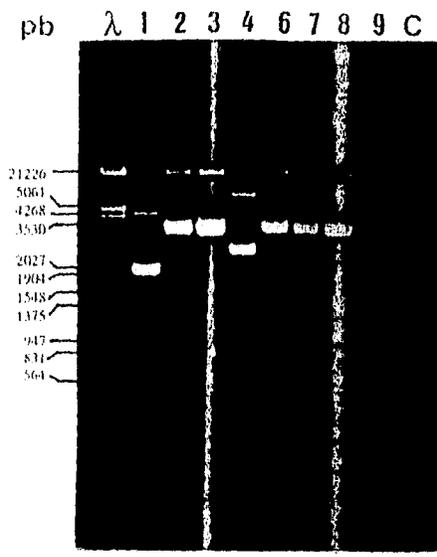
Ligación	1 (Ligación de ambos fragmentos)	2 (Control para medir el nivel de recircularización del vector pRSETA)	3 (Control para medir la presencia del vector intacto y recircularización espontánea)
Tg34/M/H (1750 pb)	50 ng	----	---
pRSETA/PstI	100 ng	100 ng	100 ng
T4 DNA ligasa	1U	1U	----
Volumen total de reacción	15 µl	15 µl	15 µl

Transformación	1	2	3	4 (Control + de transformación)	5 (Control - de transformación)
DNA para la transformación	5 µl de la reacción de ligación 1	5 µl de la reacción de ligación 2	5 µl de la reacción de ligación 3	450 ng de DNA pRSETA	---
Número de colonias obtenidas en placas LB agar-tetraciclina- ampicilina	180 colonias	44 colonias	1 colonia	> 200 colonias	ninguna

3. La obtención de colonias en la transformación número 2 es el resultado de la recircularización del plásmido linealizado, que a su vez se debe a una digestión incompleta del vector pRSETA por las dos enzimas Hind III y Pvu II.

Para seleccionar las colonias que contengan el plásmido recombinante esperado pRSETA Tg34/M/H, se extrajo DNA plasmídico de 9 colonias obtenidas en la transformación 1. Como control fue extraído DNA plasmídico de *E. coli* XL1-Blue pRSETA. El DNA plasmídico obtenido de 8 de estas colonias y del control fue analizado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.7). En los carriles correspondientes a las muestras de DNA plasmídico de las colonias número 1 y 9 se observan bandas de DNA similares a las observadas en el carril correspondiente al DNA plasmídico del vector pRSETA, implicando que estas colonias fueron transformadas con plásmido pRSETA recircularizado. En los carriles correspondientes a las muestras de DNA plasmídico extraído de las colonias número 2, 3, 6, 7 y 8 se observan bandas de DNA de un tamaño semejante, pero mayor al tamaño del DNA del vector pRSETA. En el carril correspondiente a la muestra de DNA extraído de la colonia número 4



**Figura 4.7.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 8 colonias de *E. coli* XLI-Blue transformadas con el producto de la ligación de Tg34/M/H y pRSETA/P11. Muestras de 5 µl de DNA plasmídico, extraído a partir de las colonias número 1 (carril 1), 2 (carril 2), 3 (carril 3), 4 (carril 4), 6 (carril 6), 7 (carril 7), 8 (carril 8) y 9 (carril 9) de bacterias transformadas, fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En el carril C se aplicó una muestra de 5 µl de DNA plasmídico extraído de *E. coli* XLI-Blue pRSETA. En el carril λ se aplicó una muestra de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

observamos bandas de DNA plasmídico de peso molecular distinto al peso del DNA plasmídico de las demás colonias, sugiriendo que este plásmido no es el plásmido recombinante buscado. A partir de estos resultados, decidimos continuar la caracterización de las clonas candidatas 2, 3, 6, 7 y 8.

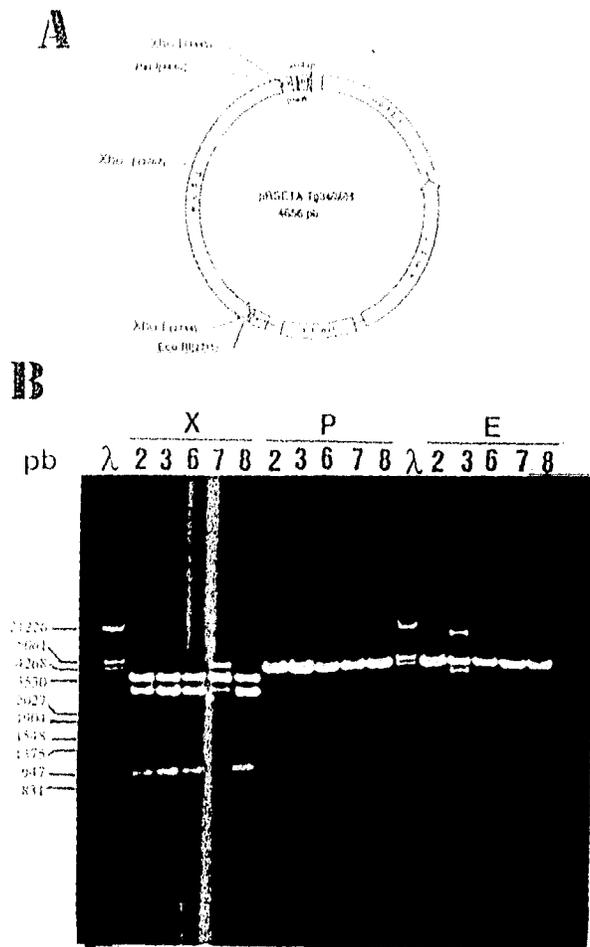
Con el objetivo de determinar si el patrón de restricción del plásmido de las cinco colonias candidatas corresponde al esperado para el plásmido pRSETA Tg34/M/II, el DNA plasmídico extraído de estas colonias fue digerido con las enzimas de restricción Hind III, Pst I, Bam HI, Xho I o Eco RI. Las muestras digeridas fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa (Figuras 4.8 y 4.9). En la tabla 4.3 se reportan los resultados obtenidos en la electroforesis, es decir, el número y tamaño aproximado de los fragmentos de DNA producidos experimentalmente en cada una de las digestiones, así como el número y tamaño de los fragmentos de DNA esperados.

De los resultados resumidos en la tabla 4.3 podemos concluir que las cinco colonias candidatas, 2, 3, 6, 7 y 8, contienen el plásmido pRSETA Tg34/M/II que se deseaba construir. Estas colonias se denominaron *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/II.2, .3, .6, .7 y .8 respectivamente.

**Tabla 4.3.** Caracterización del plásmido pRSETA Tg34/M/II con las enzimas de restricción Hind III, Pst I, Bam HI, Xho I y Eco RI.

Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos de DNA esperados pRSETA	Tamaño de los fragmentos de DNA esperados pRSETA Tg34/M/II	Tamaño de los fragmentos observados pRSETA Tg34/M/II.2, .3, .6, .7 y .8
Xho I	2900 pb	2970, 960 y 720 pb	3.6*, 2.8, 1.0, 0.82 y 4.6** kpb
Pst I	2900 pb	4650 pb	4.3 kpb
Eco RI	2900 pb	4650 pb	4.3, 21.7* y 3.6* kpb
Bam HI	2900 pb	4150 y 500 pb	4.2 y 0.55 kpb
Hind III	2900 pb	4650 pb	4.7, 21.6* y 3.8* kpb

Las bandas identificadas con \* corresponden a DNA plasmídico circular no digerido. La banda identificada con \*\* corresponde a DNA plasmídico lineal producido por digestión incompleta.



**Figura 4.8.** (A) Mapa del plásmido pRSETA Tg34/M/II mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción Xho I, Pst I y Eco RI. (B) Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 5 colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con la construcción pRSETA Tg34/M/II y digerido con las enzimas Xho I, Pst I o Eco RI. Con 5 U de las enzimas Xho I (X), Pst I (P) o Eco RI (E), fueron digeridas muestras de 5 µl de DNA plasmídico extraído de las colonias número 2 (2), 3 (3), 6 (6), 7 (7) y 8 (8) de bacterias transformadas con la construcción pRSETA Tg34/M/II. Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En los carriles marcados como λ fueron aplicadas muestras de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

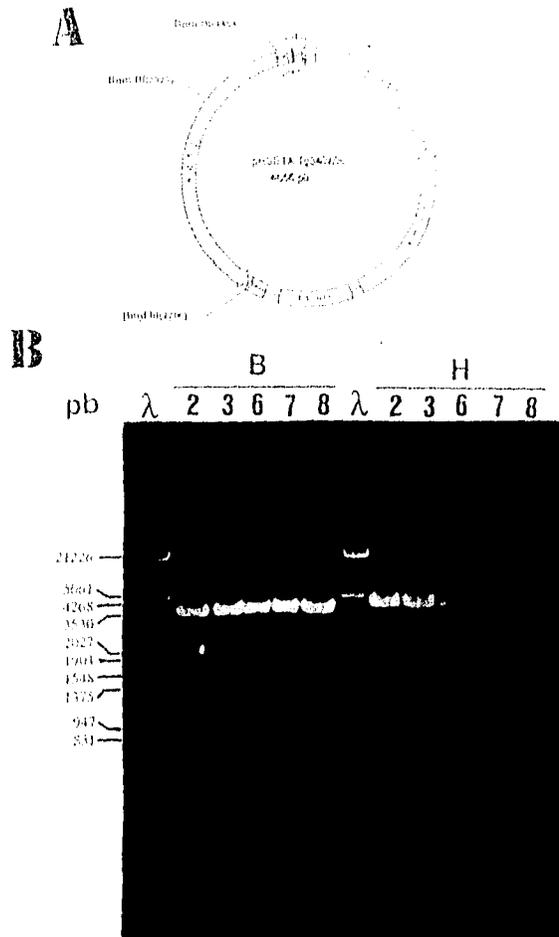


Figura 4.9. (A) Mapa del plásmido pRSETA Tg34/M/II mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción Bam HI o Hind III. (B) Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 5 colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con la construcción pRSETA Tg34/M/II y digerido con enzimas de restricción Bam HI o Hind III. Con 5 U de la enzima de restricción Bam HI (B) o Hind III (H), fueron digeridas muestras de 5  $\mu$ l de DNA plasmídico extraído de las colonias número 2 (2), 3 (3), 6 (6), 7 (7) y 8 (8) de bacterias transformadas con la construcción pRSETA Tg34/M/II. Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En los carriles marcados como  $\lambda$  fueron aplicadas muestras de 500 ng de DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

#### 1.4 Expresión de la proteína ROP2 en *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/11

En un primer experimento, se analizó la expresión de la proteína recombinante en las colonias de *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/11.3 y .6. Se construyó la curva de crecimiento de las colonias probadas y del control de bacterias *E. coli* XL1-Blue transformadas con el vector pRSETA sin el inserto (Figura 4.10). Es importante observar que el crecimiento de las bacterias transformadas con el plásmido recombinante es más lento que el crecimiento de las bacterias transformadas con el vector, aún antes de inducir la expresión de la proteína recombinante por adición de IPTG y del fago M13/T7. Muestras de bacterias obtenidas antes de agregar IPTG, antes de infectar el cultivo con el fago M13/T7, 1, 2, 3 y 5 h después de la infección, fueron lisadas y analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie, y mediante Western blot. En el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie (Figura 4.11), se detectó la expresión de una proteína de 73 a 75 kDa en las muestras correspondientes a la colonia número 6. La proteína se detecta en la muestra tomada 1 h después de haber sido hecha la inducción de la expresión; además, la expresión de esta proteína aumenta conforme transcurre el tiempo.

