



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Expresión Heteróloga de la Cisteína Proteinasa de Tipo Legumaina
TvLEGU-1 de *Trichomonas vaginalis* Enzimáticamente Activa”**

T E S I S

Que presenta

GERARDO RESÉNDIZ CARDIEL

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis:

Dr. JAIME ORTEGA LÓPEZ

Ciudad de México

Mayo, 2017

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 23 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de Dr. Jaime Ortega López y en conjunto con la Dra. Rossana Arroyo Verástegui este trabajo fue apoyado por los donativos de CONACYT con números 128694 (JOL) y 161223, 15093, y Finnova 237937 (RAV).

Becario del CONACYT No. 172909

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por el apoyo otorgado para efectuar mis estudios de Doctorado. Becario de CONACyT No. de registro 172909.

Asesores de la Tesis:

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Dr. Rodolfo Marsch Moreno

Dra. Rossana Arroyo Verástegui

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

Con amor y cariño a mi amada esposa **Liliana Flórez Miranda** y a mi hijo **Gerardo Reséndiz Flórez**. Gracias por su apoyo, amor y comprensión durante esta etapa de mi vida.

Con amor y cariño a mis padres **Gerardo Reséndiz Rico** y **Guadalupe Cardiel Zavala**, gracias por su amor y apoyo incondicional, por estar conmigo siempre a pesar de la distancia, por sus enseñanzas, por ser ejemplo de amor, esfuerzo y sacrificio que demostraron para sacarme adelante.

A mi hermana **Priscila** con mucho amor y cariño, así como a su amada familia.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor **Dr. Jaime Ortega López**, por su apoyo y paciencia en la realización de este proyecto. Por su apoyo incondicional para culminar este proyecto. Gracias por ayudarme a crecer como persona y como estudiante.

A mi asesora **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, por su apoyo en la realización de este proyecto, por sus observaciones y sugerencias para enriquecer este trabajo.

A la **M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta** por su asistencia técnica en la realización de este trabajo.

A la **Q.F.B Leticia Ávila González** por su asistencia técnica en la realización de este trabajo, por su ayuda y disposición incondicional en algunos de los experimentos con anticuerpos.

A **Silvia Zúñiga Trejo** por su asistencia secretarial en la realización de este trabajo.

A **María Eugenia Zúñiga Trejo** por su asistencia técnica en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Rosa Elena Cárdenas Guerra** por su amistad y su apoyo en algunos de los experimentos del laboratorio.

A la **Dra. Berenice Calderón Pérez** por su amistad y por su apoyo en los experimentos del laboratorio.

A **Víctor Hugo Rosales García** (Unidad de Citometría de Flujo, CINVESTAV) por su valiosa ayuda en la obtención y análisis de datos de citometría de flujo.

A mi amigo **Luis Enrique Florencio** por su amistad y su apoyo en algunos de los experimentos del laboratorio.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: **Olga, Aurora, Octavio, Fernanda, Yosehandy,** y **Viridiana**, por su amistad y por su apoyo en la realización de este proyecto.

Y como olvidar a mis compañeros y amigos del Departamento de Biotecnología: **Diego, Jorge, Valentín, Roberto, Josué, Miguel, Aleja, Angélica, Jesús Vega, Juan** y **Alexis** por los agradables momentos.

ÍNDICE

RESUMEN	23
ABSTRACT	24
INTRODUCCIÓN	25
Descripción general de las proteinasas	25
Clasificación de las proteinasas	25
Cisteína proteinasas (CPs)	27
Mecanismo de acción de las cisteína proteinasas	28
Familia C13 de las CPs	32
Asparaginil endopeptidasas	32
Arquitectura de las legumaínas.....	33
Estructura tridimensional de la legumaína.....	34
Activación de la legumaína.....	37
Sintomatología de la tricomonosis	39
Epidemiología de la tricomonosis	40
Complicaciones asociadas a la tricomonosis	40
Diagnóstico de la tricomonosis	41
Presentación clínica	41
Microscopía y técnicas de cultivo.....	41
Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.....	42
Técnicas basadas en anticuerpos.....	42
Tratamiento de la tricomonosis	43
Antecedentes directos	44
<i>Trichomonas vaginalis</i>	44
Morfología de <i>T. vaginalis</i>	45
Proteasas de <i>T. vaginalis</i>	46
CPs de la región de 30 kDa (CP30)	47
Asparaginil endopeptidasa TvLEGU-1 de <i>T. vaginalis</i>	50
JUSTIFICACIÓN	55
HIPÓTESIS	56

OBJETIVOS.....	57
General.....	57
Específicos.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
Herramientas bioinformáticas utilizadas durante el análisis <i>in silico</i> de la secuencia de la TvLEGU-1 de <i>T. vaginalis</i>.....	59
Microorganismos, medios y condiciones de cultivo	60
Vector de expresión pET-21b (+)	61
Vector pREP-4	63
Vector de expresión pGEX-6P-1	64
Vector de expresión pPROEX-HTb.....	66
Vector de expresión pPCri-1b	68
Vector de expresión pPICZαB para el sistema de <i>P. pastoris</i>.....	70
Vector de expresión pPICZB para el sistema de <i>P. pastoris</i>	73
Síntesis del gen <i>tvlegu-1</i> con el uso de codones preferenciales para los sistemas de expresión de <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i>.	74
Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	74
Preparación de células calcio-competentes.....	75
Transformación de células calcio-competentes de <i>E. coli</i>	75
Análisis del DNA en gel de agarosa.....	75
Digestiones con enzimas de restricción	76
Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	76
Ligación de los fragmentos de DNA.....	76
Selección de clonas transformantes para confirmar la presencia de la construcción de interés.....	77
Condiciones de PCR para la amplificación del gen <i>tvlegu-1</i> para su subclonación en diferentes vectores de expresión	77
Análisis de proteínas por SDS-PAGE.....	78
Ensayo de Western blot de la TvLEGU-1 recombinante.....	78
Obtención de las diferentes construcciones para expresar la TvLEGU-1 en <i>E. coli</i>	79
Subclonación del gen nativo <i>tvlegu-1</i> en el vector de expresión pET-21b (+).....	79

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>tvlegu-1</i> para su subclonación en los vectores de expresión pGEX-6P-1 y pPROEX-HTb	80
Subclonación del fragmento de DNA del gen <i>tvlegu-1</i> en los vectores de expresión pGEX-6P-1 y pPROEX-HTb.....	81
Subclonación del gen <i>tvlegu-1-opt-e. coli</i> optimizado en el vector de expresión pCri-1b (+).....	81
Análisis de la solubilidad de la TvLEGU-1 y condiciones para purificación por afinidad a níquel a partir de la fracción soluble	84
Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>tvlegu-1</i> para su subclonación en los diferentes vectores de expresión para <i>P. pastoris</i>	84
Oligonucleótidos para amplificar el gen <i>tvlegu-1</i> para su subclonación en el vector pPICZ α B	84
Oligonucleótidos para la amplificación fragmento de DNA codificante para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70.....	85
Oligonucleótidos para amplificar el gen <i>tvlegu-1-opt</i> que codifica para la TvLEGU-1 para su expresión de manera intracelular en <i>P. pastoris</i>	86
Obtención de las diferentes construcciones para expresar la proteína TvLEGU-1 en el sistema de <i>P. pastoris</i>	90
Subclonación del gen nativo <i>tvlegu-1</i> en el vector de expresión pPICZ α B	90
Subclonación del gen nativo <i>tvlegu-1</i> en el vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70	90
Subclonación del gen <i>tvlegu-1-opt</i> en el vector de expresión intracelular pPICZB	91
Transformación de la levadura <i>P. pastoris</i> X-33 con cada una de las distintas construcciones para la expresión de la TvLEGU-1 recombinante	92
Amplificación por PCR para analizar la integración del cassette de expresión en el DNA genómico de las levaduras transformantes	92
Evaluación de la resistencia a zeocina de las transformantes de <i>P. pastoris</i>	93
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en las transformantes <i>P. pastoris</i> X-33 pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i> y <i>P. pastoris</i> X-33 pPICZB-MAT α : Δ 57-70- <i>tvlegu-1</i>	93
Inducción de la expresión de TvLEGU-1 en <i>P. pastoris</i> a escala de 2L utilizando la transformante <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	93

Diseño de Oligonucleótidos que codifican para distintos péptidos señal de secreción en <i>P. pastoris</i>	95
Clonación del gen <i>tvlegu-1-opt</i> en los plásmidos de expresión que contienen un péptido señal diferente para su expresión y secreción en <i>P. pastoris</i>	98
Ensayos de inducción de la expresión y secreción de la TvLEGU-1 a pequeña escala con las clonas de <i>P. pastoris</i> X-33 transformadas con los distintos cassettes de expresión ...	99
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en sobrenadantes por un ensayo tipo “Dot-blot”	100
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en las transformantes <i>P. pastoris</i> X-33 pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i>	100
Correlación entre la densidad óptica a 600 nm y el peso seco	101
Determinación del peso seco para las clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> durante las cinéticas de crecimiento.....	101
Lisis mecánica de levaduras	101
Determinación del número de copias del gen <i>tvlegu-1-opt</i> usando PCR digital de gota “Droplet digital PCR (ddPCR)”	102
Determinación de la viabilidad celular por un análisis de citometría de flujo	103
Medición de la actividad proteolítica de legumina en los sobrenadantes y su validación por especificidad de sustrato.....	104
RESULTADOS	105
Análisis de la secuencia de la cisteína proteinasa tipo legumina TvLEGU-1 de <i>Trichomonas vaginalis</i>.....	105
Modelo 3D de la TvLEGU-1 de <i>T. vaginalis</i>	111
Expresión de la TvLEGU-1 en <i>E. coli</i>	116
Expresión de la TvLEGU-1 en <i>E. coli</i> usando el vector pET-21b (+).....	116
Expresión de la TvLEGU-1 en <i>E. coli</i> usando el vector pGEX-6P-1.....	121
Expresión de la TvLEGU-1 en <i>E. coli</i> usando el vector pPROEX-HTb.....	129
Expresión de la TvLEGU-1 en <i>E. coli</i> usando el vector pCri-1b	133
Sumario de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en el sistema de <i>E. coli</i>	137
Expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de expresión de <i>P. pastoris</i>	139
Subclonación del gen nativo <i>tvlegu-1</i> en el vector de expresión pPICZ α B	139

Secuenciación del DNA plasmídico de la construcción pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	142
Transformación de la levadura <i>P. pastoris</i> X-33 con la construcción pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	142
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en la transformante <i>P. pastoris</i> X-33- pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	144
Ensayo tipo “Western blot” para confirmar la presencia de la TvLEGU-1 en el sobrenadante de <i>P. pastoris</i> X-33 pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	144
Inducción de la expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de <i>P. pastoris</i> a escala de 2L	146
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en <i>P. pastoris</i> a escala de 2L	149
Obtención del vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70 para el sistema de <i>P.</i> <i>pastoris</i>	152
Subclonación del gen nativo <i>tvlegu-1</i> en el vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70	155
Expresión de la TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 en <i>P.</i> <i>pastoris</i>	156
Ensayo de “Western blot” para confirmar la presencia de la TvLEGU-1 en el sobrenadante de <i>P. pastoris</i> X-33 pPICZB-MAT α : Δ 57-70- <i>tvlegu-1</i>	157
Optimización del gen <i>tvlegu-1</i> de <i>T. vaginalis</i> de acuerdo con el uso de codones preferenciales de <i>P. pastoris</i>	161
Recuperación del vector pUC57- <i>tvlegu-1-opt</i>	162
Clonación del gen <i>tvlegu-1-opt</i> que codifica para la TvLEGU-1 para su expresión de manera intracelular en <i>P. pastoris</i>	163
Transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 con la construcción pPICZB- <i>tvlegu-1-opt</i>	165
Análisis de la expresión intracelular de la TvLEGU-1 en el sistema de <i>P. pastoris</i>	165
Diseño de Oligonucleótidos que codifican para distintos péptidos señal	168
Clonación del gen <i>tvlegu-1-opt</i> optimizado en los plásmidos de expresión que contienen una secuencia señal diferente para su expresión y secreción en <i>P. pastoris</i>	172
Transformación de la cepa X-33 de <i>P. pastoris</i> con las construcciones pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> , pPICZB-GA- <i>tvlegu-1-opt</i> , pPICZB-IN- <i>tvlegu-1-opt</i> , pPICZB-IV- <i>tvlegu-1-</i> <i>opt</i> , pPICZB-KP- <i>tvlegu-1-opt</i> , pPICZB-LZ- <i>tvlegu-1-opt</i> y pPICZB-SA- <i>tvlegu-1-opt</i> ..	176

Verificación de la integración de los distintos cassettes de expresión al DNA genómico de la levadura por ensayos de PCR.....	176
Ensayos de inducción de la expresión de la TvLEGU-1 a pequeña escala con las clonas de <i>P. pastoris</i> X-33 transformadas con los distintos cassettes de expresión	178
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en sobrenadantes por un ensayo de “Dot-blot”	178
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en sobrenadantes por electroforesis (SDS-PAGE) y WB	181
Análisis de PCR, evaluación de la resistencia a Zeocina y determinación del número de copias del gen <i>tvlegu-1-opt</i> de las clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 con la construcción pPICZ-AA- <i>tvlegu-1-opt</i>	183
Evaluación de la viabilidad de <i>P. pastoris</i>	187
Cinéticas de crecimiento a 30° C de las clonas recombinantes de <i>P. pastoris</i> X-33 que contienen el cassette de expresión pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i>	190
Efecto de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en la viabilidad de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1</i> bajo condiciones de crecimiento estándar (30° C)	190
Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante a 30° C como función del número de copias del gen <i>tvlegu-1</i>	196
Efecto de baja temperatura (16 °C) en el crecimiento y viabilidad en las clonas recombinantes de <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> durante la expresión de la TvLEGU-1 recombinante	199
Actividad de legumina en los sobrenadantes de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i>	209
Comparación de los niveles de actividad específica de legumina de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> a 30 °C y 16 °C	210
DISCUSIÓN	213
CONCLUSIÓN	220
PERSPECTIVAS	221
APÉNDICES	222

BIBLIOGRAFÍA 253

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las cisteína proteinasas de parásitos	28
Figura 2. Sitio activo de proteinasas	29
Figura 3. Mecanismo de acción de las CPs	31
Figura 4. Arquitectura de los dominios de la legumaína de humano	35
Figura 5. Activación de la legumaína de humano	38
Figura 6. Morfología ovoide y ameboide de <i>T. vaginalis</i>	46
Figura 7. Efecto de los inhibidores de CPs sobre la actividad proteolítica de las proteínasas presentes en la región de 30 kDa de <i>T. vaginalis</i>	48
Figura 8. Identificación de las manchas de proteinasas en los extractos resistentes a proteasas de <i>T. vaginalis</i> por espectrometría de masas y ensayos de Western blot en 2D con sueros de pacientes con tricomoniasis	53
Figura 9. Estrategía experimental	58
Figura 10. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pET-21b (+)	62
Figura 11. Mapa de restricción del plásmido pREP-4	63
Figura 12. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pGEX-6P-1	65
Figura 13. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pPROEX-HTb.....	67
Figura 14. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pCri-1b	69
Figura 15. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pPICZ α B	71
Figura 16. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pPICZB	73
Figura 17. Secuencia de DNA que codifica para los péptidos señal α -MF y MAT $\alpha\Delta$ 57-70 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88
Figura 18. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la TvLEGU-1 (AAQ93039.1) con algunas legumaínas reportadas	109
Figura 19. Modelos de la estructura 3D de las proteinasas tipo legumaína de humano y de <i>T.</i> <i>vaginalis</i>	112
Figura 20. Topología estructural de la cisteína proteinasa tipo legumaína	114
Figura 21. Análisis de restricción del DNA plasmídico de la construcción pET-21b.....	117
Figura 22. Expresión de la TvLEGU-1 en la cepa <i>E. coli</i> C41 (DE3)/pREP-4 usando la construcción pET-21b(+)- <i>tvlegu-1</i>	119

Figura 23. Subclonación del gen <i>tvlegu-1</i> completo en el vector de expresión pGEX-6P-1 .	123
Figura 24. Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en cepa de <i>E. coli</i> <i>BL21(DE3)</i> transformada con la construcción pGEX-6P-1- <i>tvlegu-1</i>	127
Figura 25. Análisis de restricción del DNA plasmídico de una de las clonas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con la construcción pPROEX-HTb- <i>tvlegu-1</i>	130
Figura 26. Expresión de la TvLEGU-1 en la cepa <i>E. coli</i> SHuffle Express usando la construcción pPROEX-HTb- <i>tvlegu-1</i>	132
Figura 27. Análisis de restricción del DNA plasmídico de las clonas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con la construcción pCri-1b- <i>tvlegu-1-opt-e. coli</i>	134
Figura 28. Expresión de la TvLEGU-1 en la cepa <i>E. coli</i> SHuffle Express T7 lysS usando la construcción pCri-1b- <i>tvlegu-1-opt-e. coli</i>	136
Figura 29. Amplificación por PCR del gen <i>tvlegu-1</i>	140
Figura 30. Análisis de restricción del DNA plasmídico de las clonas de DH5 α transformadas con la construcción pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	141
Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa del análisis de PCR de <i>P. pastoris</i> X-33 transformada con la construcción pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	143
Figura 32. Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en la transformante <i>P. pastoris</i> X-33- pPICZ α B- <i>tvlegu-1</i>	146
Figura 33. Perfil de agitación y oxígeno disuelto durante la inducción de la expresión de la TvLEGU -1 en <i>P. pastoris</i> a una escala de 2L	148
Figura 34. Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en <i>P. pastoris</i> a escala de 2L.....	150
Figura 35. Análisis de restricción del DNA plasmídico de los vectores de expresión pPICZ α B y pPICZB-MAT α : Δ 57-70	154
Figura 36. Análisis de restricción del DNA plasmídico de la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70 - <i>tvlegu-1</i>	156
Figura 37. Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 en <i>P. pastoris</i>	159
Figura 38. Análisis de restricción de la construcción pUC57- <i>tvlegu-1-opt</i> para confirmar la presencia del gen <i>tvlegu-1-opt</i>	163
Figura 39. Análisis de restricción de la construcción pPICZB- <i>tvlegu-1-opt</i> para confirmar la presencia del gen <i>tvlegu-1-opt</i>	164

Figura 40. Análisis de la expresión intracelular de la TvLEGU-1 en el sistema de <i>P. pastoris</i>	166
Figura 41. Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> y pPICZB- GA- <i>tvlegu-1-opt</i> para confirmar la presencia del gen <i>tvlegu-1-opt</i>	173
Figura 42. Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-IN- <i>tvlegu-1-opt</i> y pPICZB- IV- <i>tvlegu-1-opt</i> para confirmar la presencia del gen <i>tvlegu-1-opt</i>	174
Figura 43. Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-SA- <i>tvlegu-1-opt</i> y pPICZB- LZ- <i>tvlegu-1-opt</i> para confirmar la presencia del gen <i>tvlegu-1-opt</i>	175
Figura 44. Análisis de PCR de <i>P. pastoris</i> X-33 transformada con los distintos cassettes de expresión	177
Figura 45. Ensayo Dot-blot utilizando los sobrenadantes de los cultivos inducidos con metanol	179
Figura 46. Perfil protéico y WB de los sobrenadantes de las clonas con diferentes péptidos señal	182
Figura 47. Análisis de PCR, resistencia a Zeocina y determinación del número de copias de las clonas seleccionadas de <i>P. pastoris</i> X-33 transformadas con la construcción pPICZB- AA- <i>tvlegu-1-opt</i>	185
Figura 48. Análisis de citometría de flujo para evaluar la viabilidad de las transformantes <i>P.</i> <i>pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> teñidas con ioduro de propidio (IP).....	188
Figura 49. Crecimiento y viabilidad de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB- AA- <i>tvlegu-1-opt</i> inducidas a 30 °C	192
Figura 50. Propiedades de dispersión de luz (Light scattering) de las células de los cultivos de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> inducidas a 30 °C	194
Figura 51. Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en los cultivos de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> inducidas a 30 °C.....	197
Figura 52. Crecimiento y viabilidad de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB- AA- <i>tvlegu-1-opt</i> inducidas a 16 °C	201
Figura 53. Análisis de citometría de flujo para evaluar la viabilidad de las transformantes <i>P.</i> <i>pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1-opt</i> teñidas con ioduro de propidio.....	203

Figura 54. Propiedades de dispersión de luz (Light scattering) de las células de los cultivos de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1</i> -opt inducidas a 16 °C	205
Figura 55. Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en los cultivos de las clonas recombinantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1</i> -opt inducidas a 16 °C...	207
Figura 56. Análisis de la actividad de legumina de los cultivos de las clonas transformantes <i>P. pastoris</i> X-33-pPICZB-AA- <i>tvlegu-1</i> -opt durante la inducción con metanol	211

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos sintetizados para la amplificación del gen <i>tvlegu-1</i> para su subclonación en los vectores de expresión pGEX-6P-1 y pPROEX-HTb.	80
Tabla 2. Condiciones de expresión específicas que se utilizaron para la expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de expresión de <i>E. coli</i> cuando se utilizaron las construcciones <i>tvlegu-1-pET-21b (+)</i> , <i>tvlegu-1-pGEX-6P-1</i> , <i>tvlegu-1-pPROEX-HTb</i> y <i>tvlegu-1-opt-e. coli-pCri 1b</i>	83
Tabla 5. Condiciones de alineamiento de los oligonucleótidos complementarios 5´fosforilados en el termociclador.....	98
Tabla 6. Oligonucleótidos sintetizados para la amplificar el gen <i>tvlegu-1-opt</i> para su expresión y secreción en <i>P. pastoris</i> utilizando los diferentes péptidos señal de secreción.	99
Tabla 7. Oligonucleótidos y sondas usadas para el ensayo de PCR digital de gota (ddPCR). 103	
Tabla 9. Resultados de la expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de expresión bacteriano de <i>E. coli</i> utilizando diferentes construcciones y cepas de expresión	138
Tabla 10. Se presentan algunos de los parámetros que se controlaron durante la inducción de la expresión de la TvLEGU -1 en el sistema de expresión de <i>P. pastoris</i> a una escala de 2L	147
Tabla 11. Secuencias señal comúnmente utilizadas para la expresión y secreción de las proteasas recombinantes en el sistema de expresión de <i>P. pastoris</i>	170
Tabla 12. Descripción breve de los vectores de expresión para el sistema <i>P. pastoris</i> , que contienen la secuencia que codifica para los distintos péptidos señal	171

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AA	Alfa Amilasa
AEP	Asparaginil Endopeptidasa
AOX1	Alcohol Oxidasa 1
APE-RR	Aza-Péptido Epóxido (Cbz-Ala-Ala-AAsn-RR-EP COOEt), RR[(N ₂ -(N-Benziloxicabonil Alanilalanil)-N1-Carbamoilmetil hidrazinocarbonil Oxirano-2-Ácido Carboxílico Etil Ester)]
APE-SS	Aza-Péptido Epóxido (Cbz-Ala-Ala-AAsn-RR-EP COOEt), SS[(N ₂ -(N-Benziloxicabonil Alanilalanil)-N1-Carbamoilmetil hidrazinocarbonil Oxirano-2-Ácido Carboxílico Etil Ester)].
αMF	(“Alpha Mating Factor”) Factor Alfa de Apareamiento
BMGY	(“Buffered Glycerol Complex Medium”) Medio Complejo Amortiguado con Glicerol como Fuente de Carbono
cDNA	(“Complementary DNA”) DNA Complementario
CI_s	Cuerpos de Inclusión
CNCD	Centro Nacional de la Clínica de Displacias del Hospital General de México
CP30	Cisteína Proteinasa de 30 kDa
CPs	Cisteína Proteinasa
°C	Grados Celsius
2D	Dos Dimensiones
3D	Tres Dimensiones
DCW	(“Dry Cell Weight”) Peso Celular Seco
ddPCR	(“Droplet digital PCR”) PCR digital de got
DMSO	(“Dimethylsulfoxide”) Dimetilsulfoxido
EDTA	(“Ethylenediaminetetraacetic Acid”) Ácido Etilendiaminotetraacético
E64	<i>Trans</i> -Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane, <i>L-trans</i> -3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, N-(<i>trans</i> -Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamid
ETS	Enfermedad de Transmisión Sexual