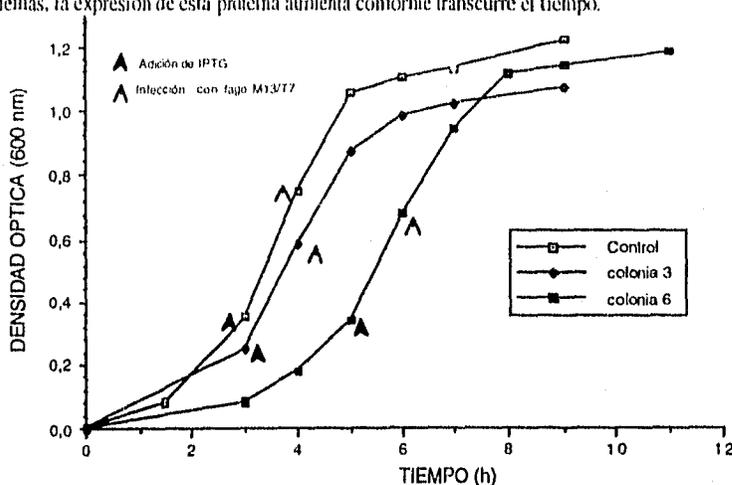
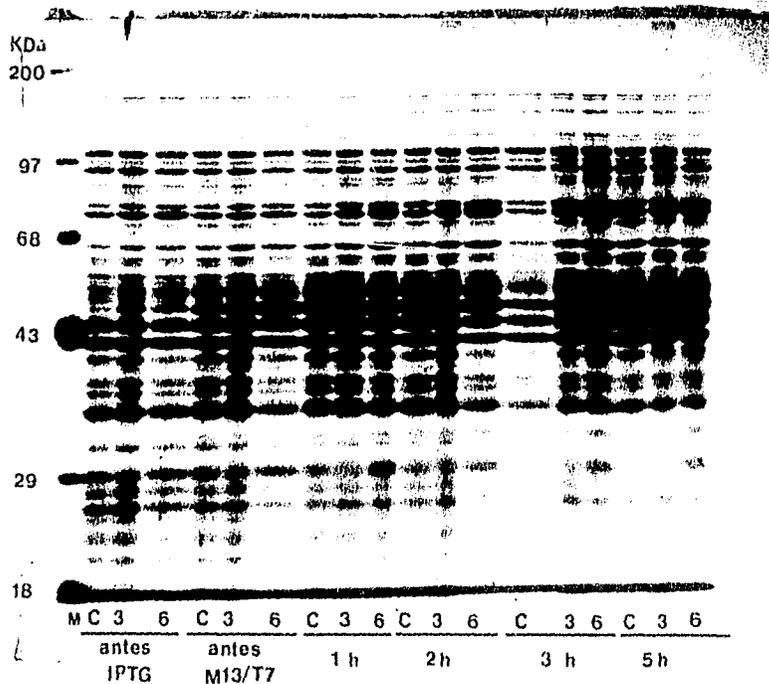


Figura 4.10. Curvas de crecimiento de *E. coli* XL1-Blue transformadas con el plásmido pRSETA Tg34/M/11. El crecimiento de las colonias *E. coli* XL1-Blue pRSETA (control), *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/11.3 (colonia 3) y *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/11.6 (colonia 6), en medio SOB-tetraciclina-ampicilina, fue seguido midiendo la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm y empleando como blanco medio de cultivo estéril. Se indican con flechas los tiempos de adición del IPTG y del fago M13/T7.



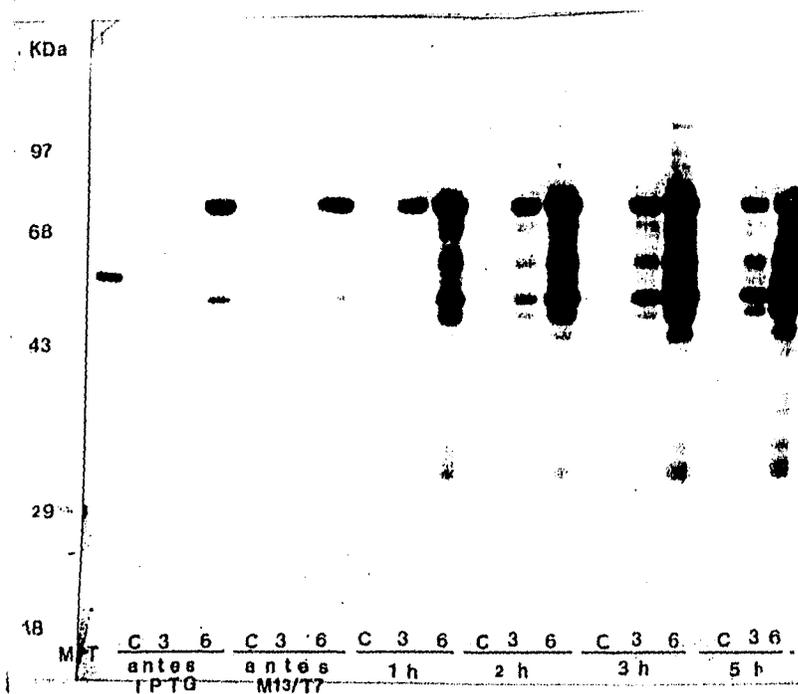
**Figura 4.11.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* XL1-Blue transformada con el plásmido pRSETA Tg34/M/1. Muestras de 1 ml de los cultivos, en SOB-tetraciclina-ampicilina, de *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/1.3 (3), *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/1.6 (6) y del control, *E. coli* XL1-Blue pRSETA (C), fueron cosechadas al momento de añadir IPTG, al momento de infectar con el fago M13/T7 y 1, 2, 3, y 5 h después de la infección, midiendo su DO a 600 nm. Las células contenidas en las muestras fueron separadas por centrifugación y lisadas en buffer de muestra a una concentración de  $2 \times 10^9$  células/ml. Alcuotas de 25  $\mu$ l de estos lisados fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida 10%-SDS. En el carril marcado con una M fue aplicada una muestra de proteínas estándares de peso molecular. Después de la electroforesis, el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie. A la izquierda se indica los pesos moleculares de los estándares.

En el análisis por Western blot (Figura 4.12), en las muestras de las dos colonias de bacterias transformadas que fueron probadas, se observa la expresión de una proteína de peso molecular estimado de 73 a 75 kDa reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-ROP2; esta proteína no se observa en las bacterias del control transformadas con el vector sin inserto. Sin embargo, el nivel de expresión de esta proteína es mayor en la colonia número 6 que en la 3. El reconocimiento específico por el anticuerpo monoclonal anti-ROP2 indica que la banda observada corresponde a la proteína recombinante esperada. El peso de la proteína recombinante no corresponde al esperado (66 kDa), lo cual se explica por la presencia de varios aminoácidos de proteína en la proteína ROP2 que determinan que la proteína desnaturizada muestre un aparente peso molecular mayor. La proteína recombinante se expresa antes de la inducción y se degrada en la bacteria (lo que es evidente por la presencia de bandas de peso molecular menor que corresponden a productos de degradación de la proteína). La máxima proporción de la proteína intacta se observa en la muestra tomada 1 h después de la infección con el fago M13/T7.

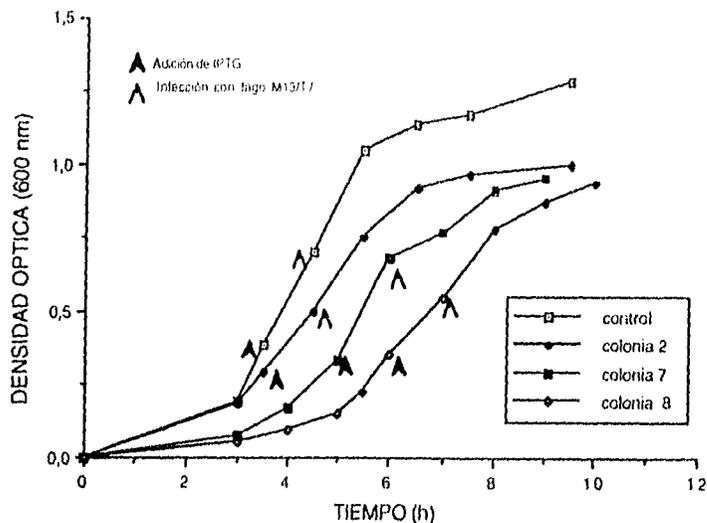
Con el objetivo de confirmar si existe diferencia en la expresión de la proteína recombinante entre las colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con el plásmido pRSETA Tg34/M/H, se realizó un segundo experimento de expresión empleando las colonias 2, 7 y 8. En las curvas de crecimiento de las colonias probadas en este experimento (Figura 4.13) es importante observar nuevamente que el crecimiento de las bacterias transformadas con el plásmido pRSETA Tg34/M/H es más lento que el crecimiento de las bacterias transformadas con el vector pRSETA.

Los lisados bacterianos, obtenidos en este segundo experimento de inducción, fueron analizados por Western blot junto con los lisados obtenidos a partir de la colonia de *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/H,6 en el experimento de expresión anterior (Figura 4.14). Podemos observar que:

1. Entre las colonias probadas no existe diferencia significativa en el nivel de expresión de la proteína recombinante.
2. La expresión está presente antes de iniciar la inducción.
3. Existe degradación de la proteína en la bacteria y la proporción máxima de proteína completa se alcanza 1 h después de la inducción.



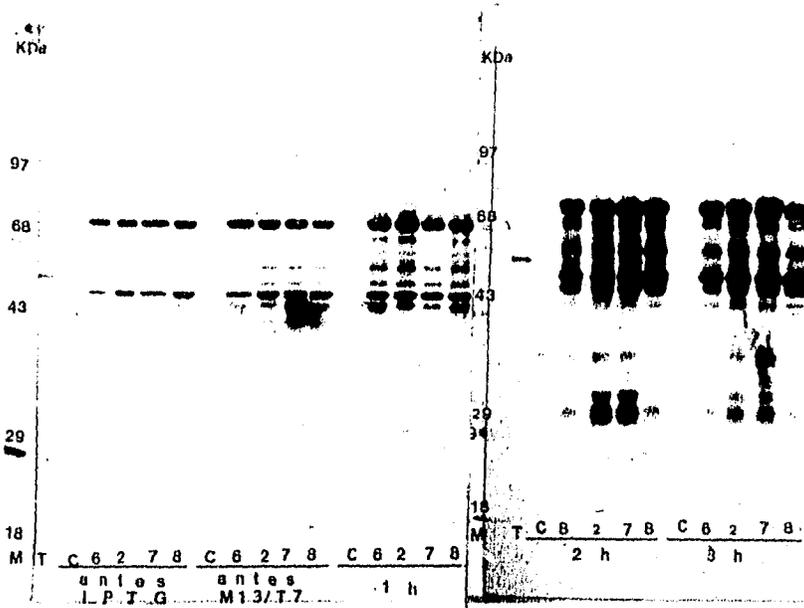
**Figura 4.12.** Análisis por Western blot de la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* XL1-Blue. Alícuotas de 5 µl de los lisados celulares preparados, como se describe en la figura 4.11, a partir de *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M11.3 (3), *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M11.6 (6) y del control, *E. coli* XL1-Blue pRSETA (C) fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida 10%-SDS. En el carril marcado con una M fue aplicada una muestra de proteínas estándares de peso molecular y en el carril marcado con una T fue aplicado un lisado de 1 millón de taquizoitos de *T. gondii*. Después de la electroforesis, las proteínas del gel fueron sometidas a electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. El carril con los marcadores de peso molecular fue teñido con colorante rojo de Ponceau. En la membrana, la presencia de la proteína recombinante fue revelada por inmunodetección, empleando el anticuerpo monoclonal murino anti ROP2 (2D1), el conjugado GAM-AP (anticuerpo anti IgG murina conjugado a fosfatasa alcalina) y el sustrato BCIP-NBT (4 bromo-2-cloro indolil fosfato, nitrozul de tetrazolio). A la izquierda se indican los pesos moleculares de los estándares.



**Figura 4.13.** Curvas de crecimiento de *E. coli* XI.1-Blue transformada con el plásmido pRSETA Tg34/M/11. El crecimiento de las colonias *E. coli* XI.1-Blue pRSETA (control), *E. coli* XI.1-Blue pRSETA Tg34/M/11.2 (colonia 2), *E. coli* XI.1-Blue pRSETA Tg34/M/11.7 (colonia 7) y *E. coli* XI.1-Blue pRSETA Tg34/M/11.8 (colonia 8), en medio SOB-tetraciclina-ampicilina, fue seguido midiendo la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm y empleando como blanco el medio de cultivo estéril. Se indican con flechas los tiempos de adición del IPTG y del fago M13/T7.

En resumen, en esta primera serie de experimentos logramos clonar la información genética para la síntesis de la proteína ROP2 (sin su péptido señal) en el plásmido pRSETA. Las bacterias transformadas con el plásmido recombinante expresan la proteína ROP2 en forma de proteína de fusión, en un nivel detectable por análisis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie, y por análisis por Western blot. Por otra parte, el crecimiento de estas bacterias es más lento que el crecimiento de las bacterias transformadas con el vector. La proteína es sintetizada por la bacteria antes de inducir su expresión, es decir, la transcripción de la información genética no está controlada en un 100% por el promotor T7; además, hay degradación de la proteína recombinante en la bacteria.