FSC	(“Forward-Scatter”) Dispersión Frontal
GA	Glucoamilasa
GPI	(“Glycosylphosphatidyl Inositol”) Glicosil Fosfatidil Inositol
GST	(“Glutation S-Transferase”) Glutación S-Transferasa
HeLa	(“Henrieta Lacks”) Línea Celular de Cáncer Cervical Humano
IN	Inulinasa
IP	Ioduro de Propidio
IV	Invertasa
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
KP	Proteína Killer
LB	(“Luria Bertani”) Luria Bertani
Leup	Leupeptín
LZ	Lisozima
MBP	(“Maltose Binding Protein”) Proteína de Unión a Maltosa
NAAT	(“Highly Sensitive Specific Nucleic Acid Amplifications Tests”) Pruebas de Amplificación de Ácidos Nucleicos Altamente Sensibles
NC	Nitrocelulosa
PBS	(“Phosphate-Buffered-Saline”) Amortiguador Salino de Fosfatos
pI	Punto Isoeléctrico
PCR	(“Polymerase Chain Reaction”) Reacción en Cadena de la Polimerasa
RE	Retículo Endoplasmático
SA	Albumina de Suero
SDS-PAGE	(“Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”) Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-Dodecilsulfato de Sodio
SSC	(“Side-Scatter”) Dispersión Lateral
TAM	(“Transcription-Mediated Amplification”) Amplificación Mediada por Transcripción
TLCK	(“ <i>p</i> -Tosyl-L-Lysine Chloromethylketone”)
TvLEGU-1	Cisteína proteinasa tipo legumaína-1 de <i>Trichomonas vaginalis</i>
tvlegu-1	Gen de la cisteína proteinasa tipo legumaína-1 de <i>Trichomonas vaginalis</i>

tvlegu-1-opt Gen de la cisteína proteinasa tipo legumafina-1 de *Trichomonas vaginalis* optimizado con el uso de codones

YNB (“Yeast Nitrogen Base”) Base Nitrogenada para Levadura

YPD (“Yeast Extract-Petpone-Dextrose”) Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa

RESUMEN

La cisteína proteinasa tipo legumaína, TvLEGU-1, de *Trichomonas vaginalis* juega un papel importante en la citoadherencia. Sin embargo, su caracterización estructura-función ha estado limitada por la falta de una plataforma de expresión recombinante capaz de producir esta proteína plegada en su conformación nativa. En este trabajo, hemos explorado las condiciones de la expresión recombinante de la TvLEGU-1 utilizando las plataformas de expresión de *Escherichia coli* y de *Pichia pastoris*. Sin embargo, todos los esfuerzos para obtener esta proteína en su conformación nativa y activa utilizando diferentes vectores y cepas de *E. coli* fueron fallidos y en todos los casos la TvLEGU-1 se expresó como cuerpos de inclusión (CIs). El sistema de expresión de *P. pastoris* se ha convertido en una herramienta importante, particularmente para la producción heteróloga de proteínas. Esta levadura metilótrofa tiene muchas ventajas, incluyendo el promotor fuerte y altamente regulado de la alcohol oxidasa de metanol *AOX1*, además de ser una célula capaz de realizar modificaciones postraduccionales y crecer a alta densidad celular y en amplio intervalo de valores de pH y temperatura. En este trabajo describimos la expresión del gen *tvlegu-1* nativo y optimizado con el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* bajo el promotor inducible *AOX1* en la cepa X-33 (Mut+). Adicionalmente, el gen *tvlegu-1*-optimizado (*tvlegu-1-opt*) se fusionó a diferentes péptidos señal. La TvLEGU-1 recombinante se secretó en el medio cuando el gen *tvlegu-1-opt* se fusionó al péptido señal de la alfa-amilasa (AA) de *Aspergillus niger*. Mientras que cinco transformantes positivas, con diferente número de copias del gen *tvlegu-1-opt* mostraron actividad de legumaína en el medio. Cuando la inducción se realizó a 16 °C y 30 °C, la actividad de legumaína fue menor en las clonas de *P. pastoris* con un número de copias mayor a dos. De hecho, se observó lisis celular en las clonas con 26 y 29 copias del gen cuando se indujo la expresión de TvLEGU-1 a 30 °C. Estos resultados sugieren que para obtener la TvLEGU-1 en su conformación nativa en el sobrenadante de cultivo, parámetros como el número de copias del gen y la temperatura de inducción deben ser considerados. Nuestros resultados contribuyen a explorar la expresión heteróloga de la TvLEGU-1 enzimáticamente activa correctamente procesada y que es un biomarcador potencial para la inmunodetección de la tricomonosis.

ABSTRACT

The legumain-like cysteine proteinase TvLEGU-1 from *Trichomonas vaginalis* plays a major role in trichomonal cytoadherence. However, its structure-function characterization has been limited by the lack of a reliable recombinant expression platform to produce this protein in its native folded conformation. In this work, we explored different conditions for the TvLEGU-1 recombinant expression using both the *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* platforms. However, all the efforts to obtain this protein in its native and active conformation using different vectors and *E. coli* strains have failed. In all cases, the TvLEGU-1 was expressed as inclusion bodies (IBs). The *P. pastoris* expression system has become an important tool, particularly for heterologous protein production. This methylotrophic yeast has many advantages, including a tightly controlled and strong methanol alcohol oxidase (*AOX1*) promoter, a cell capable of post-translational processes, and the ability to grow in high cell density and a broad range of pH values and temperatures. In here, we describe the expression both the native and synthetic codon-optimized *tvlegu-1* genes in *P. pastoris* strain X-33 (Mut+) under the inducible *AOX1* promoter. Additionally, the codon-optimized *tvlegu-1* gene was fused to different signal peptides. The TvLEGU-1 recombinant protein was secreted into the medium when the codon-optimized *tvlegu-1* gene was fused to the *Aspergillus niger* alpha-amylase (AA) signal peptide. While five positive transformants, with different copy numbers of the *tvlegu-1-opt* gene, showed legumain activity in the medium when the induction was carried at 16 °C and 30 °C, the legumain activity was lower in *P. pastoris* clones with a gene copy number greater than two. Indeed, cell lysis was observed in clones with 26 or 29 gene copies when the TvLEGU-1 expression was induced at 30 °C. These results suggest that to get an active conformation as in TvLEGU-1, parameters such as gene copy number and induction temperature should be considered. Our results contribute to exploring the heterologous expression of the correctly processed enzymatically active rTvLEGU-1 protein, which is a potential biomarker for trichomonosis immunodetection.

INTRODUCCIÓN

Descripción general de las proteinasas

Las proteinasas (péptido hidrolasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces internos (enlace peptídico) que unen a los aminoácidos en las proteínas (proteólisis). Estas enzimas han sido foco de estudio por más de 100 años (Levene 1905). Actualmente se sabe que funcionan como mediadores de una multitud de procesos celulares, regulan el destino, la localización y la actividad de muchas proteínas; modulan las interacciones proteína-proteína, crean nuevas moléculas bioactivas, contribuyen al procesamiento de información celular, así como en la generación y transducción de señales moleculares. Como resultado directo de estas acciones, las proteinasas influyen en procesos como la replicación y transcripción del DNA, proliferación y diferenciación celular, morfogénesis y remodelación de tejidos, respuesta al mal plegamiento de proteínas, angiogénesis, neurogénesis, ovulación, reparación de heridas, coagulación, inflamación, inmunidad, autofagia, senescencia, necrosis y apoptosis, entre otros (Sajid and McKerrow 2002; Saska and Craik 2008). Las proteinasas comprenden aproximadamente el 2% de los genes en muchos organismos, con una pequeña diferencia entre organismos (Barrett 1994). Una proteinasa hidroliza aproximadamente un millón de enlaces peptídicos por segundo y se ha estimado que sin las proteinasas como catalizadores biológicos llevaría cientos de años hidrolizar un enlace peptídico. Las proteinasas van desde monómeros de 10 kDa a complejos multiméricos de varios cientos de kDa (McKerrow 1989; McKerrow et al. 1999).

El propósito de este capítulo es proveer una descripción general de las proteinasas en particular de las cisteína proteinasas; respecto a su estructura, sitio activo y requerimientos para su inhibición. La atención se centra en la familia de las cisteína proteinasas (CPs), particularmente de las asparaginil endopeptidasas pertenecientes al clan CD y familia C13 de las CPs.

Clasificación de las proteinasas

De acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteinasas se clasifican en el subgrupo 4 del grupo 3 de las hidrolasas

(Biochemistry et al. 1992). Sin embargo, como las proteinasas no cumplen fácilmente con el sistema general de nomenclatura debido a su amplia diversidad de acción y estructura, actualmente se clasifican con base al tipo de reacción catalizada, naturaleza química del sitio catalítico y relación evolutiva de su estructura (Barrett 1994).

Las proteinasas inicialmente se han clasificado en dos grandes grupos, en endopeptidasas, las cuales llevan a cabo la catálisis dentro de la cadena polipeptídica y exopeptidasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas), si la acción de éstas es directamente en el extremo amino (-NH₂) o carboxilo (-COOH) de sus correspondientes sustratos. Sin embargo, la disponibilidad de información estructural y mecanismo de reacción de estas enzimas ha facilitado un nuevo esquema de clasificación. El sistema más ampliamente reconocido de clasificación define a las proteinasas por:

1) Mecanismo catalítico

Basado en el grupo funcional presente en el sitio activo, las proteinasas se clasifican en seis diferentes clases, serín, treonín, aspartil, metalo, cisteína y glutámico proteinasas (Hartley 1960; Otto and Schirmeister 1997). Existen fundamentalmente dos diferentes mecanismos catalíticos para la hidrólisis. Para serín, treonín y cisteína proteinasas, el nucleófilo catalítico clave es un componente intrínseco del sitio activo (Ser, Thr o Cys, respectivamente); mientras que las aspartil, glutámico y metalo proteinasas usan una molécula de agua como el nucleófilo (Demuth 1990; Mykles 2001).

2) Secuencia de aminoácidos y estructura

Basado en la secuencia de aminoácidos, las proteinasas se clasifican en diferentes familias (Argos 1987) y éstas a su vez en “clanes” de proteinasas (Rawlings and Barrett 1993). Las familias son identificadas por una letra que representa el tipo de hidrólisis que ésta cataliza; por ejemplo, S, C, A, y M para las serín, cisteína, aspartil, y metalo proteasa (Rawlings 2016; Rawlings et al. 2016; Rawlings et al. 2006). Un clan se define como un grupo de proteínas que han surgido a partir de un único origen y está basado en la similitud de estructuras terciarias, cada clan representa un conjunto de proteínas homólogas (McKerrow and James 1996).

3) Proteasa individual

Por último, una proteasa se define como individual y distinta, si la especificidad y la sensibilidad a los distintos inhibidores es diferente, si hay diferentes tipos catalíticos o son codificadas por diferentes genes dentro de un mismo organismo (Turk 2012).

Cisteína proteinasas (CPs)

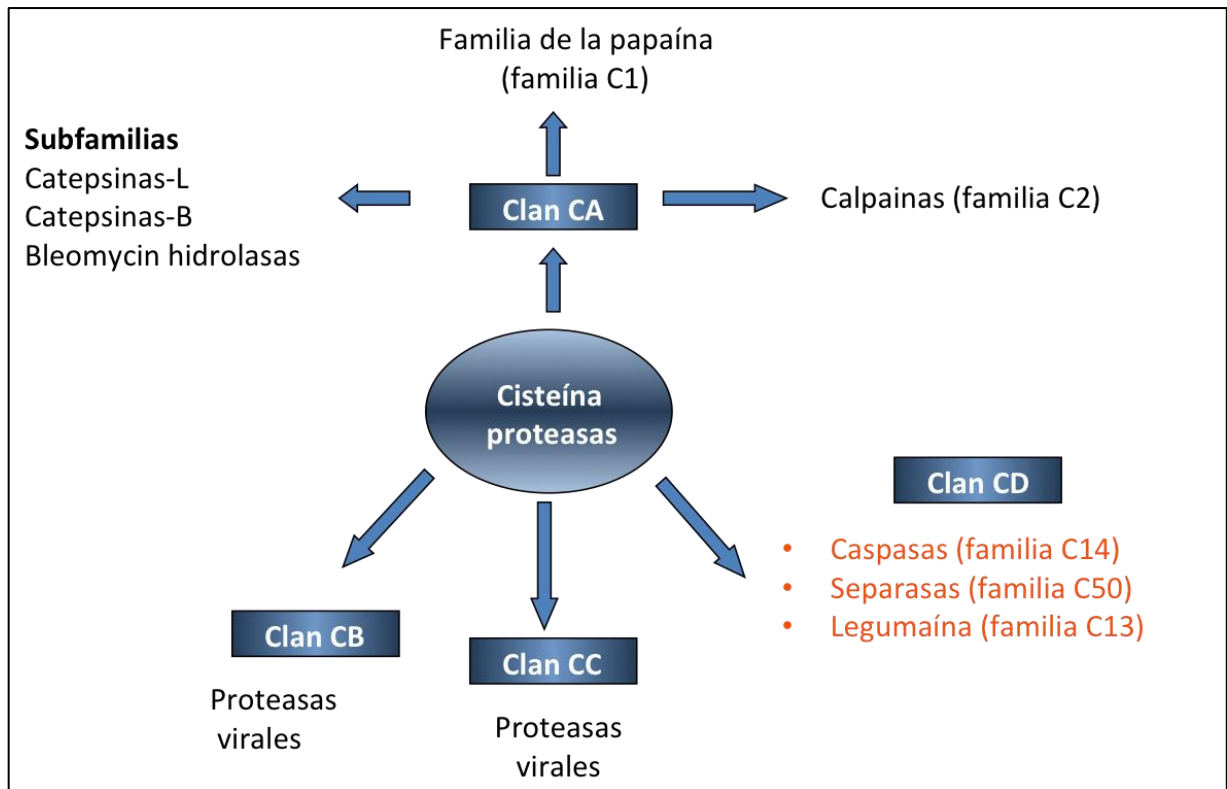
Las CPs están ampliamente distribuidas a través de la naturaleza, se encuentran en virus, bacterias, protozoarios, plantas, mamíferos y hongos (Otto and Schirmeister 1997). Las CPs se han agrupado en familias y clanes, dependiendo de la similitud de secuencia, posición de la inserción de hendiduras, “loops”, y por su especificidad bioquímica para pequeños sustratos (Klemba and Goldberg 2002; McKerrow et al. 1999; Sajid and McKerrow 2002). La primera cisteína proteinasa purificada y caracterizada de *Carica papaya* en 1879 se llamó papaína. La estructura de la papaína fue también la primera cisteína proteinasa resuelta. Desde su descubrimiento, numerosas proteinasas que tienen su secuencia en común con la papaína han sido vagamente llamadas de tipo papaína (“papain-like”), estas proteinasas pertenecen al clan CA, que está dividido en varias familias. Las CPs de organismos parásitos pertenecen principalmente a los clanes CA y CD (Barrett 1994; Rawlings and Barrett 1993). Un gran número de proteinasas del clan CA pertenecen a la familia C1 (catepsina B y catepsina L) y la familia C2 (tipo calpaína). Otras familias de CPs de organismos patogénicos se incluyen en el clan CB y CC (proteasas virales) y clan CD (familia C13, del tipo legumaína).

Basándose en la similitud de secuencia de aminoácidos y estructura, las proteinasas del clan CD se han agrupado en legumaínas (familia C13), caspasas (familia C14), separasas (familia C50), gingipaínas (familia C25 de eubacterias gram negativas) y clostripaínas (familia C11 de eubacterias gram positivas) (Mottram et al. 2003) (**Figura 1**).

Debido a la presencia ubicua de las CPs en parásitos, además de ser proteínas críticas en el ciclo de vida o patogenicidad de muchos de ellos; así como su diversidad funcional a causa de su única nucleofilicidad, adaptabilidad a diferentes sustratos y estabilidad en

diferentes ambientes biológicos, son blancos prometedores para el desarrollo de fármacos antiparasitarios (Sajid and McKerrow 2002).

Figura 1. Clasificación de las cisteína proteinasas de parásitos



Tomado de: Sajid and McKerrow (2002).

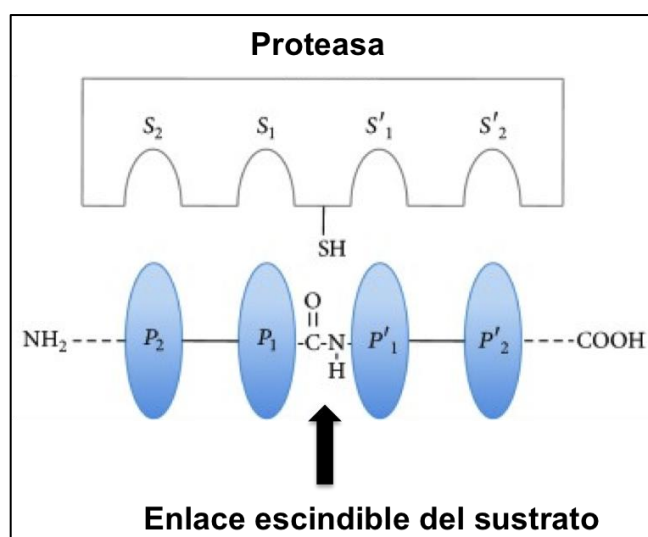
Mecanismo de acción de las cisteína proteinasas

El mecanismo de acción de las proteinasas se ha estudiado ampliamente y para definir los residuos de la enzima y el sustrato se ha adoptado la nomenclatura definida por Schechter y Berger (**Figura 2**) (Rao et al. 1998). El sitio catalítico de las proteinasas está flanqueado en uno o ambos lados por subsitios que tienen la capacidad de acomodarse a la cadena lateral de los aminoácidos del sustrato. Estos sitios están numerados desde el sitio catalítico S1 hasta el

sitio S_n hacia el extremo N-terminal de la estructura y S'_1 hasta S'_n hacia el extremo C-terminal. Los residuos del sustrato son numerados desde P_1 hasta P_n y P'_1 hasta P'_n , respectivamente.

Figura 2. Sitio activo de proteinasas

El sitio activo de la proteasa es indicado por SH y el enlace escindible es indicado con la flecha; S_1 hasta S_n y S'_1 hasta S'_n son los subsitios de la enzima, mientras P_1 hasta P_n y P'_1 hasta P'_n son los residuos del sustrato que son reconocidos por los subsitios de la enzima (Rao et al. 1998).

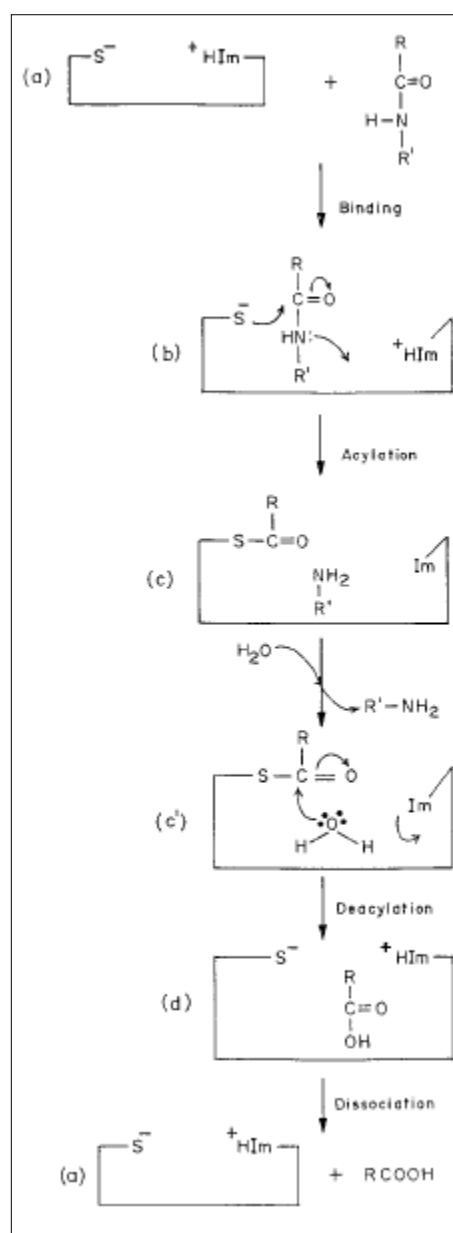


Las CPs catalizan la hidrólisis de derivados de ácidos carboxílicos a través de un doble desplazamiento involucrando la formación de un par ácido-base y la hidrólisis de un intermediario acil-tiol. El mecanismo de acción de las CPs es muy similar al de las serín proteinasas. La papaína es considerada el arquetipo de las CPs y constituye un buen modelo para esta familia de enzimas. La papaína consiste de una cadena polipeptídica simple que forma dos dominios que contienen una hendidura para la unión al sustrato. La estructura cristalina de la papaína confirma el par Cys^{25} - His^{159} participante en la catálisis (Kamphuis et al. 1985). La presencia de un residuo asparagina conservada (Asn^{175}) en la proximidad de la histidina catalítica (His^{159}) crea una triada Cys-His-Asn en las CPs.

La Cys y la His de la triada catalítica forman un par ion tiolato-imidazolio que confiere una alta nucleofilicidad al grupo tiol de la cisteína. Bajo estas condiciones el grupo tiol de la cisteína ataca como un nucleófilo para hidrolizar el enlace escindible del sustrato. El mecanismo general de hidrólisis del sustrato ocurre en cuatro pasos (**Figura 3**). El intermediario inicial (b) se establece por un enlace por puente de hidrógeno entre la Cys²⁵ y la Gly¹⁹ formando un oxi-anión (a) seguido por una acilación de la enzima y se libera del extremo carboxilo del fragmento del sustrato. La hidrólisis de la forma acil-enzima forma un segundo intermediario (c). El colapso de este intermediario regenera la enzima y libera el extremo amino del fragmento del sustrato (d) (Leung et al. 2000).

Figura 3. Mecanismo de acción de las CPs

Las CPs adoptan un mecanismo de hidrólisis involucrando la formación general ácido-base seguida por la hidrólisis de un intermediario acil-tiol. Im y ^+HIm se refiere al grupo imidazol y al grupo imidazol protonado, respectivamente. Tomado de: Rao et al. (1998).



Familia C13 de las CPs

Las CPs de la familia C13 (EC 3.4.33.34), comprende dos subfamilias: las asparaginil endopeptidasas y las glucosilfostatidilinositol (GPI): proteín transamidadas. Estas dos subfamilias de proteasas presentan diferentes funciones. Existe gran similitud en la secuencia primaria entre los miembros de las asparaginil endopeptidasas, sobre todo alrededor de la díada catalítica His/Cys; mientras que, hay poca homología en esta misma región entre los miembros de las GPI: proteín transamidadas, lo cual sugiere una extrema divergencia evolutiva (Mottram et al. 2003; Sajid and McKerrow 2002).

Asparaginil endopeptidasas

Las asparaginil endopeptidasas (AEP), también referidas como CPs de tipo legumaina, se clasifican como miembros del clan CD de la familia C13 de las CPs (EC 3.4.22.34) debido a los aminoácidos conservados de los motivos His¹⁴⁸-Gly---Ala-Cys¹⁸⁸. Este motivo conservado es típico de los miembros del clan CD que contienen a la caspasa-1, clostripainas, gingipainas R, paracaspasas y metacaspasas, lo cual sugiere una relación evolutiva (Barrett and Rawlings 2001; Chen et al. 1998; Rawlings et al. 2014). Además, un bloque altamente conservado de cuatro residuos hidrofóbicos (Phe-Ile-Tyr-Phe) precede a los residuos catalíticos His¹⁴⁸ y Cys¹⁸⁹. Llevan a cabo la hidrólisis exclusivamente en el extremo carboxilo de los residuos asparaginil P1 del sustrato (Schechter and Berger 1967). Estas enzimas fueron identificadas y caracterizadas al inicio de los 1980s en plántulas de veza y el frijol común *Phaseolus vulgaris* (Csoma and Polgar 1984; Shutov et al. 1982).

Al día de hoy, esta familia de CPs cuenta con miembros reportados en plantas (Abe et al. 1993; Hatsugai et al. 2015; Julian et al. 2013; Nakaune et al. 2005), mamíferos (Chen et al. 1997), trematodos como *Schistosoma mansoni* (Davis et al. 1987) y garrapatas (Abdul Alim et al. 2007), así como en los parásitos protozoarios como *T. vaginalis* (Leon-Felix et al. 2004) y *Blastocystis* (Wawrzyniak et al. 2012), pero no en bacterias. En el caso de humanos solo cuenta con una isoforma funcional de legumaina, además de un pseudo gen sin función alguna (Rawlings et al. 2014). Sin embargo, en plantas hay un variado número de isoformas

funcionales de legumainas, de las cuales se pueden subdividir en cuatro subfamilias como en el caso de *Arabidopsis thaliana* α VPE- δ VPE (Nakaune et al. 2005). El girasol contiene al menos cinco asparaginil endopeptidasas (Hatsugai et al. 2015) y en cebada se han identificado de 7 a 8 isoformas (Hatsugai et al. 2015; Julian et al. 2013). También se ha encontrado que las garrapatas producen una isoforma de legumaina. El parásito protozoario *Blastocystis* ST7 produce al menos dos isoformas de legumaina (Wawrzyniak et al. 2012) y en los trematodos *S. mansoni*, *Fasciola gigantica* y *Opisthorchis viverrini* se han identificado de una a dos isoformas de legumaina (Adisakwattana et al. 2007; Klinkert et al. 1989; Laha et al. 2008). Un estudio “*in silico*” para conocer el número de genes que codifican para CPs de la familia de las legumainas en *T. vaginalis* reveló que existen diez genes, entre los cuales se incluyen los dos genes reportados por León-Félix y col., (2004), *tvlegu-1* y *tvlegu-2*, cuatro más se identificaron a partir de cDNA por el Dr. Tang, *tvlegu-3* – *tvlegu-6*, así como otros cuatro genes, cuya nomenclatura se continuó en orden ascendente *tvlegu-7* – *tvlegu-10* (Arroyo et al. 2015; Carlton et al. 2007; Salas-Garrido 2005a).