Se planteó una hipótesis para explicar algunos de los resultados obtenidos: en el plásmido pRSETA Tg34/M/11 la transcripción del gen de resistencia a la ampicilina (*amp<sup>r</sup>*) y del inserto proceden



**Figura 4.14.** Análisis por Western blot de la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* XL1-Blue. Muestras de 1 ml de cultivos, en SOB-tetraciclina-ampicilina, de *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/1.6 (6), pRSETA Tg34/M/1.2 (2), pRSETA Tg34/M/1.7 (7), pRSETA Tg34/M/1.8 (8) y del control, *E. coli* XL1-Blue pRSETA (C), fueron tomadas al momento de añadir IPTG, al momento de infectar con el fago M13/T7, 1, 2 y 3 h después de la infección, midiendo su D.O. a 600 nm. Las células fueron separadas por centrifugación y lisadas en buffer de muestra a una concentración de  $2 \times 10^9$  células/ml. Alícuotas de 5  $\mu$ l de estos lisados bacterianos fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilanida 10%-SDS. En el carril marcado con M fue aplicada una muestra de proteínas estándares de peso molecular y en el carril marcado con T fue aplicado un lisado de 1 millón de taquizoitos de *T. gondii*. Después de la electroforesis, las proteínas del gel fueron sometidas a electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. El carril con los estándares de peso molecular fue teñido con colorante rojo de Ponceau. En la membrana, la presencia de la proteína recombinante fue revelada por inmunodetección, empleando el anticuerpo monoclonal murino anti ROP2 (2D1), un anticuerpo de cabra anti-IgG murina conjugado a fosfatasa alcalina (GAM-AP) y el sustrato BCIP-NBT. A la izquierda se indican los pesos moleculares de los estándares.

en la misma dirección. La transcripción del gen *amp<sup>r</sup>* es constitutiva y es realizada por las enzimas de transcripción de la bacteria a partir del promotor de este gen. Si las secuencias de DNA del plásmido que determinan la terminación de la transcripción del gen *amp<sup>r</sup>* no son 100% eficientes, entonces la transcripción podría seguir hasta el inserto y, como consecuencia, habría síntesis constitutiva de la proteína recombinante a un bajo nivel. Tomando en cuenta que la proteína recombinante puede tener algún efecto tóxico para *E. coli*, esta síntesis prematura de la proteína recombinante explicaría el lento crecimiento bacteriano y, además, ejercería una presión selectiva sobre el número de copias del plásmido. La selección de las bacterias con pocas copias del plásmido, durante el tiempo del cultivo, traería como consecuencia que, al momento de inducir la expresión de la proteína recombinante, el nivel de expresión de la proteína sea relativamente bajo.

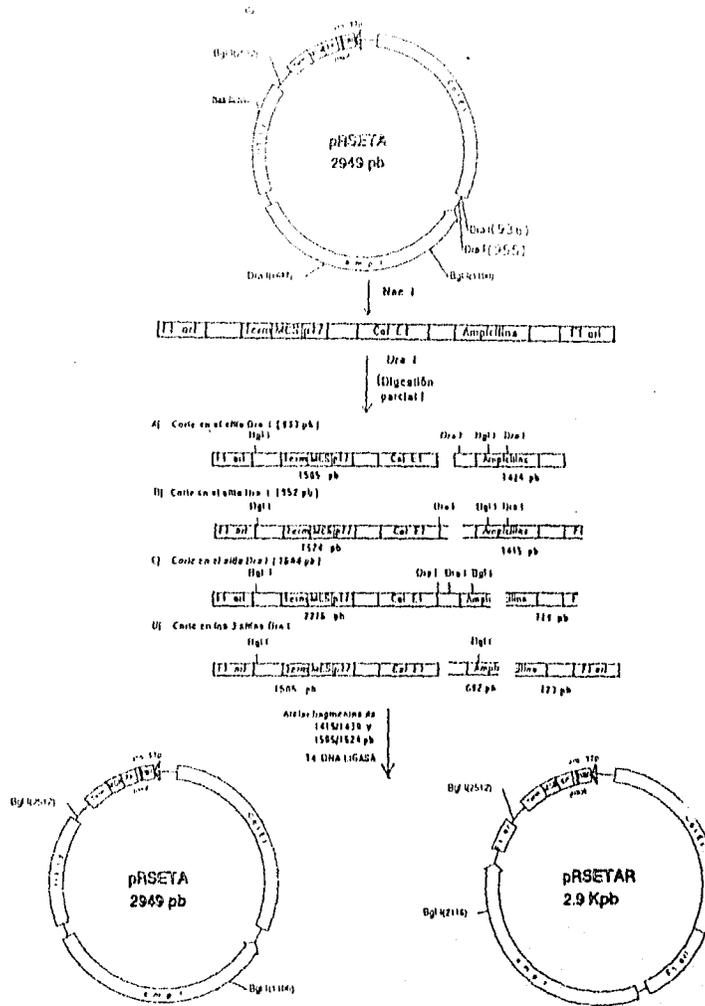
En base a la hipótesis anterior, para evitar la expresión prematura de la proteína recombinante nos propusimos cambiar la orientación del gen *amp<sup>r</sup>* y de su promotor en el plásmido pRSETA, y utilizar este vector modificado para expresar la proteína ROP2 sin su péptido señal.

## 2 MODIFICACIÓN DEL VECTOR pRSETA

### 2.1 Diseño de la modificación del plásmido pRSETA

Para invertir la orientación del gen de resistencia a ampicilina y de su promotor en el plásmido pRSETA, en el mapa de restricción se buscaron sitios de corte que los flanquearan, pero que no se encontraran en secuencias de DNA que son importantes para: la replicación del plásmido (secuencia Col E1, origen de replicación del plásmido), la inserción de secuencias de DNA en el plásmido (MCS), la transcripción y expresión del inserto (promotor T7, secuencias de terminación de la transcripción) y, por supuesto, que no estén situados en el gen *amp<sup>r</sup>*.

En la figura 4.15 observamos que en el plásmido pRSETA hay un sitio único de corte para la enzima de restricción Nae I, localizado en la posición 2370, a un lado del gen *amp<sup>r</sup>*; aunque este sitio se encuentra dentro de la secuencia F1 ori, no afecta ninguna estructura esencial del vector. Al otro lado del gen *amp<sup>r</sup>* no hay sitios únicos de corte para alguna enzima de restricción; hay dos sitios de corte



**Figura 4.15.** Inversión del gen de resistencia a ampicilina en el plásmido pRSETA. El plásmido es digerido con la enzima de restricción *Nae* I y después es digerido parcialmente con la enzima de restricción *Dra* I. Los fragmentos producidos durante la segunda digestión dependen del sitio o sitios en donde corte la enzima. Se separan y purifican los fragmentos de DNA de 1415 pb (o 1434 pb) y 1505 pb (o 1524 pb) y se unen, usando la enzima *T4* DNA ligasa, para formar el plásmido con el gen de resistencia a ampicilina en orientación invertida (pRSETAR) o para rearmar el plásmido original (pRSETA).

para la enzima de restricción Dra I localizados en las posiciones 936 y 955, sin embargo, hay un tercer sitio de corte para Dra I localizado en la posición 1647, justo a la mitad del gen *amp<sup>r</sup>*.

Para aislar el gen *amp<sup>r</sup>* del resto del plásmido y poder volver a unirlos a éste, pero en orientación diferente, se planteó el diseño experimental siguiente (Figura 4.15):

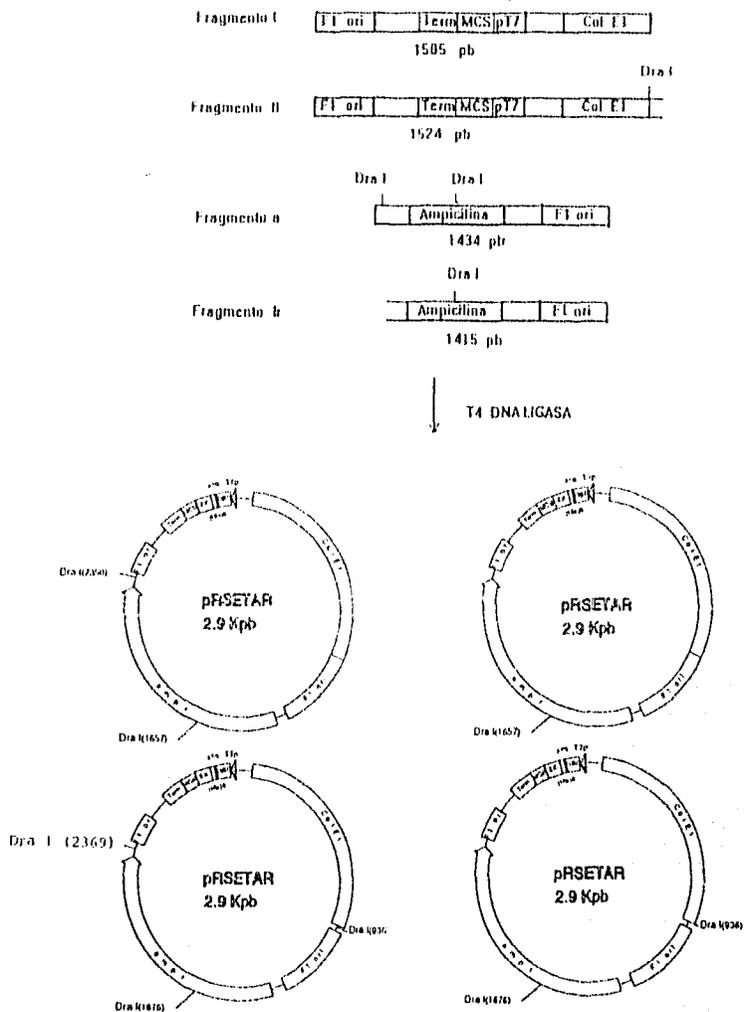
- Linearizar el plásmido pRSETA con la enzima Nae I.
- Con la enzima Dra I, digerir parcialmente al plásmido linearizado con el objeto de cortar el plásmido en uno de los sitios de corte localizados en las posiciones 936 ó 955 y producir fragmentos de 1415 ó 1434 pb (que contienen el gen *amp<sup>r</sup>* y su promotor) y fragmentos de 1505 ó 1524 pb (que contienen el resto del plásmido).
- Aislar estos fragmentos y volver a ligarlos.

De esta manera obtendremos una mezcla de dos tipos de plásmidos: unos con el gen *amp<sup>r</sup>* en la orientación original (pRSETA) y otros con el gen *amp<sup>r</sup>* en la orientación opuesta (pRSETAR). Una consecuencia de la modificación del plásmido pRSETA es el cambio de la posición de uno de los sitios de corte de la enzima Bgl I (Figura 4.15), por lo que se puede diferenciar el plásmido modificado del plásmido original por digestión con esta enzima y análisis de los fragmentos producidos.

Es importante observar que la ligación de los fragmentos de 1505/1524 pb con los fragmentos de 1415/1434 pb puede llevar a la formación de 4 plásmidos distintos con el gen *amp<sup>r</sup>* invertido (Figura 4.16). Al cortar con la enzima de restricción Dra I, estos 4 plásmidos generarán patrones de restricción distintos, con excepción de los plásmidos Ia y IIb que tendrán patrones de restricción indistinguibles.

## 2.2 Construcción del vector pRSETAR

El plásmido pRSETA fue digerido con la enzima de restricción Nae I. Al analizar una muestra de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa, observamos que el plásmido no había sido digerido en su totalidad, por lo que se agregó más enzima Nae I a la mezcla de reacción. Ésta última fue dividida en alícuotas a las que se le agregó distintas concentraciones de la enzima Dra I. Después



**Figura 4.16.** Inversión del gen de resistencia a ampicilina en el plásmido pRSETA. Posibles estructuras del plásmido pRSETAR de acuerdo a los fragmentos de DNA que se unan para su formación. Es importante observar el número de sitios de corte para la enzima de restricción Dra I.

de esta digestión, el DNA fue analizado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.17). Aunque la digestión del plásmido pRSETA con la enzima Nae I no fue completa (dato no mostrado), en las alícuotas digeridas con 0.068 y 0.034 U de la enzima Dra I por  $\mu\text{g}$  de DNA, los fragmentos esperados de 1.5 y 1.4 kpb alcanzaron su concentración máxima. Estos fragmentos fueron purificados y una muestra del DNA obtenido fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.18). Este análisis confirmó la presencia de los fragmentos de 1.5 y 1.4 kpb y, en base a la intensidad luminosa de cada banda, se estimó que la concentración de cada fragmento de DNA en la solución era de 50 ng/ $\mu\text{l}$ .

Estos fragmentos de DNA fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa. Con el DNA producto de la ligación se transformaron células competentes de la bacteria *E. coli* XL1-Blue, empleando medio LB agar-tetraciclina-ampicilina para seleccionar las bacterias transformadas. Los experimentos de ligación y transformación, los controles empleados en cada uno de estos experimentos y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.4.

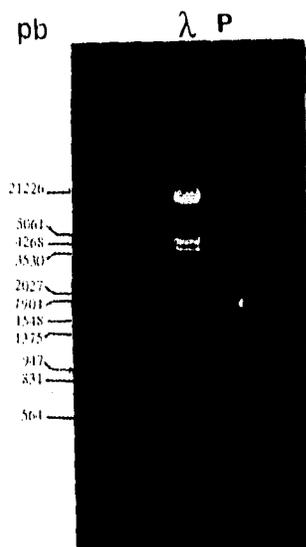
Se extrajo DNA plasmídico de 9 de las 11 colonias obtenidas. Como control, fue extraído DNA plasmídico de *E. coli* XL1-Blue pRSETA. El DNA preparado fue analizado por electroforesis en gel de

**Tabla 4.4.** Construcción del plásmido pRSETAR: experimentos de ligación y transformación.

Ligación	Construcción de pRSETAR	Control (-) de la ligación	Transformación	
Fragmentos de 1400 y 1500 pb del plásmido pRSETA	700 ng	350 ng	1	2
T4 DNA ligasa	1 U	-----	3	4
Volumen final de reacción	15 $\mu\text{l}$	7.5 $\mu\text{l}$	Control (+) de la transformación	Control (-) de la transformación
Cantidad de DNA empleado para la transformación	350 ng de DNA de la ligación	350 ng de DNA del control (-) de la ligación	5 ng del plásmido pRSETA	-----
Colonias obtenidas en medio selectivo (por ml de células transformadas)	11 colonias	Ninguna	> 2000	ninguna



*Figura 4.17.* Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del plásmido pRSETA por las enzimas Nae I y Dra I. 11.6  $\mu\text{g}$  de DNA del plásmido pRSETA fueron digeridos, durante una noche, con 80 U de la enzima de restricción Nae I. Después de agregar 40 U más de la enzima Nae I, la mezcla de reacción fue dividida en alícuotas de 1.86  $\mu\text{g}$  de DNA que fueron digeridas durante 1 h con las siguientes cantidades de la enzima de restricción Dra I: 0.544 U/ $\mu\text{g}$  de DNA (carriles 1 y 2), 0.272 U/ $\mu\text{g}$  de DNA (carriles 3 y 4), 0.136 U/ $\mu\text{g}$  de DNA (carriles 5 y 6), 0.068 U/ $\mu\text{g}$  de DNA (carriles 7 y 8) y 0.034 U/ $\mu\text{g}$  de DNA (carriles 9, 10 y 11). El DNA digerido fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En los carriles marcados como  $\lambda$  fueron aplicadas muestras de 500  $\mu\text{g}$  de DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares. Con flechas se indican los fragmentos de DNA de 1.5 y 1.4 kpb obtenidos.



**Figura 4.18.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de 1400 y 1500 pb del plásmido pRSETA. Después de aislar las bandas de DNA de 1400 y 1500 pb, producido por digestión del plásmido pRSETA con las enzimas de restricción Nae I y Dra I, se purificó el DNA con la matriz Prep-A-Gene. Una muestra de 2  $\mu$ l de la solución de DNA purificado fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (carril P). En el carril  $\lambda$  fue aplicada una muestra de 500 ng de DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

agarosa (Figura 4.19). En los carriles correspondientes al DNA plasmídico extraído de 8 colonias se observaron bandas de DNA de tamaño similar a las observadas en el carril correspondiente al plásmido pRSETA, demostrando que el plásmido de estas colonias tiene un peso molecular semejante al vector pRSETA. En el carril correspondiente al DNA plasmídico extraído de la colonia 3 se observaron bandas de DNA plasmídico de tamaño mayor al esperado, por lo que se descartó esta colonia.

Como se mencionó anteriormente, es posible distinguir el plásmido pRSETA del plásmido pRSETAR por medio de una digestión con la enzima de restricción Bgl I, ya que en el caso de pRSETA se espera producir fragmentos de 1395 y 1544 pb, mientras que en el caso de pRSETAR se esperan fragmentos de 396 y 2553 pb (Figura 4.20 A y B). El DNA plasmídico extraído del control y de las 8 colonias de *E. coli* XL1-Blue seleccionadas en el experimento anterior fue digerido con la enzima Bgl I. El DNA digerido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.20 C). En el gel se observa que los fragmentos de DNA producidos por la digestión del DNA plasmídico de las colonias número 1, 2, 4 y 9 tienen un tamaño de 1.6 y 1.3 kpb, al igual que los fragmentos producidos por digestión del plásmido pRSETA, por lo que estas cuatro colonias poseen el plásmido pRSETA original. En cambio, los fragmentos de DNA producidos por digestión del DNA plasmídico de las colonias número 5, 6, 7 y 8 tienen un tamaño de 2.45 y 0.4 kpb; por lo tanto, parece que estas cuatro colonias contienen el plásmido pRSETAR deseado.

Debido a problemas de crecimiento, las colonias número 5, 6 y 7 se descartaron. Se verificó que el patrón de restricción del DNA plasmídico de la colonia número 8 (denominada *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8) fuera el esperado para el plásmido pRSETAR. Este DNA fue digerido con las enzimas Bgl I, Hind III, Pvu II, Xho I o Dra I. Como control, fue digerido el plásmido pRSETA con las mismas enzimas. El DNA digerido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.21). Los fragmentos producidos en la digestión con la enzima Bgl I confirmaron los resultados anteriores. La obtención de una banda de 2.9 kpb, correspondiente al plásmido linealizado como resultado de la digestión de con las enzimas Hind III, Pvu II o Xho I, confirma la presencia de un sitio único de corte para cada una de estas enzimas en ambos plásmidos. Al digerir el plásmido de la colonia número 8 con la enzima Dra I se obtienen dos fragmentos de DNA de tamaño calculado de 2.2 y 0.75 kpb (iguales a los obtenidos en el control), por lo que podemos suponer que este plásmido fue formado por la unión de

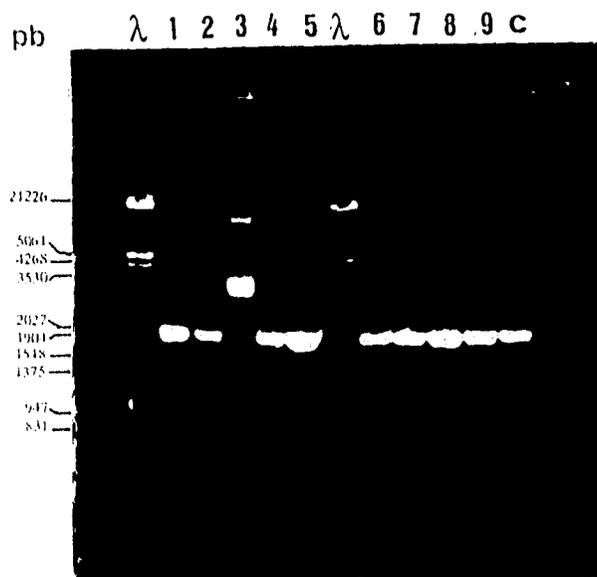
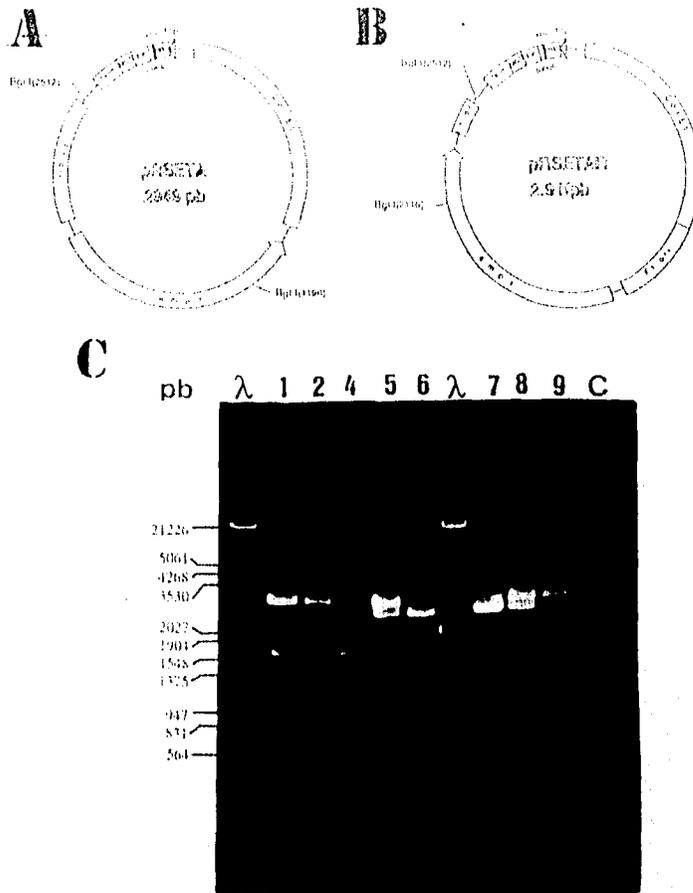
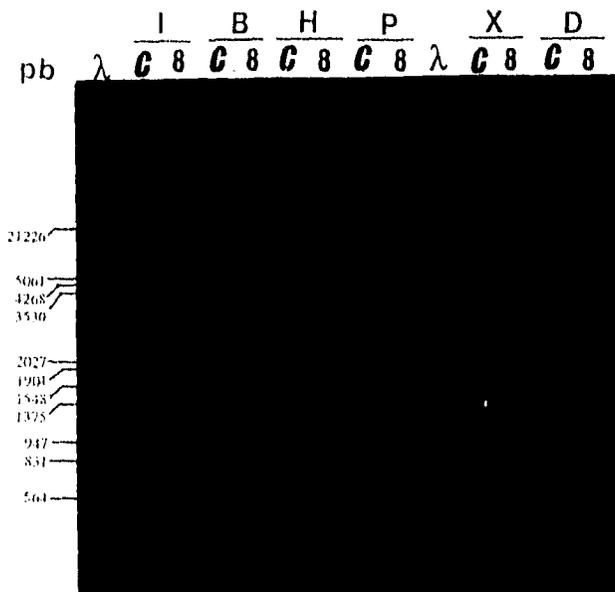


Figura 4.19. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 9 colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con DNA producto de la ligación de los fragmentos de 1500 y 1400 pb del plásmido pRSETA. Muestras de 5 µl de DNA plasmídico, extraído de las colonias número 1 (carril 1), 2 (carril 2), 3 (carril 3), 4 (carril 4), 5 (carril 5), 6 (carril 6), 7 (carril 7), 8 (carril 8), 9 (carril 9) de bacterias transformadas con el DNA de la ligación y de *E. coli* XL1-Blue pRSETA (carril C), fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En los carriles λ se aplicó una muestra de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Eco RI y Hind III como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.



**Figura 4.20.** (A y B) Mapas de los plásmidos pRSETA y pRSETAR mostrando los sitios de corte de la enzima de restricción Bgl I. (B) Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 8 colonias de bacterias transformadas con la construcción pRSETAR y digerido con la enzima Bgl I. Con 10 U de la enzima Bgl I fueron digeridas muestras de 5 µl de DNA plasmídico extraído de las colonias número 1 (carril 1), 2 (carril 2), 4 (carril 4), 5 (carril 5), 6 (carril 6), 7 (carril 7), 8 (carril 8), 9 (carril 9) de bacterias transformadas con el DNA de la ligación entre los fragmentos de 1.5 y 1.4 kpb del plásmido pRSETA. Como control fue digerida una muestra de 5 µl de DNA plasmídico de *E. coli* XL1-Blue pRSETA (carril C). Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En los carriles λ fueron aplicadas muestras de 500 ng del DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.



**Figura 4.21.** Análisis de restricción del DNA plasmídico de la colonia de bacterias transformadas número 8. Muestras de 5 µl de DNA plasmídico extraído de *E. coli* XL1-Blue pRSETA (C) y *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8 (8) fueron digeridas con 10 U de la enzima Bgl I (B), Hind III (H), Pvu II (P), Xho I (X) o Dra I (D). Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En los carriles C1 y 8I fueron aplicadas muestras de 5 µl del DNA plasmídico intacto extraído de las colonias de *E. coli* XL1-Blue pRSETA y pRSETAR.8 respectivamente. En los carriles λ fueron aplicadas muestras de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

los fragmentos de 1505 y 1434 pb (Figura 4.16, Ia) o por la unión de los fragmentos de 1524 y 1415 pb (Figura 4.16, Ib).

Para disponer de DNA plasmídico pRSETAR de calidad adecuada y en cantidad suficiente para los experimentos de ligación, se purificó DNA plasmídico de *E. coli* XI.1-Blue pRSETAR.8 empleando el método del Midiprep. Se cuantificó el DNA obtenido y se evaluó la pureza por método espectrofotométrico. La relación  $A^{260}/A^{280}$  fue de 1.89 (debe ser mayor a 1.8) y la cantidad total obtenida de DNA purificado fue de 128  $\mu$ g.