Arquitectura de las legumainas

Como en el caso de las catepsinas, las legumainas son sintetizadas como un precursor inactivo que necesita ser sometido a cambios de pH para activarse y obtener su estructura catalíticamente activa (Chen et al. 1997; Li et al. 2003). Esencialmente, la pro-legumaina de humano inicia con un péptido señal (Met¹-Ala¹⁷) que es liberado durante su secreción, seguido de un pequeño pro-péptido de 8 aminoácidos en el N-terminal (Val¹⁸-Asp²⁵), un dominio de CP (Gly²⁶-Lys²⁸⁹) y un pro-dominio en el extremo C-terminal (Asp³⁰⁹-Tyr⁴³³) (Chen et al. 1997; Dall and Brandstetter 2016) (**Figura 4A**). El dominio de CP en general tiene una estructura de tipo caspasa y contiene la diada catalítica His¹⁴⁸- Cys¹⁸⁹, y dependiendo del organismo, contiene un variado número de sitios de N-glicosilación. En el caso de la legumaina de humano contiene cuatro sitios de N-glicosilación que resulta en una pro-enzima de aproximadamente 56 kDa. El pro-dominio C-terminal tiene una estructura de tipo “death-domain-like” que adicionalmente es estabilizada por dos enlaces disulfuro (Dall and Brandstetter 2016) (**Figura 4A**).

Estructura tridimensional de la legumaína

Recientemente se obtuvo la estructura tridimensional (3D) por cristalografía de rayos X de la pro-legumaína y el dominio de endopeptidasa enzimáticamente activo de las legumaínas de humano y ratón (Dall and Brandstetter 2016; Zhao et al. 2014). Las estructuras 3D revelan que la pro-legumaína comprende el dominio de asparaginil endopeptidasas (AEP, por sus siglas en inglés) de tipo caspasa y el pro-dominio en el C-terminal (**Figura 4B**). El pro-dominio se subdivide en un péptido de activación (AP, por sus siglas en inglés) y un dominio de estabilización y modulación de la actividad (LSAM, por sus siglas en inglés). El dominio AP bloquea el acceso sobre el sitio S' del sustrato, y el dominio LSAM impide la unión al sustrato, lo cual explica porque la pro-legumaina es inactiva. El dominio LSAM, presenta un dominio con un plegamiento de tipo “death domain (DD)-like fold” estabilizado por puentes disulfuro (**Figura 4A** y **Figura 4B**).

Figura 4. Arquitectura de los dominios de la legumaina de humano

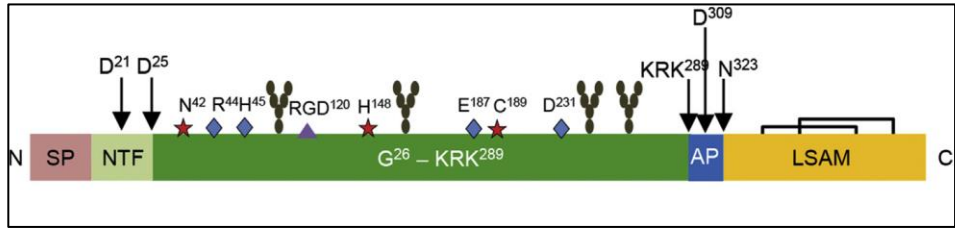
A) Diagrama de la pro-legumaina de humano.

Color rosa: Péptido señal (Met¹-Ala¹⁷) (SP); verde claro: fragmento N-terminal de pro-péptido de 8 aminoácidos (Val¹⁸-Asp²⁵) (NTF); verde oscuro: dominio catalítico (Gly²⁶-Lys²⁸⁹) (G²⁶-KRK²⁸⁹) que contiene la diada catalítica His¹⁴⁸-Cys¹⁸⁹. El pro-dominio en el extremo C-terminal que comprende, color azul: péptido de activación (AP; KRK²⁸⁹-N³²³) y en color naranja: módulo de estabilización y modulación de la actividad (LSAM; D³²⁴-Y⁴³³) con una estructura de tipo “death-domain-like”, que es estabilizada por enlaces disulfuro. Tomado de: (Dall and Brandstetter 2016).

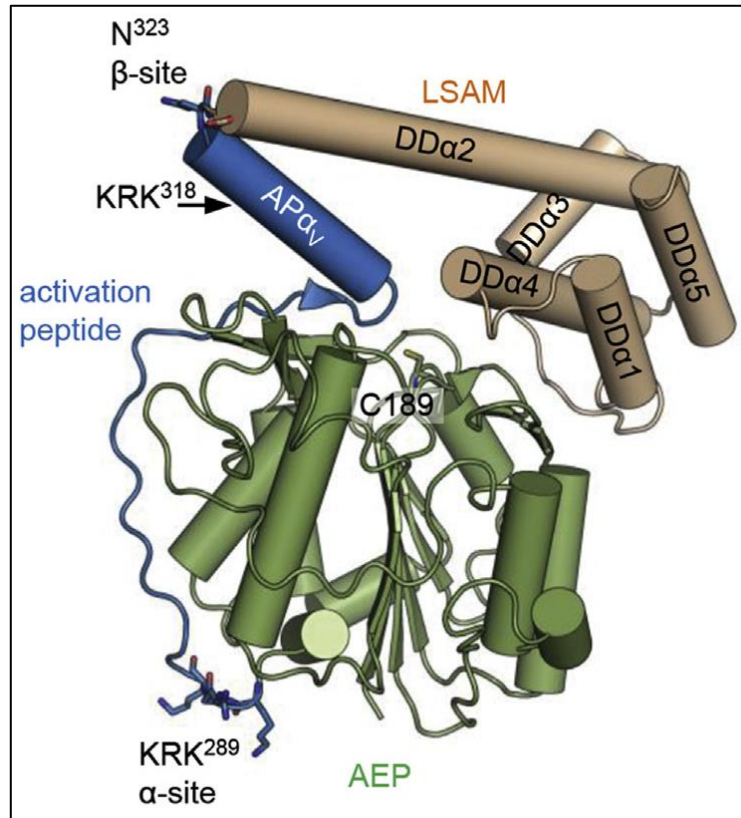
B) Estructura 3D obtenida por cristalografía de rayos X de la pro-legumaina de humano (PDB: 4fgu).

El dominio de AEP con actividad del legumaina y que presenta un plegamiento tipo legumaina se presenta en verde, el péptido de activación (AP, activation peptide) se presenta en azul y el dominio LSAM se presenta en café. Tomado de: Dall and Brandstetter (2016).

A



B

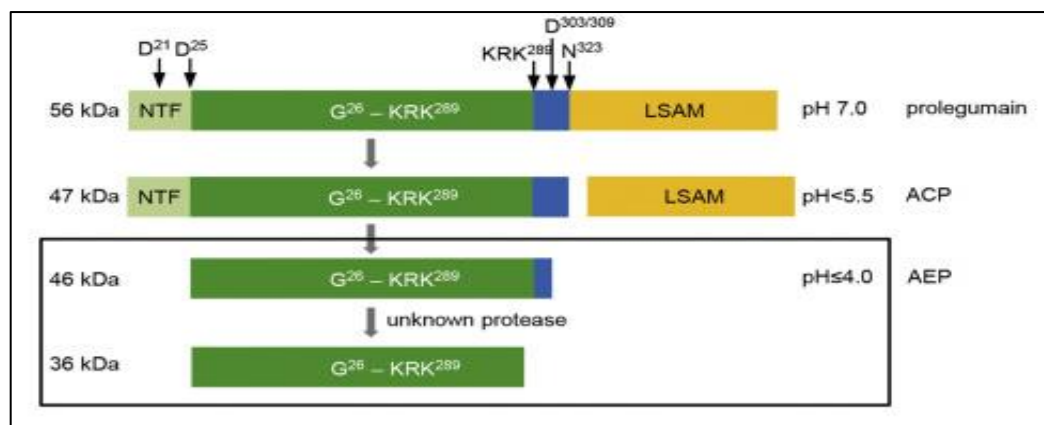


Activación de la legumaína

La legumaína de humano se sintetiza como un zimógeno inactivo de 56 kDa (prolegumaína). Un cambio en las condiciones de pH (ácido) desencadena un procesamiento autocatalítico en ambos extremos de la proteína, resultando en especies intermedias de 47 y 46 kDa (Dall and Brandstetter 2012; 2013; 2016) (**Figura 5**). El sitio de procesamiento del extremo C-terminal fue asignado a la Asn³²³, mientras que el sitio de procesamiento del extremo N-terminal ocurre entre el Asp²¹ y Asp²⁵. El procesamiento del extremo C-terminal se observa en condiciones de pH de 5.5, y es el paso crítico para generar una proteína activa; mientras que el procesamiento del extremo N-terminal, que se lleva a cabo estrictamente a $\text{pH} \leq 4.5$, no es esencial para su activación (Dall and Brandstetter 2012). *In vivo* se identificó en el extremo C-terminal de la legumaína activa de 46 kDa un sitio de corte adicional, realizado por un proteínasa diferente, dando como resultado una variante de la legumaína con un tamaño de 36 kDa. Sin embargo, la identidad de la proteínasa y el sitio de corte exacto aún no se conocen. Las evidencias indican que el sitio Lys-Arg-Lys²⁸⁹ (KRK²⁸⁹) podría ser el sitio donde ocurre el corte adicional y podría ser realizado por una enzima con especificidad similar a la tripsina (Dall and Brandstetter 2013). Una vez que la legumaína está activa, su estabilidad con respecto al pH cambia drásticamente, siendo estable en condiciones de pH ácido, pero se desestabiliza a $\text{pH} > 6.0$. La prolegumaína permanece estable en condiciones de pH neutro (Dall and Brandstetter 2013).

Figura 5. Activación de la legumaina de humano

La prolegumaina inactiva se sintetiza a pH neutro y se somete a un procesamiento autocatalítico en los sitios Asn³²³ (pH ≤ 5.5) y Asp³⁰³/Asp³⁰⁹ (pH ≤ 4.0) del extremo C-terminal, y después en los sitios Asp²¹ y Asp²⁵ del extremo N-terminal. Otro procesamiento ocurre en el motivo Lys-Arg-Lys (KRK²⁸⁹) por una proteasa desconocida. Mientras que el procesamiento del extremo N-terminal no es esencial para la activación enzimática, el procesamiento C-terminal hace que los sitios de unión al sustrato sean accesibles. La liberación del péptido de activación (azul) genera la enzima catalíticamente activa (ACP), la liberación del dominio de estabilización y modulación de la actividad (LSAM) es obligatoria para obtener una AEP completamente activa. Tomado de: Dall and Brandstetter (2013).



Antecedentes

Sintomatología de la tricomonosis

La tricomonosis urogenital es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) no viral más común, causada por el protozoo flagelado *Trichomonas vaginalis* (Dailey et al. 1990; Despommier et al. 1995; Schwebke and Burgess 2004). Aunque esta infección afecta ambos sexos, la tricomonosis se manifiesta primeramente en mujeres. *T. vaginalis* infecta la cavidad vaginal y uretral donde encuentra un ambiente hostil para su permanencia y reproducción (Heyworth et al. 1982), ya que las condiciones favorables para la colonización son 37 °C y un pH de 6.0 (Alderete and Garza 1985). Las mujeres con tricomonosis presenta síntomas muy variados como: inflamación, prurito, ardor al orinar y descarga amarilla-verdosa de mal olor con pH>4.5, *colpitis malcularis* (“cérnix de fresa”), eritema y friabilidad cervical. Estos síntomas se presentan en el 80% de las mujeres y el resto presentan síntomas leves que pueden variar, cualitativa y cuantitativamente durante el ciclo menstrual, empeorando durante la menstruación y el embarazo (Petrin et al. 1998; Rein and Chapel 1975; Schwebke and Burgess 2004). La tricomonosis es propia de la edad reproductiva de la mujer, raramente se presentan manifestaciones clínicas antes de la menarca o después de la menopausia, el periodo de incubación es de 4 a 28 días en el 50% de los individuos afectados (Petrin et al. 1998) y es posible que las mujeres con una mayor carga infecciosa presenten sintomatología, además de que puede persistir de manera asintomática por lo menos tres meses en mujeres no tratadas (Van Der Pol 2007).

La tricomonosis en hombres no está bien estudiada o entendida como en las mujeres. La infección sintomática en hombres es rara en comparación con su prevalencia, y se cree que la mayoría se resuelve en ausencia de tratamiento (Secor et al. 2014). Además, debido a que los hombres infectados a menudo son asintomáticos, pueden no ser conscientes de los riesgos para ellos y sus parejas sexuales. En la mayoría de los hombres, la infección, es asintomática o presenta sintomatología ligera como uretritis y/o prostatitis crónica no gonocócica (Krieger 1981; Rein and Chapel 1975; Secor et al. 2014; Spence et al. 1980).

Epidemiología de la tricomonosis

En el mundo se estima una incidencia de 248 millones de nuevos casos por año (OMS 2011). En Estados Unidos se estima una incidencia de 3.7 millones de personas (Satterwhite et al. 2013). En México la “Información Epidemiológica de Morbilidad Anuario 2012-Versión Ejecutiva”, emitida por la Secretaría de Salud y la Dirección General de Epidemiología en 2012, la tricomonosis urogenital ocupó el 12º lugar entre las “veinte principales causas de enfermedades transmisibles”, con 113 843 casos notificados. En cuanto a incidencia, se registraron las cifras mayores en los estados de Puebla, Tlaxcala, Veracruz, seguidos de Zacatecas, Oaxaca y Durango (Secretaría de Salud 2012) . A pesar de ser una enfermedad diagnosticada para la que existe tratamiento, la tricomonosis no es una infección reportable y el control de la infección ha recibido relativamente poca atención en los programas de salud pública (Schwebke and Burgess 2004).

Complicaciones asociadas a la tricomonosis

Considerada durante mucho tiempo como una enfermedad de transmisión sexual menor con pocas complicaciones asociadas, la infección con *T. vaginalis* se ha relacionado con embarazos de alto riesgo debido a la ruptura de las membranas amnióticas, partos prematuros y nacimientos de niños con bajo peso (Cunnington et al. 2013; Silver et al. 2014). La tricomonosis provoca infertilidad en la mujer, erosión del epitelio cervical, endometritis y la enfermedad pélvica inflamatoria (Meites et al. 2015). Pacientes con infección crónica de *T. vaginalis* tienen alto riesgo de contraer el Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH (Kissinger and Adamski 2013; Laga et al. 1993; Magnus et al. 2003; Nzila et al. 1991) y son más susceptibles al cáncer cérvico uterino (Zhang and Begg 1994).

En los hombres puede ocasionar infertilidad (Jarecki-Black et al. 1988) ya que algunos factores solubles o metabolitos del parásito disminuyen significativamente la movilidad y viabilidad de los espermatozoides (Han et al. 2004). Además en hombres existe una relación entre la incidencia de tricomonosis y el cáncer de prostata (Meites et al. 2015).

Diagnóstico de la tricomonosis

Presentación clínica

El diagnóstico clínico de *T. vaginalis* no debe hacerse basándose únicamente en los síntomas clínicos ya que se asemejan a los de otras infecciones de transmisión sexual (Jirovec and Petru 1968; Petrin et al. 1998), el clásico *colpitis malcularis* (“cérvix de fresa”) se presenta sólo en el 2% de pacientes y la descarga amarilla-verdosa de mal olor en el 12% de mujeres con tricomonosis (Fouts and Kraus 1980). En los 80’s Fouts y Kraus (Fouts and Kraus 1980) demostraron que si estas características clásicas son usadas únicamente en la diagnosis de tricomonosis 88% de las mujeres infectadas no eran diagnosticadas y el 29% de las mujeres que no estaban infectadas eran diagnosticadas falsamente con tricomonosis (Fouts and Kraus 1980). Estos datos muestran que las manifestaciones clínicas no son parámetros fiables para el diagnóstico de tricomonosis que se requiere para un tratamiento apropiado y para controlar la propagación de la infección causada por *T. vaginalis*.

Microscopía y técnicas de cultivo

El diagnóstico común de la trichomonosis depende de la observación microscópica de protozoarios en secreciones vaginales y en orina (Meites et al. 2015; Schwebke and Burgess 2004), un procedimiento descrito primeramente por Donné en 1836 (Donné 1836). *T. vaginalis* se puede diferenciar con base en su movilidad característica. La sensibilidad de esta técnica puede variar desde un 38% hasta un 82% (Hulka and Hulka 1967; Martin 1963; McCann 1974). Aunque este método de diagnóstico es el más barato, está muy lejos de ser el óptimo debido a su baja sensibilidad. Esto puede deberse a la pérdida de la movilidad al reducirse la temperatura de las secreciones fuera del cuerpo (Petrin et al. 1998).

Anteriormente, el estándar de oro para el diagnóstico de tricomonosis era el cultivo debido a su simple interpretación y requerir de 300 a 500 tricomonas/mL de inóculo (Garber et al. 1987). Sin embargo, el cultivo tarda de 2 a 7 días y durante este tiempo los pacientes infectados pueden continuar transmitiendo la infección (Moldwin 1992).

Dado que los métodos de cultivo son relativamente lentos, se introdujo la tinción de parásitos fijados y no fijados con naranja de acridina (Rodríguez-Martínez et al. 1973), Leishman (Levett 1980), ácido de Schiff (Rodríguez-Martínez et al. 1973) y Fontana (Nagesha

et al. 1970) para mejorar la sensibilidad de la microscopía. Aunque las técnicas de tinción tienen sus limitaciones dado que *T. vaginalis* no siempre aparece en su forma típica de pera con flagelos.

Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos

A lo largo de los años se han desarrollado pruebas de amplificación de ácidos nucleicos altamente sensibles (NAAT, highly sensitive specific nucleic acid amplifications tests, por sus siglas en inglés) para el diagnóstico de *T. vaginalis* (Singh et al. 2012). Las pruebas disponibles incluyen PCR, amplificación mediada por transcripción (TAM, por sus siglas en inglés) y otras variaciones de métodos bioquímicos que comprenden replicación y amplificación de secuencias específicas de DNA o RNA (Banda et al. 2013).

El uso de estos métodos ayuda a detectar tanto a organismos viables como no viables; también detecta secuencias blanco en muestras que han estado en fijación o parcial degradación. En 1992 Riley et al., reportaron la técnica de PCR con el uso de los iniciadores TVA5 y TVA, para la detección de *T. vaginalis* (Riley et al. 1992). Subsecuentemente se han reportado diferentes iniciadores (Banda et al. 2013; Madico et al. 1998).

Recientemente se han descrito varios ensayos de PCR para la detección de *T. vaginalis* en mujeres (Munson et al. 2010; Nye et al. 2009; Schwebke et al. 2011). Algunos de ellos han demostrado ser más sensibles que el cultivo o la microscopía (Nye et al. 2009). Sin embargo, estas técnicas se consideran costosas por lo que su impacto en la práctica clínica está todavía fuera del alcance de muchos centros de diagnóstico (Oliveira et al. 2016).

Técnicas basadas en anticuerpos

Se estima que hay ocho serotipos de *T. vaginalis* y en inmuno ensayos se ha observado una variedad de marcadores antigénicos (Garber et al. 1986; Ramon-Luing et al. 2010). También se ha mostrado que la respuesta serológica a *T. vaginalis* es variable entre las personas quienes podrían reaccionar a diferentes antígenos parasitarios (Garber et al. 1986; Krieger et al. 1985). Para determinar la presencia de anticuerpos tricomonales se han utilizado diversas técnicas, entre ellas hemaglutinación, difusión en gel, fluorescencia de anticuerpos y ELISA. Sin embargo, éstas no son específicas en la determinación de la infección reciente. Además, en poblaciones de baja incidencia, el anticuerpo positivo podría reflejar la interacción con tricomonas no patogénicas.

La detección directa de antígenos de *T. vaginalis* en secreciones vaginales por el uso de anticuerpos monoclonales promete ser un método rápido de diagnóstico para tricomoniasis, se ha registrado una prueba inmunocromatográfica para la detección de tricomoniasis en mujeres (Genzyme Corp. Cambridge, Mass). Al usar anticuerpos monoclonales para proteínas tales como el factor de desprendimiento de células (CDF; 200 kDa) y una cisteína proteasa (60 kDa), se ha observado que son inmunogénicas en todos los aislados de *T. vaginalis*, y pueden proveer una alternativa para la detección de tricomoniasis. En un estudio de mujeres atendidas en una clínica de enfermedades de transmisión sexual en Seattle, utilizando la prueba de inmunoreconocimiento “Xenostrip-Tv test” se demostró una sensibilidad y especificidad de entre el 78.5% y el 98%, respectivamente, comparado con los métodos de cultivo. La rapidez con que es realizada la prueba no varía con síntomas de vaginitis o con la presencia de otras infecciones, permitiendo tanto la diagnosis como la administración de algún tratamiento el día de la visita del paciente (Kurth et al. 2004).

Bóznér y col., (1992) demostraron la presencia de anticuerpos anti-proteasas de *T. vaginalis* tanto en suero como en secreciones vaginales de mujeres infectadas, así como en suero y secreciones vaginales de mujeres después de 2-6 semanas de haberse sometido a un tratamiento exitoso contra tricomoniasis (Bozner et al. 1992). Mason y col., (2001) mediante este inmuno ensayo detectó anticuerpos contra proteínas de *T. vaginalis* en sueros de pacientes de Zimbaue (Mason et al. 2001). Los inmunoensayos mostraron una sensibilidad del 94 al 95% en comparación con el cultivo de exudados vaginales.

Tratamiento de la tricomoniasis

En 1959, se encontró que un derivado del nitroimidazol es altamente efectivo en el tratamiento sistémico de la tricomoniasis (Cosar and Julou 1959). Este derivado fue el α , β -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol, comúnmente referido como metronidazol. Este compuesto entra en la célula por difusión y es activado en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*, donde el grupo nitro es reducido anaeróbicamente por la piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa y rompe las hebras de DNA (Tocher and Edwards 1994). La respuesta es rápida, la división celular y la movilidad cesan en el lapso de 1 h y la muerte celular ocurre en 8 h como se ha visto en cultivos celulares (Nielsen 1976).

Se ha debatido el uso del metronidazol a mujeres embarazadas, se corre el riesgo de que los niños nazcan con defectos (Rosa et al. 1987) y también existe un bajo riesgo de desarrollar cáncer (Beard et al. 1979; Connor et al. 1977). Esto es debido a que cruza la barrera placentaria y por lo tanto no es indicado para el tratamiento de tricomonosis en mujeres cuando están en el primer trimestre del embarazo (Lossick and Kent 1991), aunque los defectos del recién nacido no están directamente asociados con el uso de éste. Lo que ha llevado a la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) a clasificar al metronidazol como un factor de riesgo de clase B para el embarazo, un riesgo posible pero no confirmado para el feto. Por lo tanto, el fármaco ha sido contraindicado en el primer trimestre del embarazo (Cudmore et al. 2004).

Aunque el tratamiento sistémico es efectivo, puede fallar debido a la interrupción del tratamiento o una reinfección. Otras razones se han propuesto tales como baja absorción del medicamento a nivel local, una ineficiente liberación del medicamento en el área vaginal, o inactivación del medicamento por la presencia de bacterias dentro de la vagina (Edwards et al. 1979; Ingham et al. 1979; McFadzean et al. 1969). Lumsden et al (Lumsden et al. 1988a) considera que estos mecanismos son poco probables y que la causa del fracaso de muchos tratamientos se debe a la resistencia de *T. vaginalis* al medicamento. La resistencia puede deberse a mutaciones que afectan el metabolismo aerobio y anaerobio del parásito. En tricomonas, la resistencia en condiciones aerobias es debida a la reducción de la transcripción del gen que codifica para la piruvato-ferredoxin-oxido reductasa, por lo tanto, disminuye la habilidad del parásito para activar el medicamento (Quon et al. 1992). La resistencia en condiciones anaerobias, se debe a que la actividad de la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa y la hidrogenasa disminuyen o no existen (Kulda et al. 1993). Aunque hay otros nitroimidazoles, estos tienen modos similares de actuar (Lumsden et al. 1988b), por lo cual son necesarios nuevos medicamentos para el tratamiento de la tricomonosis.