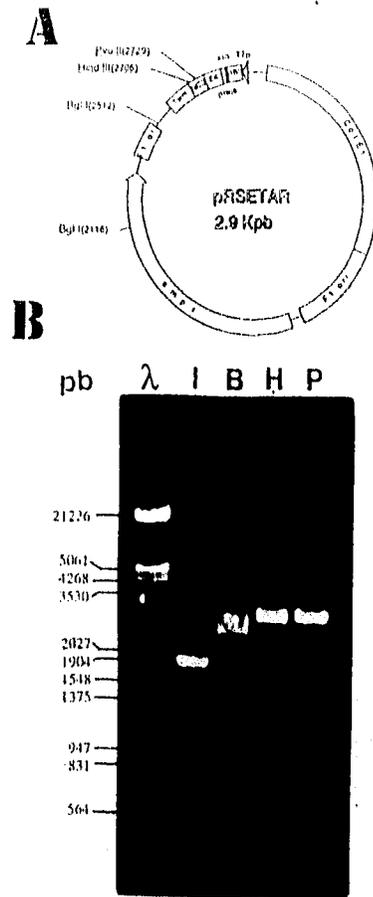
Para verificar la calidad del DNA plasmídico purificado, muestras de éste fueron digeridas con las enzimas de restricción Bgl I, Hind III o Pvu II. El DNA digerido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa junto con una muestra de DNA plasmídico intacto (Figura 4.22). En el carril donde fue aplicada la muestra de DNA plasmídico intacto se observó una banda intensa de DNA, correspondiente al plásmido circular cerrado superenrollado, y otra banda menor, correspondiente al plásmido circular. En el carril donde fue aplicada la muestra digerida con la enzima Bgl I se observan dos bandas de DNA de 2.4 y 0.5 kpb, características del plásmido pRSETAR. En los carriles donde fueron aplicadas las muestras digeridas con cada una de las enzimas Hind III y Pvu II se observa una banda de DNA correspondiente al plásmido linealizado (de un tamaño calculado de 2.9 kpb). Los resultados anteriores muestran que el DNA purificado es el plásmido pRSETAR.

### **3 EXPRESIÓN DE UNA FORMA RECOMBINANTE DE LA PROTEINA ROP2 USANDO EL VECTOR pRSETAR**

#### **3.1 Construcción del plásmido pRSETAR Tg34/M/H**

La clonación del fragmento de DNA con la información para la síntesis de la proteína ROP2 sin su péptido señal en el plásmido pRSETAR se realizó siguiendo el diseño representado en la figura 4.1.

El plásmido pRSETAR fue digerido con las enzimas Hind III y Pvu II; se aisló y purificó el fragmento pRSETAR/PH de 2.9 kpb. Una muestra del fragmento purificado fue analizada mediante



**Figura 4.22.** (A) Mapa del plásmido pRSETAR mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción Bgl I, Hind III y Pvu II. (B) Análisis por electroforesis en gel de agarosa del plásmido pRSETAR.8 purificado por Midiprep y digerido con las enzimas Bgl I, Hind III o Pvu II. Muestras de 1  $\mu$ l del plásmido pRSETAR.8 (320 ng/ $\mu$ l), purificado por cromatografía de intercambio aniónico Qiagen-tip 100 (Midiprep), fueron digeridas con 10 U de las enzimas Bgl I (carril B), Hind III (carril H) o Pvu II (carril P). Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En el carril I fue aplicada una muestra de 1  $\mu$ l del mismo DNA plasmídico purificado e intacto y en el carril  $\lambda$  fue aplicada una muestra de 500 ng de DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

electroforesis en gel de agarosa junto con una muestra de 200 ng del plásmido pRSETAR intacto (Figura 4.23). También fue analizada una muestra del fragmento Tg34/M/II de 1730 pb purificado anteriormente. En el carril correspondiente al fragmento Tg34/M/II se observó una banda de DNA de 1.7 kpb y en el carril correspondiente al fragmento pRSETAR/P/II se observó una banda de DNA de 2.9 kpb. Estos resultados demuestran que contamos con los fragmentos purificados necesarios para la clonación. La comparación entre la intensidad luminosa de las bandas correspondientes a los fragmentos purificados y la correspondiente al plásmido pRSETAR intacto nos permitió considerar que la concentración de los fragmentos era aproximadamente de 40 ng/μl.

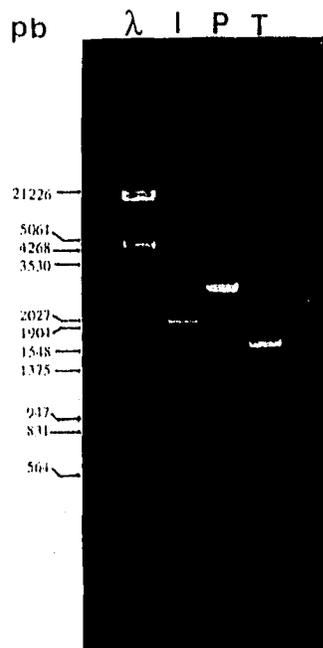
Se ligaron cantidades equimolares de los fragmentos pRSETAR/P/II y Tg34/M/II con la enzima T4 DNA ligasa y se transformaron células competentes de la cepa de *E. coli* XL1-Blue con los productos de ligación. Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB agar-tetraciclina-ampicilina. Los resultados obtenidos se reportan en la tabla 4.5.

La relación entre el número de colonias obtenidas de las mezclas de ligación con y sin inserto (84:12) sugiere que la mayoría de las 84 colonias transformadas obtenidas deben contener el plásmido recombinante deseado.

**Tabla 4.5.** Construcción del plásmido pRSETAR Tg34/M/II: experimentos de ligación y transformación

Ligación	1 (Ligación de ambos fragmentos)	2 (Control para medir el nivel de re- circulanización del vector pRSETAR)	3 (Control para medir presen- cia del vector pRSETAR intacto y recirculanización espontánea)	4 (Control + de transformación)	5 (Control - de transformación)
Tg34/M/II (1750 pb)	50 ng	-----	---		
pRSETAR/P/II	100 ng	100 ng	100 ng		
T4 DNA ligasa	1 U	1 U	-----		
Volumen de reacción	15 μl	15 μl	15 μl		
Transformación	1	2	3	4 (Control + de transformación)	5 (Control - de transformación)
DNA para la transformación	5 μl de la reacción de ligación 1	5 μl de la reacción de ligación 2	5 μl de la reacción de ligación 3	5 ng de DNA pRSETAR	-----
Número de colonias obte- nidas en placas LB agar- tetraciclina-ampicilina	84 colonias	12 colonias	4 colonias	> 200 colonias	ninguna

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



**Figura 4.23.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmento pRSETAR/P/HI y Tg34/M/HI. Muestras de 5  $\mu$ l de las soluciones de DNA pRSETAR/P/HI (carril P) y Tg34/M/HI (carril T), purificado con matriz Prep-A-Gene, fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En el carril  $\lambda$  se aplicó una muestra de 500 ng de DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño y en el carril I se aplicó una muestra de 320 ng del plásmido pRSETAR purificado e intacto. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

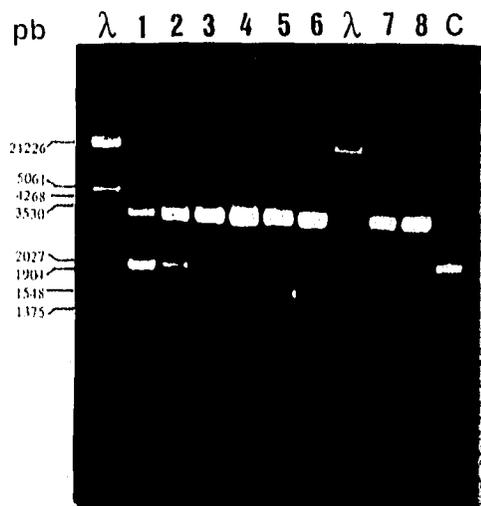
Para diferenciar las bacterias transformadas con el vector recircularizado de las bacterias transformadas con el plásmido recombinante, fue extraído DNA plasmídico de 8 colonias candidatas. Como control se obtuvo DNA plasmídico de *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8. El DNA plasmídico extraído se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.24). En los carriles correspondientes al DNA plasmídico de las colonias candidatas número 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se observa el mismo patrón de bandas. Estas bandas corresponden a DNA de tamaño mayor al DNA del vector pRSETAR, por lo que probablemente estas colonias contienen el plásmido con el inserto. En los carriles correspondientes a las colonias candidatas número 1 y 2 observamos una banda que corresponde al tamaño del vector pRSETAR y otra banda correspondiente al tamaño del plásmido con inserto, lo que se explica por la probable contaminación cruzada entre las dos colonias.

Con el objetivo de verificar que el patrón de restricción del plásmido contenido en las colonias transformadas 3, 5, 6 y 8 correspondía al patrón esperado para el plásmido pRSETAR Tg34/M/H, el DNA plasmídico extraído de estas colonias fue digerido con las enzimas Bam HI, Hind III o Xho I. El DNA digerido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa junto con muestras de DNA plasmídico intacto (Figura 4.25). En la tabla 4.6 se reportan los resultados obtenidos en la electroforesis, es decir, el número y tamaño aproximado de los fragmentos de DNA producidos experimentalmente en cada una de las digestiones, así como el número y tamaño de los fragmentos de DNA esperados.

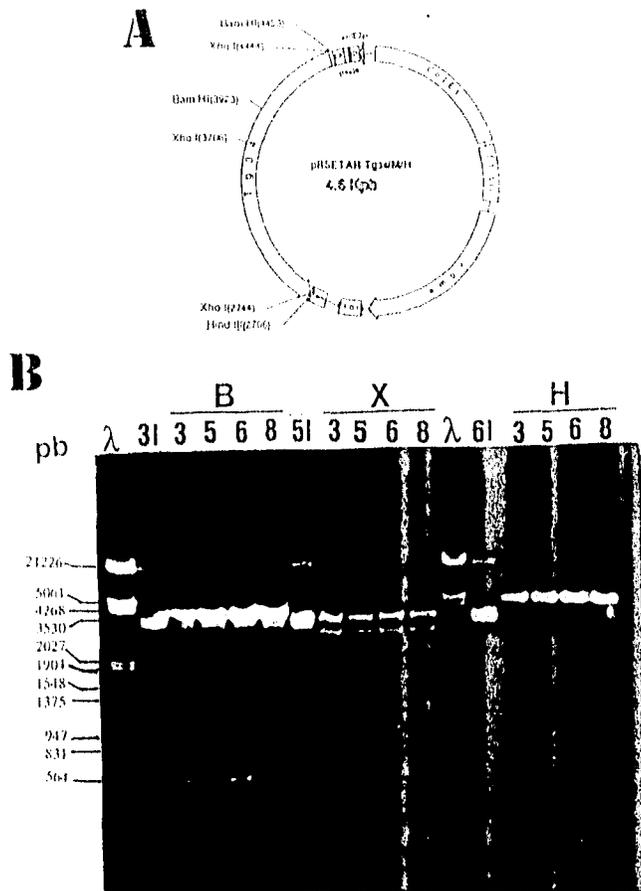
De los resultados reportados en la tabla 4.6 podemos concluir que las cuatro colonias de bacterias transformadas analizadas contienen el plásmido pRSETAR Tg34/M/H; es decir, hemos clonado el fragmento de DNA que codifica para la síntesis de ROP2 sin su péptido señal, en el vector pRSETAR.

**Tabla 4.6.** Caracterización del plásmido pRSETAR Tg34/M/H por mapeo de restricción.

Enzima de restricción	Fragmentos de DNA esperados		Fragmentos observados DNA plasmídico de las 4 colonias transformadas analizadas
	pRSETAR	pRSETAR Tg34/M/H	
Bam HI	2900 pb	4150 y 500 pb	4.0 y 0.55 kpb
Xho I	2900 pb	2970, 960 y 720 pb	2.8, 0.9 y 0.75 kpb
Hind III	2900 pb	4650 pb	4.65 kpb



**Figura 4.24.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico extraído de 8 colonias de *E. coli* XL1-Blue transformadas con el producto de la ligación de los fragmento Tg34/M/11 y pRSETAR/P11. Muestras de 5 µl de DNA plasmídico de las colonias número 1 (carril 1), 2 (carril 2), 3 (carril 3), 4 (carril 4), 5 (carril 5), 6 (carril 6), 7 (carril 7), 8 (carril 8) de bacterias transformadas y de *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8 (carril C), fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En los carriles λ se aplicaron muestras de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.