Antecedentes directos

Trichomonas vaginalis

T. vaginalis es el protozoario parásito responsable de la tricomonosis humana, la infección de transmisión sexual (ITS) no viral más común (Despommier et al. 1995; Petrin et

al. 1998; Schwebke and Burgess 2004). *T. vaginalis* infecta el tracto urogenital donde está expuesta a condiciones desfavorables para su permanencia y reproducción, tales como pH ácido, temperatura, presencia de lactobacilos, cambios en el ciclo hormonal, descamación del epitelio, presencia de zinc (en el hombre), fluctuación en la concentración de poliaminas y hierro, flujo menstrual, entre otros. Para subsistir a este ambiente hostil, el parásito requiere de una gran capacidad de adaptación. Para lo cual modula la expresión de múltiples factores de virulencia involucrados en la citoaderencia, citotoxicidad, fagocitosis, hemólisis, evasión de la respuesta inmune y la inducción de apoptosis de la célula blanco, entre otros, para poder sobrevivir, obtener nutrientes y mantener la infección (Arroyo et al. 2015).

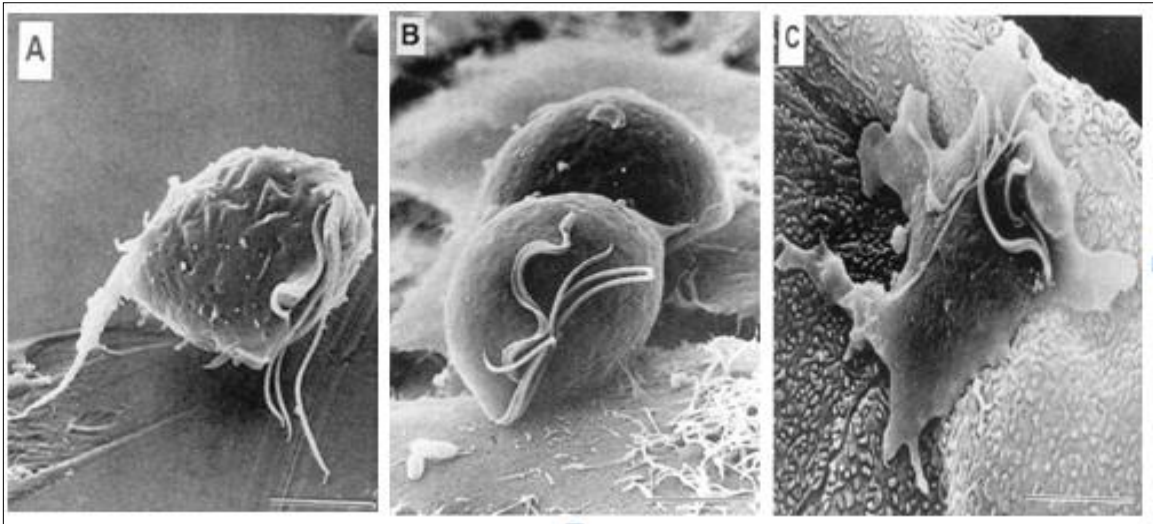
Morfología de *T. vaginalis*

Este patógeno urogenital varía en tamaño y forma, con un diametro de ~7 y 10 μm , (Honigberg and King 1964). Las condiciones fisicoquímicas alteran la apariencia del parásito. En cultivos axénicos, la forma del protozoario tiende a ser más uniforme, ovalado o en forma de pera (**Figura 6A**) (Arroyo et al. 1993), pero el parásito toma una apariencia ameboide cuando está unido las células del epitelio vaginal (**Figuras 6B y 6C**) (Arroyo et al. 1993; Heath 1981).

T. vaginalis es un protozoario que posee cinco flagelos, cuatro de los cuales están localizados en su parte anterior. El quinto flagelo se localiza en la membrana ondulante del parásito (**Figura 6A**) (Arroyo et al. 1993; Warton and Honigberg 1979). El flagelo y la membrana ondulante dan al parásito su movilidad, un aspecto característico de este protozoario (Warton and Honigberg 1979). *T. vaginalis* se reproduce por fisión binaria longitudinal (Brugerolle 1971).

Figura 6. Morfología ovoide y ameboide de *T. vaginalis*

A) *T. vaginalis* como es visto en el medio de cultivo. La Membrana ondulante y los flagelos son claramente visibles. B) *T. vaginalis* adherido a células HeLa mantiene su morfología ovoide. C) Morfología ameboide de *T. vaginalis* en contacto con células vaginales. Tomado de: Arroyo et al. (1993).



Proteasas de *T. vaginalis*

Al conocerse la secuencia del genoma de *T. vaginalis* se confirmó que este parásito posee más de 400 genes que codifican para proteinasas, considerándose uno de los degradomas más complejos. Aunque 220 genes corresponden a cisteína proteinasas (CPs), sólo 23 CPs se han detectado mediante geles de sustrato (zimogramas) en dos dimensiones de extractos de *T. vaginalis*. Después de su identificación por espectrometría de masas se concluyó que corresponden al producto de únicamente nueve genes diferentes (Bozner and Demes 1991; Carlton et al. 2007; Neale and Alderete 1990; Ramon-Luing et al. 2010). La mayoría de estas CPs pertenecen a la familia C1 de las catepsinas-L, las cuales pertenecen al clan CA, también conocidas como CPs de tipo papaína, que se han visto implicadas en una variedad de eventos biológicos que incluyen inmuno evasión (Alderete et al. 1995b; Provenzano and Alderete 1995), patogénesis y virulencia (Alderete et al. 1995a; Alvarez-Sanchez et al. 2000; Arroyo and Alderete 1995; Dailey et al. 1990; Petrin et al. 1998). El clan

CD es otro clan de CPs identificado en *T. vaginalis*. En particular se han identificado CPs pertenecientes a la familia C13 o familia de las CPs tipo legumaína.

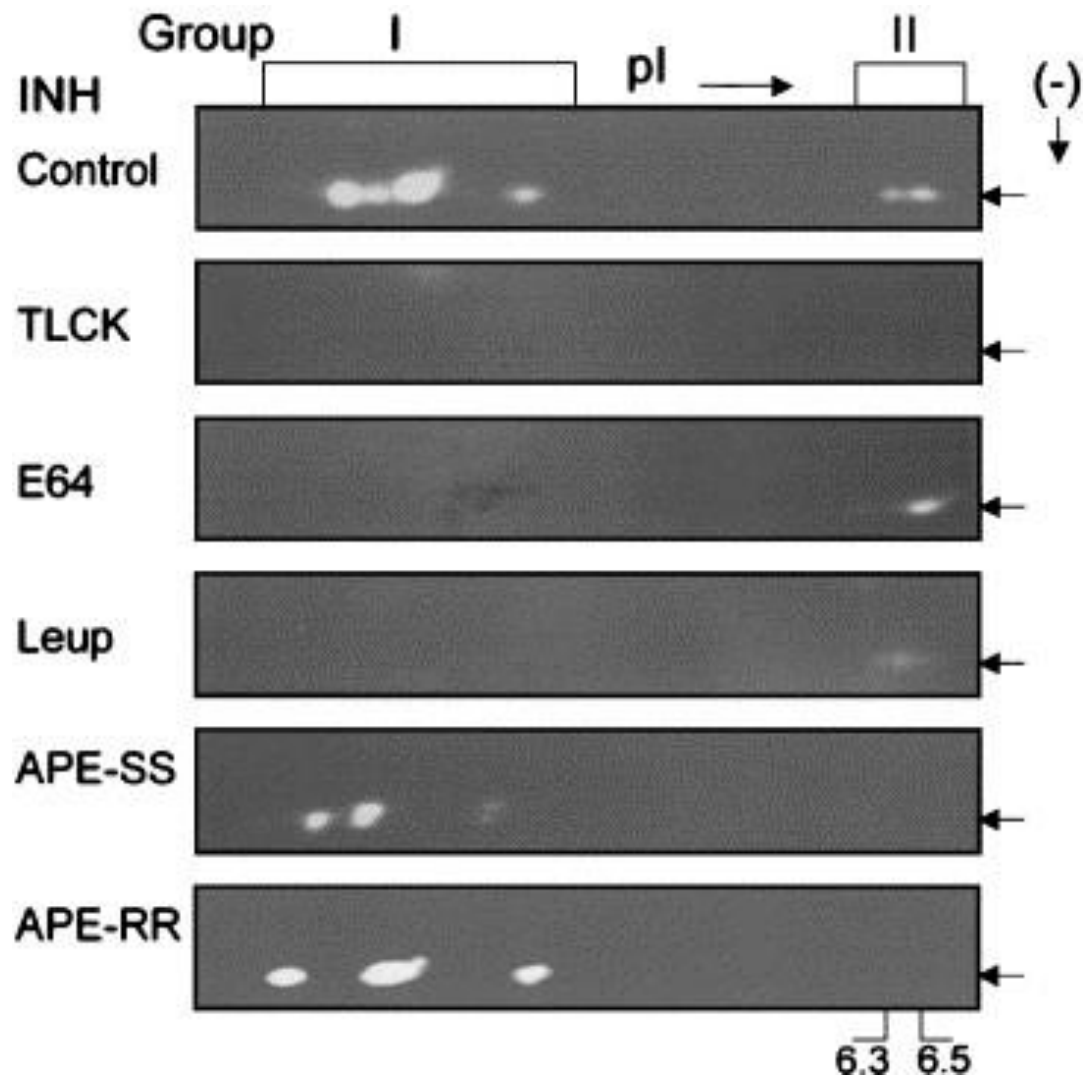
CPs de la región de 30 kDa (CP30)

La adhesión a las células epiteliales del tracto urogenital es un proceso multifactorial esencial en el establecimiento de la infección de *T. vaginalis*, en el que participan CPs, ya que los inhibidores de proteasas *N*- α -*p*-tosil-L-lisil-clorometilcetona (TLCK) y leupeptina redujeron significativamente la adhesión del parásito a células HeLa y células del epitelio vaginal (Arroyo and Alderete 1989). El efecto inhibitorio puede ser revertido incubando los parásitos tratados con TLCK en presencia de papaína o con proteinasas contenidas en los extractos de proteasas de *T. vaginalis*. En ensayos de unión a la superficie de células blanco, se identificó en *T. vaginalis* una banda de CPs de 30 kDa sensibles a TLCK (Colectivamente llamas CP30) con alta afinidad a células HeLa (Arroyo and Alderete 1995; Mendoza-Lopez et al. 2000).

Además, Mendoza-López y colaboradores en el 2000 mostraron en zimogramas en dos dimensiones de extractos totales del aislado fresco de *T. vaginalis* CNCD 147, la presencia de tres manchas con actividad proteolítica en la región de 30 kDa, con un pI de 4.5, 5.0 y 5.5. Dos de las manchas (pI 4.5 y 5.0) poseen afinidad a la superficie de células HeLa y degradan componentes de la matriz extracelular como fibronectina, colágena IV y hemoglobina (Mendoza-Lopez et al. 2000). Posteriormente León-Félix y col., (2004) usando extractos totales del mismo aislado, mejoraron la resolución de los zimogramas en dos dimensiones y detectaron seis manchas correspondientes a dos tipos de familias de CPs, cuatro manchas con pI entre 4.5 y 5.5 que corresponden a CPs pertenecientes a la familia de la papaína (clan CA) y dos manchas con pI 6.3 y 6.5 que corresponden a CPs pertenecientes a la familia de las legumaínas (clan CD) (**Figura 7**) (Asgian et al. 2002; Leon-Felix et al. 2004). Esto se demostró por la especificidad de los inhibidores para legumaínas (Aza-peptido epóxidos), los cuales no actúan sobre las CPs del clan CA y muestran poca reactividad cruzada con otras enzimas del clan CD.