**Figura 4.25.** (A) Mapa del plásmido pRSETAR Tg34/M/II mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción Bam HI, Xho I y Hind III. (B) Análisis de restricción del DNA plasmídico de 4 colonias de bacterias transformadas con la construcción pRSETAR Tg34/M/II. Con 10 U de las enzimas Bam HI (B), Xho I (X) o Hind III (H), fueron digeridas muestras de 5 µl de DNA plasmídico extraído de las colonias número 3 (3), 5 (5), 6 (6) y 8 (8) de bacterias transformadas con los productos de ligación de los fragmentos pRSETAR/P/II y Tg34/M/II. Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Además, fueron aplicadas muestras de 5 µl de DNA plasmídico de la colonia número 3 (carril 3I), 5 (carril 5I) y 6 (carril 6I), respectivamente. En los carriles marcados como λ fueron aplicadas muestras de 500 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III y Eco RI como estándares de tamaño. A la izquierda se indica el tamaño de los fragmentos de DNA estándares.

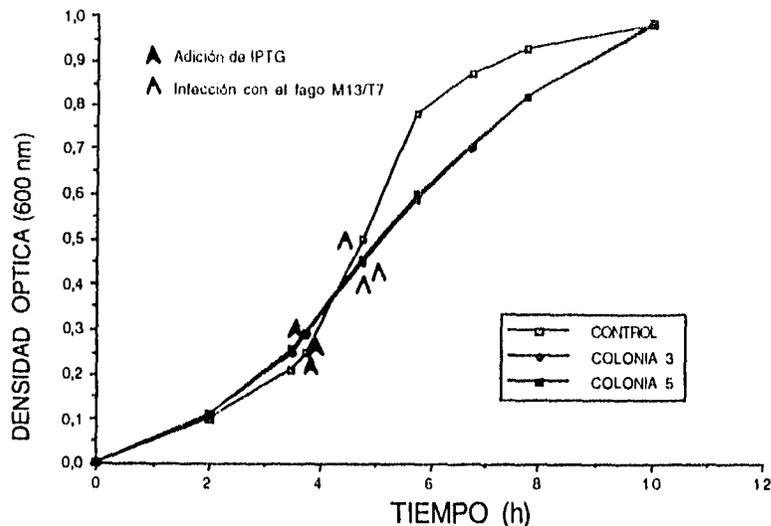
### 3.2 Expresión de la proteína ROP2 en *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H

Para determinar la cinética de expresión de la proteína recombinante en *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H, se cultivaron las colonias transformadas *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/H.3 y .5 y se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG y del fago M13/T7, tomando muestras al momento de añadir IPTG, al momento de añadir el fago, 1, 2, 3 y 5 h después. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie, y por Western blot. Como control se aplicó el mismo procedimiento a *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8.

Es importante observar que el crecimiento de las bacterias transformadas con el plásmido que codifica para la síntesis de la proteína recombinante es semejante al crecimiento de las bacterias transformadas con el vector sin inserto, hasta el momento de la adición del fago M13/T7 (Figura 4.26).

En el análisis por electroforesis y tinción con azul de Coomassie (Figura 4.27) podemos observar la aparición de una banda de 73 a 75 kDa en las colonias transformadas *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H.3 y .5; esto ocurre una hora después de la adición del fago M13/T7 y la intensidad de esta banda se va incrementando conforme transcurre el tiempo. La banda no aparece en los carriles correspondientes a las bacterias transformadas con el vector pRSETAR, lo que sugiere que se trata de la proteína recombinante.

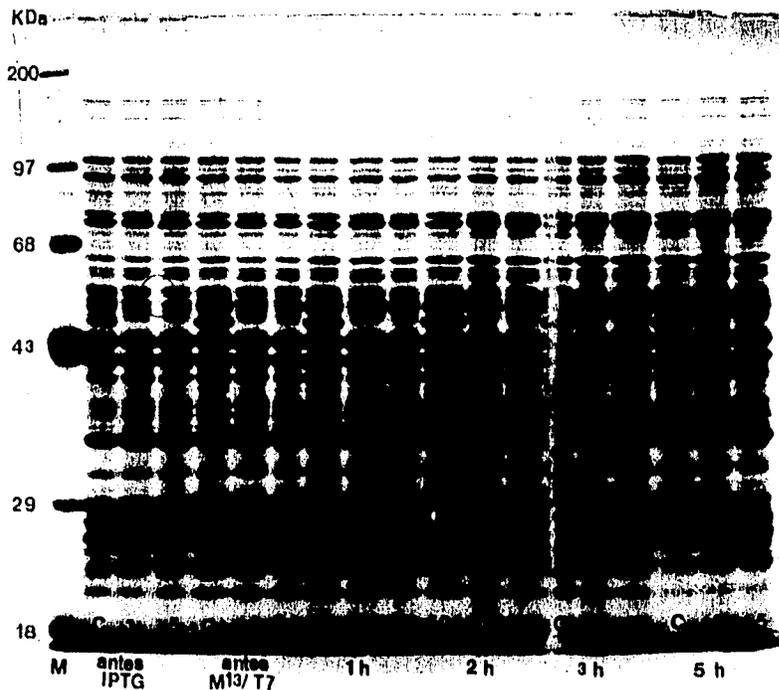
En el análisis por Western blot (Figura 4.28), en las muestras de las dos colonias transformadas analizadas se observa la presencia de una proteína de 73 a 75 kDa que reacciona con el anticuerpo monoclonal anti-ROP2 (2D1); el nivel de expresión es semejante en ambas colonias. La expresión de la proteína ROP2 recombinante sigue ocurriendo aún antes de iniciar la inducción; no obstante, el nivel de expresión aumenta notablemente durante la fase de inducción. Las bandas con proteínas de peso molecular menor que reaccionaron con el anticuerpo, corresponden a los productos de degradación de la proteína recombinante en la bacteria. La máxima proporción de la proteína completa se alcanza 2 h después de la infección con el fago M13/T7.



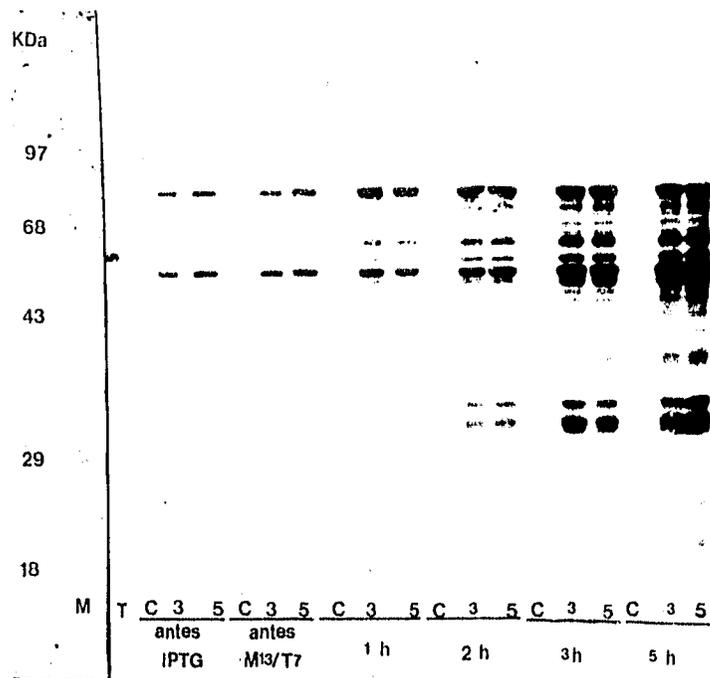
**Figura 4.26.** Curvas de crecimiento de *E. coli* XL1-Blue transformada con pRSETAR Tg34/M/H. El crecimiento de *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8 (control), *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H.3 (colonia 3) y *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H.5 (colonia 5), en medio SOB-tetraciclina-ampicilina, fue seguido midiendo la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm, empleando como blanco medio de cultivo estéril. Se indica con flechas los tiempos de adición del IPTG y del fago M13/T7.

#### 4 COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/H y pRSETAR Tg34/M/H

Para determinar el efecto del cambio de orientación del gen *amp<sup>r</sup>* del vector pRSETA sobre el nivel de expresión constitutiva e inducida de la proteína recombinante, se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG y de fago M13/T7 a cultivos de las bacterias *E. coli* XL1-Blue transformadas con pRSETA Tg34/M/H y pRSETAR Tg34/M/H. Como controles fueron realizados cultivos de *E. coli* XL1-Blue pRSETA y pRSETAR. Se tomaron muestras de los cultivos al momento de añadir IPTG, al momento de añadir el fago M13/T7, 1, 2, 3 y 5 h después de la infección. Para medir la expresión constitutiva se omitió la adición de IPTG y del fago en cultivos paralelos de las mismas bacterias, tomando muestras a los mismos tiempos que en los cultivos inducidos respectivos.



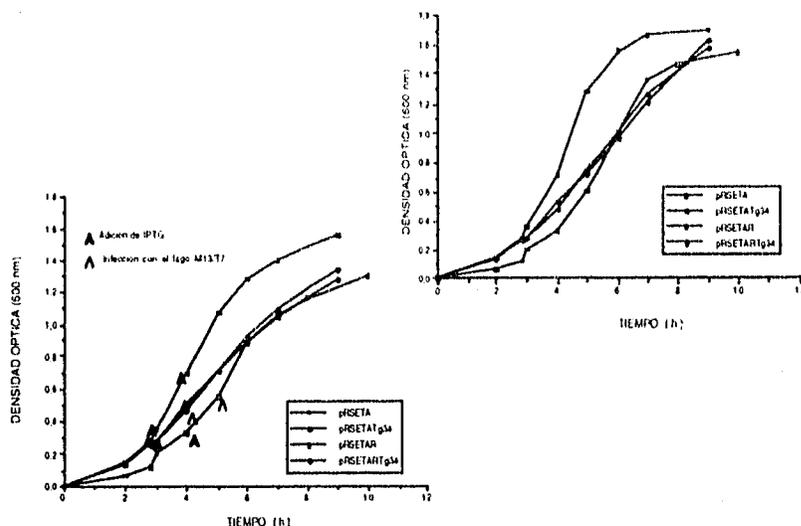
**Figura 4.27.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie de la cinética de expresión de la proteína recombinante. Muestras de 1 ml de los cultivos, en SOB-tetraciclina-ampicilina, de *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H.3 (3), *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/H.5 (5) y del control, *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8 (C), fueron tomadas al momento de añadir IPTG, al momento de infectar con el fago M13/T7 y 1, 2, 3, y 5 h después de la infección, midiendo su D.O. a 600 nm. Las bacterias fueron separadas por centrifugación y lisadas en buffer de muestra a una concentración de  $2 \times 10^9$  células/ml. Alícuotas de 25  $\mu$ l de estos lisados fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida 10%-SDS. En el carril marcado como M fue aplicada una muestra de proteínas estándares de peso molecular. Después de la electroforesis el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie. A la izquierda se indican los pesos moleculares de los estándares.



**Figura 4.28.** Análisis por Western blot de la expresión de la proteína recombinante. Alícuotas de 5 µl de los lisados bacterianos preparados a partir de los cultivos, en SOB-tetraciclina-ampicilina, de *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/1.3 (3), *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/1.5 (5) y del control, *E. coli* XL1-Blue pRSETAR.8 (C), fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida 10%-SDS. En el carril marcado como M fue aplicada una muestra de proteínas estándares de peso molecular y en el carril marcado como T fue aplicado un lisado de 1 millón de taquizoitos de *T. gondii*. Después de la electroforesis, las proteínas del gel fueron sometidas a electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. El carril con los marcadores de peso molecular fue teñido con colorante rojo de Ponceau. En la membrana, la presencia de la proteína recombinante fue revelada por inmunodetección empleando el anticuerpo monoclonal murino anti ROP2 (2D1), el conjugado GAM-AMP (anticuerpo anti-IgG murina conjugado a fosfatasa alcalina) y el sustrato BCIP-NBT. A la izquierda se indican los pesos moleculares de los estándares.

Las curvas de crecimiento de los cultivos inducidos y no inducidos se muestran en la figura 4.29 A y B, en donde podemos observar que: a) la velocidad de crecimiento de la colonia de bacterias *E. coli* XL1-Blue pRSETA es mayor que la velocidad de crecimiento de las otras tres colonias y b) las velocidades de crecimiento de las colonias de bacterias transformadas con el plásmido pRSETAR, pRSETAR Tg34/M/11 y pRSETA Tg34/M/11 son semejantes.

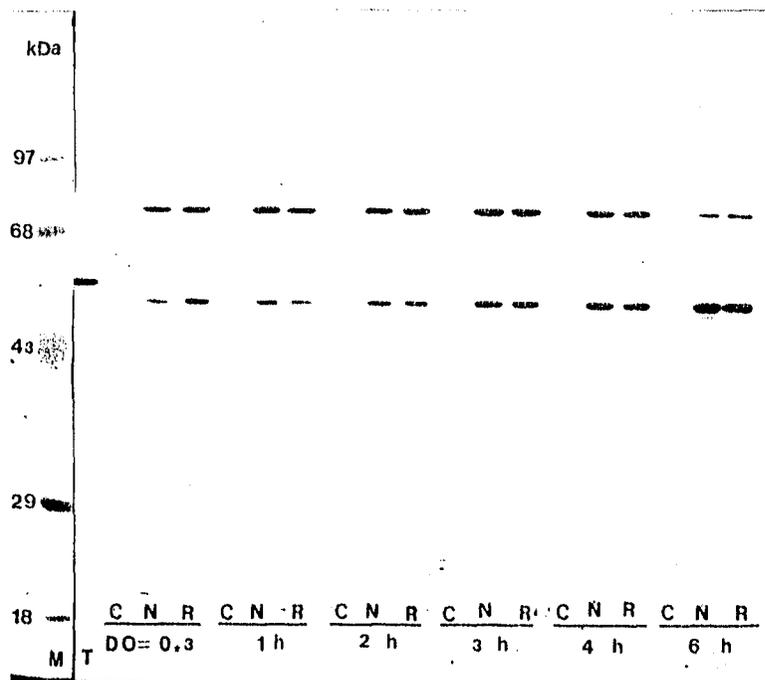
Las muestras de los cultivos fueron analizadas por Western blot. En el análisis de las muestras de los cultivos no inducidos (Figura 4.30) se observó que existe expresión constitutiva de la proteína recombinante en las dos colonias probadas y el nivel de esta expresión es semejante en ambas.



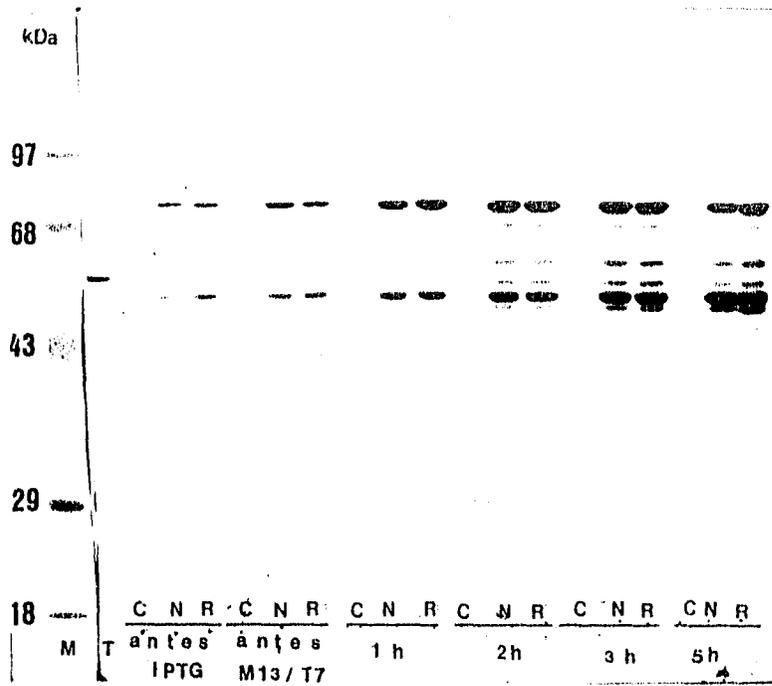
**Figura 4.29.** Curvas de crecimiento de bacterias *E. coli* XL1-Blue transformadas con los plásmidos pRSETA, pRSETA Tg34/M/11, pRSETAR y pRSETAR Tg34/M/11 en condiciones de inducción (B) o no inducción (A) de la síntesis de la proteína recombinante. El crecimiento de *E. coli* XL1-Blue pRSETA (pRSETA), pRSETA Tg34/M/1. 6 (pRSETATg34), pRSETAR.8 (pRSETAR) y pRSETAR Tg34/M/1.5 (pRSETARTg34), en medio SOB-tetraciclina-ampicilina, fue seguido midiendo la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm, empleando como blanco medio de cultivo estéril. En las curvas correspondientes a los cultivos inducidos se indica con flechas los tiempos de adición del IPTG y del fago M13/17.

En el análisis de las muestras de los cultivos inducidos (Figura 4.31), se observa que el nivel de expresión inducida de la proteína recombinante en las dos colonias es semejante; además, estos resultados corroboran que ocurre degradación de la proteína, obteniéndose la mayor producción de proteína completa entre 1 y 2 h después de la infección con el fago M13/T7.

En resumen, estos datos muestran que no hay diferencia significativa en los niveles de expresión constitutiva e inducida entre los vectores pRSETA y pRSETAR, es decir, la expresión constitutiva de la proteína recombinante no se debe a la transcripción conjunta del gen *amp<sup>r</sup>* y del inserto; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que esta expresión constitutiva limite el nivel de expresión obtenido.



**Figura 4.30.** Análisis por Western blot de la expresión constitutiva de la proteína recombinante en *E. coli* XLI-Blue pRSETA Tg34/M/11 y pRSETAR Tg34/M/11. Alícuotas de 5 µl de los lisados bacterianos preparados a partir de los cultivos no inducidos, en SOB-tetraciclina-ampicilina, *E. coli* XLI-Blue pRSETA Tg34/M/11.6 (N), *E. coli* XLI-Blue pRSETAR Tg34/M/11.5 (R) y del control, *E. coli* XLI-Blue pRSETA (C) fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida 10%-SDS. En el carril marcado con M fue aplicada una muestra de proteínas estándares de peso molecular y en el carril marcado con T fue aplicado un lisado de 1 millón de taquizoitos de *T. gondii*. Después de la electroforesis, las proteínas del gel fueron sometidas a electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. El carril con los marcadores de peso molecular fue teñido con colorante rojo de Ponceau. En la membrana, la presencia de la proteína recombinante fue revelada por inmunodetección empleando el anticuerpo monoclonal murino anti-ROP2 (2D1), el conjugado GAM-AP (anticuerpo anti IgG murina conjugado a fosfatasa alcalina) y el sustrato BCIP-NBT. A la izquierda se indican los pesos moleculares de los estándares.



**Figura 4.31.** Análisis por Western blot de la expresión inducida de la proteína recombinante en *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/11 y pRSETAR Tg34/M/11. Alícuotas de 5 µl de los lisados bacterianos preparados a partir de cultivos, en medio SOB-tetraciclina-ampicilina, de *E. coli* XL1-Blue pRSETA Tg34/M/11.6 (N), *E. coli* XL1-Blue pRSETAR Tg34/M/11.5 (R) y del control, *E. coli* XL1-Blue pRSETA (C), fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida 10%-SDS. En el carril marcado con M fue aplicada una muestra de proteínas estándares de peso molecular y en el carril marcado con T fue aplicado un lisado de 1 millón de taquizoitos de *T. gondii*. Después de la electroforesis, las proteínas del gel fueron sometidas a electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. El carril con los marcadores de peso molecular fue teñido con colorante rojo de Ponceau. En la membrana, la presencia de la proteína recombinante fue revelada por inmunodetección empleando el anticuerpo monoclonal murino anti-ROP2 (2D1), el conjugado GAM-AP (anticuerpo anti IgG murina conjugado a fosfatasa alcalina) y el sustrato BCIP-NBT. A la izquierda se indican los pesos moleculares de los estándares.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha logrado la expresión en *E. coli* de una forma recombinante de la proteína ROP2 (sin péptido señal), empleando el sistema de expresión basado en el uso del plásmido pRSETA y pRSETA modificado (pRSETAR). En base al objetivo de este proyecto, disponer de un sistema para la expresión de cantidades abundantes de la proteína recombinante para ser empleadas en su evaluación inmunoprotectora, el nivel de expresión alcanzado es uno de los aspectos más importantes. Anteriormente se han expresado formas recombinantes de la proteína ROP2 haciendo uso de otros sistemas de expresión, pero hasta ahora no se había alcanzado el nivel de expresión requerido (Van Gelder y col., 1993; Heri6n no publicados). Con las construcciones realizadas durante este proyecto se pudo obtener la expresión de la proteína recombinante ROP2 (sin péptido señal) en un nivel detectable en el análisis de lisados bacterianos por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con tinción con azul de Coomassie. En este análisis se puede estimar que la proteína recombinante puede alcanzar hasta el 1% de las proteínas totales de la bacteria; no obstante, con sistemas de expresión similares, otras proteínas recombinantes han podido alcanzar más del 50% de las proteínas totales (Tabor y Richardson, 1985; Studier y Molffatt, 1986). En base a estos datos, se puede decir que el nivel de expresión alcanzado aún no es el máximo, pero sí es el suficiente para intentar la purificación de la proteína. Muchas son las probables causas que limitan el nivel de expresión de una proteína recombinante tales como: la inestabilidad de plásmido recombinante, la inestabilidad del mRNA sintetizado, la terminación prematura de la transcripción o la inestabilidad de la proteína recombinante (Sambrook y col., 1989).

A pesar del nivel de expresión alcanzado usando los vectores pRSETA y pRSETAR, se observaron dos problemas principales que aún deben ser resueltos parcial o totalmente antes de la purificación: la degradación de la proteína recombinante ROP2 y la expresión constitutiva de esta proteína en la bacteria. Este último problema puede ser un factor que limita el nivel de expresión observado. Ambos problemas se discuten más adelante.

En experimentos de expresión de otras proteínas recombinantes, en donde se usaron sistemas de expresión basados en el promotor  $\phi$ -10 del fago T7 (plásmidos pET) semejantes al empleado por nosotros, se ha observado que también existe expresión constitutiva. En estos sistemas se emplearon bacterias *E. coli* (HMS174 o BL21) lisogenizadas con bacteriófago DE3 (derivado del fago  $\lambda$ ) en el cual la expresión de la T7 RNA polimerasa está bajo control del promotor lac (inducible con IPTG) (Studier y col., 1990). En este caso, la expresión constitutiva de la proteína recombinante fue explicada por la *síntesis de escape* de la T7 RNA polimerasa, característica de secuencias controladas por el promotor lac (Rawn, 1989). Sin embargo, se observó transcripción del inserto aún en bacterias transformadas con el vector, pero que no habían sido lisogenizadas con el fago portador de la información genética para la síntesis de la T7 RNA polimerasa (Studier y col., 1990). Este último resultado es comparable al encontrado en el presente trabajo.

La expresión constitutiva de la proteína recombinante (expresión de la proteína en ausencia de la T7 RNA polimerasa) sólo se puede explicar si la transcripción del inserto es realizada por la enzima RNA polimerasa de la bacteria *E. coli*<sup>1</sup>. Esta transcripción debe llevarse a cabo a partir de secuencias promotoras para esta enzima que estén presentes en el plásmido recombinante (descartando al promotor del gen *amp<sup>r</sup>*). Para apoyar esta hipótesis se buscaron probables secuencias promotoras para la polimerasa de *E. coli* en el plásmido recombinante. Para ello, la secuencia de nucleótidos del plásmido recombinante pRSETA Tg34/MH se sometió a un algoritmo de predicción de promotores para la RNA polimerasa de *E. coli* (Staden, 1984). En los resultados obtenidos se pudo identificar una secuencia localizada en la región de 916-860 pb (justo en la secuencia Col EI, origen de replicación del plásmido) que presenta cierta similitud con la secuencia consenso reconocida por el factor  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa de *E. coli* (ver cuadro 5.1); esta secuencia podría ser la responsable de la transcripción del

---

<sup>1</sup> La RNA polimerasa de *E. coli* está compuesta de 5 subunidades: 2 unidades  $\alpha$ , y las subunidades  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\sigma$ . La subunidad  $\sigma$  es la encargada de unirse específicamente a promotores de operadores o genes de *E. coli* y es responsable de la iniciación de la transcripción. Aunque existen otras subunidades,  $\sigma^{70}$  (70 kDa) es la principal subunidad presente en la RNA polimerasa y reconoce promotores con la siguientes características:

- en la posición +1, primer nucleótido que se transcribe, hay una purina.
- en la región -10 tiene la secuencia consenso TATAAT, conocida como caja TATA o Pribnow.
- en la región -35 la secuencia consenso es TTGACA
- ambas regiones están separadas por 17 $\pm$  1 nucleótidos.

**Cuadro 5.1.** Identificación de un probable promotor de la RNA polimerasa de *E. coli* en el plásmido pRSETA Tg34/M11

Promotor	región -35		región -10		+1				
916-860	ATCCTTT	TTGATA	ATCTCATGAC	CAAAAATCC	TAAACG	TGAGTTT	C	GTTCGAC	TGAG
trp	TGAGCTG	TTGACA	ATTAATCAT	GAACTAG	TAACT	AGTACGC	A	AGTTCAC	TAA
lac	CCGAGGC	TTTACA	CTTATGCTT	CCGCTCG	TATGTT	GGTGG	A	ATTGTGAG	CGG
trnA2	TAAATGc	TTGACT	CTGTAGC	GGGAAGGCG	TATTAT	GCACACC	C	CGCCCGC	TGA
consenso		<b>TTGACA</b>			<b>TATAAT</b>		<b>A</b>		

Se alineó la secuencia 916-860 del plásmido pRSETA Tg34/M11 con las secuencias de los promotores del operón de triptofano (trp), del operón de lactosa (lac) y del RNA ribosómico (trnA2) de *E. coli*. Se indica con negritas la secuencia consenso de los promotores de la RNA polimerasa de *E. coli*.

inserto que da lugar a la expresión constitutiva de la proteína recombinante.

Cuando la proteína recombinante es tóxica para la bacteria, su expresión constitutiva puede conllevar a la inestabilidad del plásmido y, por consecuencia, a un bajo nivel de expresión de la proteína recombinante. Esta toxicidad determina que el crecimiento de las bacterias con el plásmido sea muy lento, e incluso pueda existir un proceso de selección de aquellas bacterias que poseen el menor número de plásmidos. Este problema puede ser más grave cuando se presenta en sistemas con vectores que tienen el marcador de resistencia a ampicilina. En estos sistemas las bacterias que tienen menor número de plásmidos, o que lo han perdido, pueden crecer en el cultivo debido a la acumulación de la  $\beta$ -lactamasa que es secretada en el medio y degrada la ampicilina. La existencia de una proporción importante de bacterias que no poseen el plásmido limita el nivel de expresión de la proteína recombinante obtenido al momento de la inducción. Incluso se han desarrollado sistemas de expresión que tratan de minimizar este problema (Studier y col., 1990). No obstante, la presencia de promotores para la RNA polimerasa bacteriana, presentes en algunos vectores de expresión, pueden hacer que este problema sea infranqueable en algunos casos.

Uno de los principales problemas en los sistemas de expresión donde se emplean bacterias es la degradación de la proteína recombinante. En nuestro caso, la proteólisis es un problema aún más importante ya que interfiere con la purificación de la proteína recombinante. En efecto, los productos de degradación de la proteína recombinante compiten con la proteína entera por los sitios de unión de la columna de metal quelado durante la cromatografía; por ello esta degradación debe ser mínima.

Generalmente, la degradación se debe a que la proteína se encuentra en compartimentos celulares en la fuente original; estos compartimientos no existen en la bacteria lo que determina que la proteína sea sintetizada en un ambiente donde adquiere una conformación que no favorece su estabilidad. Se sabe que la etapa inicial de degradación de estas proteínas es realizada por proteasas bacterianas dependientes de ATP. Algunas de estas proteasas son: Lon, Clp, OmpT, DegP (Gottesman, 1990). En nuestro caso, la degradación de la proteína recombinante puede ser explicada debido a que, en *T. gondii*, la proteína ROP2 está asociada a las roptrias y al ser sintetizada en *E. coli* no adquiere una conformación estable y es degradada por las proteasas presentes en la cepa bacteriana empleada.

Para confirmar esta hipótesis y resolver este problema, se podrían emplear cepas bacterianas que tengan mutaciones que determinen deficiencias en enzimas proteolíticas. Por ejemplo, el uso de mutantes Lon<sup>-</sup> (principal proteasa de *E. coli* que es responsable de la degradación de proteínas inestables o anormales para la bacteria) en sistemas de expresión que emplean el vector  $\lambda$ gt11, ha aumentado la estabilidad de proteínas de fusión recombinantes que han sido expresadas (Gottesman, 1990). Estas cepas también se han empleado en sistemas de expresión basados en el uso de la T7 RNA polimerasa (*E. coli* cepa BL21) (Studier y col., 1990). Sin embargo, estas cepas forman colonias mucoides (lo que dificulta su aislamiento en medio sólido, su cosecha en cultivo líquido y su infección con fagos) y son más sensibles a daños en su DNA por agentes químicos y físicos. Además, se ve afectada la eficiencia de transformación y estabilidad de algunos plásmidos en la bacteria. Afortunadamente ya se dispone de cepas bacterianas con mutaciones complementarias que hacen mínimos estos problemas (Gottesman, 1990).

Para la transcripción de la información genética que codifica para proteínas inducidas por choque-térmico (entre ellas la proteasa Lon), *E. coli* hace uso de la subunidad  $\sigma^{32}$  de la RNA polimerasa; esta subunidad es codificada por el gen htpR. Bacterias con mutaciones en este gen son deficientes en proteólisis y también pueden ser usadas para aumentar la estabilidad de proteínas recombinantes. No obstante, la expresión de esta subunidad es importante para el crecimiento de la bacteria a temperatura de 37°C o mayor (Gottesman, 1990). En este sentido, una observación experimental importante, hecha durante experimentos previos de expresión de la proteína ROP2

desarrollados en el laboratorio, es la disminución en la proteólisis de la proteína recombinante cuando se crecen las bacterias y se realiza la inducción a menor temperatura (30°C).

Es importante que en un futuro inmediato sean optimizadas las condiciones de expresión de esta forma recombinante de ROP2 con el propósito de alcanzar un mayor nivel de expresión y/o una mínima degradación. Esto es un paso indispensable para disponer de esta proteína en forma pura y en cantidad suficiente para evaluar su actividad inmunoprotectora.

## CAPÍTULO VI

### REFERENCIAS

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson. 1989. Molecular organization of cells. Genetic mechanism. En: *Molecular Biology of the Cell*, 2nd ed. pp 201-271. Garland Publishing Inc. U.S.A.
- Alting-Mees, M. A., P. Vaillancourt and J. M. Short. 1993. Phagemids and other hybrid vectors. En: *Plasmids: a practical approach*. (Hardy K. G. ed.). 2nd ed. pp 195-223. IRL Press. U.S.A.
- Becerril, M. A. 1996. Localización de epitopos T del antígeno ROP2 de *Toxoplasma gondii*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina. UNAM.
- Beckers, J. M., J. F. Dubremetz, O. Meereau-Puijalon and K. A. Joiner. 1994. The *Toxoplasma gondii* ropthry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell. Biol.* 127 (4): 947-961.
- Canessa, A., V. Pistoia, S. Poncella, A. Merli, G. Melioli, A. Terragna and M. Ferrarini. 1988. An in vitro model for *Toxoplasma* infection in man. Interaction between CD4<sup>+</sup> monoclonal T cells and macrophages results in killing of trophozoites. *J. Immunol.* 140 (10): 3580-3588.
- Cesbron-Delauw, M. F., J. F. Dubremetz, J. Boothroyd and D. Sibley. 1993. Tentative list of *Toxoplasma gondii* genes cloned and characterized thus far. *Immunol. Res.* 144 (1): 77
- Denhardt, D. T., D. Dressler and D. S. Ray. 1978. The single stranded DNA phages. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S. A.
- Dubey, J. P. 1993. *Toxoplasma*, Neospora, Sarcocystis and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. En: *Parasite Protozoa*. Vol. 6. (J. P. Kreier, ed.). 2nd. ed. pp 1-57. Academic Press. London.
- Dunn, J. J. and W. F. Studier. 1983. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and location of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* 166: 477-535.
- Evans, R. 1992. Life cycle and animal infection. En: *Human Toxoplasmosis*. (D. Ho Yen and A. W. L. Joss, eds.). pp 26-55. Oxford Medical Publications. U.S.A.
- Gazzinelli, R. T., F. T. Hakim, S. Hieny, G. M. Shearer and A. Sher. 1991. Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in INF- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 146 (1): 286-292.

- Gazzinelli, R. T., M. Wyszocja, S. Hayashi, E. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri and A. Sher. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153: 2533-2543.
- Gottesman, S. 1990. Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: Genetic solutions. En: *Methods in enzymology*. Vol 185. pp 61-89. Academic Press Inc. U.S.A.
- Hakim, F. T., R. T. Gazzinelli, E. Denkers, S. Hieny, G. M. Shearer and A. Sher. 1991. CD8<sup>+</sup> cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J. Immunol.* 147 (7): 2310-2316.
- Hérion, P., R. Hernández Pando, J. F. Dubremetz and R. Saavedra. 1993. Subcellular localization of the 54-kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 79 (2): 216-222.
- Hausmann, R. 1988. The T7 Group. En: *The Bacteriophages*. (R. Candelar, ed.). Vol 1. pp 259-262. Plenum Press. University of California Berkeley. U.S.A.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. 1990. Boletín epidemiológico anual. Coordinación General de Comunicación Social del IMSS.
- Jackson, M. H. and W. M. Hitchison. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 53-103.
- Kasper, L. H. and J. C. Boothroyd. 1993. *Toxoplasma gondii* and Toxoplasmosis. En: *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. (K. S. Warren, ed.). pp 269-301. Blackwell Scientific Publications. U.S.A.
- Kasper, L. H. and J. R. Mineo. 1991. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*. 10 (5): 184-188.
- Lerliche, A. M. and J. F. Dubremetz. 1991. Characterization of the protein contents of rophtries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 249-260.
- McLeod, R., D. Mack and C. Brown. 1991. *Toxoplasma gondii* - New advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* 72: 109-121.
- Model, P. and M. Russel. 1988. Filamentous Bacteriophages. En: *The Bacteriophages*. (R. Candelar, ed.). Vol 2. pp 240-305. Plenum Press. University of California Berkeley. U.S.A.
- Morris, C. E., N. J. McGraw, K. Jolo, J. E. Brown, J. F. Klement, M. L. Ling and W. T. McAllister. 1987. Mechanism of promoter recognition by the bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases. En: *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*. (W. S. Reznikoff, ed.). pp 47-57. Elsevier Science Publishing Co. U.S.A.

- Murray, H. W. and Z. A. Cohn. 1979. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 150: 938-949.
- Pfefferkorn, E. R., M. Eckel and S. Rehman. 1986. Interferon- $\gamma$  suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for thryptophan. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 215-224.
- Rawns, D. J. 1989. *Bioquímica*. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Saavedra, R., F. De Meuter, J. L. Decourt and P. Héron. 1991. Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 147 (6): 1975-1982.
- Sadak, A., Z. Taghy, B. Fortier and J. F. Dubremetz. 1988. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 203-211.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 1, 2, 3. 2nd ed. Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
- Singer, M. and P. Berg. 1991. *Genes and Genomes: a changing perspective*. Blackwell Scientific Publications. U.S.A.
- Staden, R. 1984. Computer methods to locate signals in nucleic acid sequences. *Nucl. Ac. Res.* 12 (1): 505-519.
- Studier, W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *En: Methods in enzymology*. Vol. 185. pp 61-89. Academic Press Inc. U.S.A.
- Studier, W. and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Sutcliffe, J. G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (8): 3737-3741.
- Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber and J. S. Remington. 1988. Interferon- $\gamma$ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*. 240: 516-518.
- Tabor, S. and C. C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 1074-1078.
- Van Gelder, P., F. Bosman, F. De Meuter, H. Van Heuverswyn and P. Héron. 1993. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 31 (1): 9-15.

Velasco, O., S. Galindo, A. M. Sedano, F. González. 1992. Toxoplasmosis. Publicación técnica No. 14. INDRÉ. Secretaría de Salud. México.

Wong, S. Y. and I. S. Remington. 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS. 7 (3): 299-316.

## APÉNDICE

### CÓDIGO GENÉTICO

Abreviatura anterior	Abreviatura estándar	Codones de ARN escritos con el extremo 5' a la izquierda
Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Asn	N	AAU AAC
Asp	D	GAC GAU
Cys	C	UGC UGU
Gln	E	CAA CAG
Glu	Q	GAA GAG
Gly	G	GGU GGC GGA GGG
His	H	CAC CAU
Ile	I	AUA AUC AUU
Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Lys	K	AAA AAG
Met	M	AUG
Phe	F	UUC UUU
Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Trp	W	UGG
Tyr	Y	UAC UAU
Val	V	GUA GUC GUG GUU
STOP	(fin de traducción)	UAA UAG UGA

### NUCLEÓTIDOS

Abreviatura	Nucleótido
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
N	Adenina, Citocina, Guanina o Timina
R	Guanina o Adenina
Y	Citosina o Timina