Figura 7. Efecto de los inhibidores de CPs sobre la actividad proteolítica de las proteinasas presentes en la región de 30 kDa de *T. vaginalis*

Electroforesis en geles de sustrato de 2-D al 10% copolimerizado con gelatina al 0.2 %. Patrón de proteinasas correspondiente a la región de 30 kDa de los lisados de *T. vaginalis* incubados sin (control) o con diferentes inhibidores de proteinasas (INH): TLCK 1 mM, E-64 180 μ M, leupeptín 0.2 mM (Leup) (todos estos son inhibidores específicos para CPs de tipo papaína; y de aza-péptido epóxidos 1 mM (APE-SS y APE-RR) (inhibidores específicos para CPs tipo legumaína). Grupo I la familia de las papaínas pertenecientes al clan CA, y el grupo II la familia de las legumaínas pertenecientes al clan CD. Tomado de: Leon-Felix et al. (2004)



Asparaginil endopeptidasa TvLEGU-1 de *T. vaginalis*

Con la secuencia de los diez primeros residuos del extremo N-terminal de la banda CP30 purificada por cromatografía y con cDNA de *T. vaginalis* se clonaron dos genes que codifican para proteasas tipo legumaína denominados *tvlegu-1* y *tvlegu-2* que codifican para las legumaínas de la familia de las asparaginil endopeptidasas que no se habían reportado en este parásito (Leon-Felix et al. 2004).

El gen *tvlegu-1* (Número de acceso AY326446; TVAG_426660) presenta un marco abierto de lectura de 1167 pb que codifica para una proteína precursora de 389 aminoácidos. El gen tiene una región no traducida 5', de 12 nucleótidos y una región no traducida 3', de 29 nucleótidos. La posible señal de poliadenilación (TAAA) se encuentra 10 nucleótidos río abajo del codón de paro y contiene 17 nucleótidos de cola de poli A (Leon-Felix et al. 2004).

El gen *tvlegu-1* codifica para un precursor de aproximadamente 42.8 kDa (TvLEGU-1) con un pI de 6.2 que al ser procesado se obtiene una proteína madura de aproximadamente 34 kDa, con un pI de 6.3, observada por geles en dos dimensiones (2D) de los extractos de *T. vaginalis*. Durante el proceso de maduración de la TVLEGU-1 hay remoción de 10 residuos de aminoácidos (MFLLQLARC) en su extremo amino terminal. Aunque se desconoce el sitio de procesamiento en el extremo C-terminal, se estima que en el proceso de activación se remueven aproximadamente 70 residuos del extremo carboxilo terminal. La TvLEGU-1 tiene los residuos conservados de histidina (His) y cisteína (Cys) que forman parte de la díada catalítica específica de las CPs del clan CD, localizados en la posición His¹¹⁹ y Cys¹⁶⁴, lo que sugiere que la TVLEGU-1 sea catalíticamente activa al madurar (Leon-Felix et al. 2004).

Rodríguez-Cabrera en el 2007 subclonó la secuencia que codifica para el precursor completo y el precursor sin los primeros 10 aa (MFLLQLARC) del extremo N-terminal de la TvLEGU-1 en el vector pCold I, para ensayos de expresión. Ambas proteínas recombinantes se expresaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3), observándose su acumulación en cuerpos de inclusión y ambas fueron reconocidas por los anticuerpos anti-TvLEGU-1 en ensayos de WB. Sin embargo, solo el precursor sin los 10 aa de 43 kDa se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel y fue reconocida por anticuerpos anti-Histidinas. Esta proteína recombinante se incubó en condiciones ácidas (pH de 3-5) y en presencia de DTT; sin embargo, no se detectó actividad proteolítica de la proteína recombinante en zimogramas (Rodríguez-Cabrera 2007a).

Además, se identificó y localizó a la TvLEGU-1 en *T. vaginalis* y se estudió el efecto del hierro en su expresión; mediante el diseño de un péptido sintético (pepTVLEGU-1) de la región divergente de la TvLEGU-1 en su extremo carboxilo terminal (NEVVAPKADAK) se produjeron anticuerpos policlonales contra este péptido (anti-pepTVLEGU-1). El anticuerpo reconoce una proteína en la superficie de parásitos fijados y en el citoplasma de parásitos permeabilizados. Por otro lado, mediante análisis de WB se encontró que en parásitos crecidos en alto hierro el anticuerpo anti-pepTVLEGU-1 reconoce dos bandas de 50 y 60 kDa; sin embargo, en parásitos crecidos en bajo hierro se observa solo una banda de 30 kDa. Estos datos sugieren que la TvLEGU-1 se encuentra modificada postraduccionalmente en *T. vaginalis* y que las diferentes bandas de proteínas detectadas con el anticuerpo, pueden corresponder a diferentes etapas de procesamiento como ocurre en las leguminaínas de mamíferos y de otros parásitos, ya que mediante análisis *in silico* se encontraron posibles sitios de O-glicosilación (Salas-Garrido 2005b).

Con el objetivo de conocer la localización subcelular, el procesamiento, las modificaciones postraduccionales y la interacción de TvLEGU-1 con la superficie de células HeLa, Rendón-Gandarilla en el 2007 obtuvo anticuerpos policlonales en dos especies distintas contra la proteína recombinante sin los primeros 10 aa, con los cuales se logró observar diferentes localizaciones de la TvLEGU-1 en parásitos permeabilizados, en el complejo de Golgi, hidrogenosomas, lisosomas y en la superficie del parásito. También se detectaron los posibles estados de procesamiento de la proteína TvLEGU-1. En extracto de proteasas y proteínas totales, la TvLEGU-1 presenta diferentes estados de procesamiento, con bandas de 60 y 50 kDa, y de 27 o 30 kDa. Por otra parte, en los parásitos tratados con la enzima fosfolipasa C (PLPC) se logró observar por ensayos de inmunofluorescencia indirecta y WB que la proteína TvLEGU-1 se transloca a la membrana plasmática posiblemente mediante un anclaje GPI, que podría ser parte de un mecanismo de transporte a la membrana plasmática aún no descrito en este parásito. Por ensayos de ligando-proteasas con los diferentes anticuerpos, se logró determinar que tanto las bandas de 60 y 50 kDa (con anti-pep TVLEGU-1) como las bandas de 27 y 30 kDa (con anti-TVLEGU-1 recombinante), interaccionan con la superficie de las células HeLa. Por otro lado, se purificó la proteína recombinante TvLEGU-1 para probar por ensayos de ligando si esta proteína tenía afinidad a la superficie de las células HeLa y fue reconocida por los anticuerpos anti-CP30, la proteasa de *T. vaginalis* que participa

en la adhesión. Además, por ensayos de SDS-PAGE y WB en 2D con los anticuerpos de conejo obtenidos contra la proteína TvLEGU-1 recombinante se detectaron tres manchas proteicas con distinto pI en la región de 30 kDa y por espectrometría de masas se confirmó que corresponden a la TvLEGU-1 (30 kDa) de *T. vaginalis*. Estas isoformas de la TvLEGU-1 presentan diferente tipo y nivel de fosforilación. Además, se demostró que la proteína TVLEGU-1 se localiza en la superficie de *T. vaginalis*, una de las CPs de la región de 30 kDa que participa en la citoadherencia de *T. vaginalis* a células epiteliales (Rendón-Gandarilla 2007a; Rendón-Gandarilla et al. 2013).

Posteriormente, se obtuvo el degradoma activo de *T. vaginalis* y por ensayos de zimogramas y WB en 2D utilizando sueros de pacientes con tricomoniasis y por análisis de espectrometría de masas, con el objetivo de identificar proteasas de *T. vaginalis* como biomarcadores potenciales para tricomoniasis, ya que los anticuerpos en suero contra CPs desaparecen después del tratamiento con metronidazol. Los estudios con sueros de pacientes identificaron cinco CPs (manchas de mayor reactividad) en la región de 30 kDa (TvCP2, TvCP4, TvCP4-like, TvCP39 y TVLEGU-1), estos datos se corroboraron al mostrar la reactividad de los sueros de pacientes con sus respectivas proteínas recombinantes, demostrando así que algunas de estas CPs pueden ser usadas como biomarcadores potenciales para el diagnóstico de la tricomoniasis (**Figura 8**) (Ramon-Luing et al. 2010).

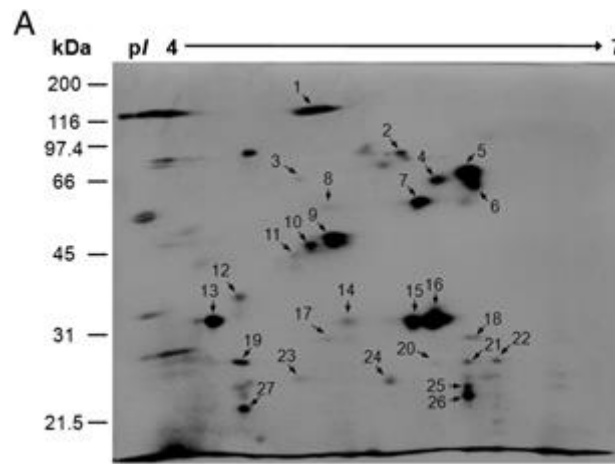
Figura 8. Identificación de las manchas de proteinasas en los extractos resistentes a proteasas de *T. vaginalis* por espectrometría de masas y ensayos de Western blot en 2D con sueros de pacientes con tricomoniasis

Los extractos de proteasas se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% después de su separación por isoelectroenfoque (EIF) en tiras IPG con un gradiente lineal de pH 4-7.

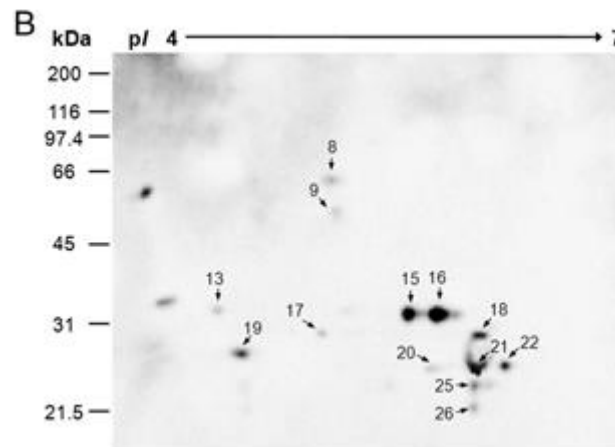
A) Manchas identificadas por espectrometría de masas (MS) en geles teñidos con plata marcadas con números consecutivos (1-27). TvLEGU-1 (TVAG_426660) manchas 15 y 16; TvCP2 (TVAG_057000) mancha 18; TvCP4 (TVAG_467970) manchas 21, 22, 25, y 26; TvCP4-like (TVAG_355480) manchas 20, 25, 7 26; TvCP39 (TVAG_298080) manchas 12, 19 y 27.

B) Patrón de proteínas inmunogénicas detectadas por WB usando el suero de un paciente positivo (HGM124) para *T. vaginalis*.

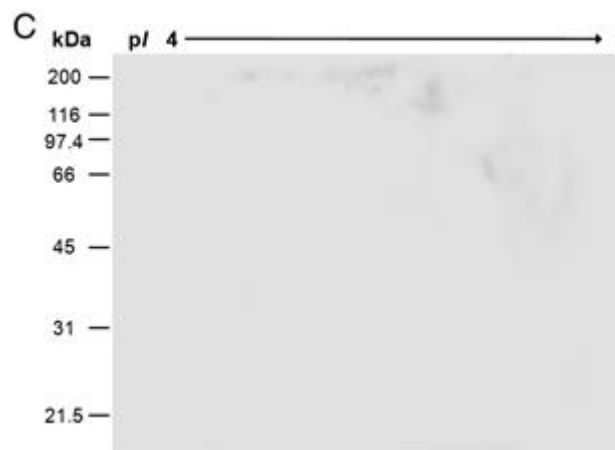
C) Reacción del suero de una persona sana (NHS1) o paciente con otra vaginitis (HGM48) usados como controles negativos. Tomado de: Ramon-Luing et al. (2010).



Tinción con Plata



Suero de paciente con *T. vaginalis* – HGM124 (+)



Suero de persona sana – NHS1 (-)

JUSTIFICACIÓN

Las enzimas proteolíticas actúan de manera concertada en la hidrólisis de péptidos y proteínas. Las cisteína proteinasas, también referidas como tiol-proteinasas, constituyen una de las principales clases de enzimas proteolíticas implicadas en una serie de procesos fisiológicos y patológicos en virus, bacterias, protozoarios, plantas y mamíferos (Verma et al. 2016).

Debido a la presencia ubicua de las cisteína proteinasas en parásitos, además de ser proteínas críticas en el ciclo de vida o patogenicidad de muchos parásitos; así como su diversidad funcional a causa de su única nucleofilicidad, adaptabilidad a diferentes sustratos y estabilidad en diferentes ambientes biológicos, son blancos prometedores para el desarrollo de fármacos antiparasitarios (Sajid and McKerrow 2002; Verma et al. 2016).

La TvLEGU-1 de *T. vaginalis* perteneciente a la familia de las legumaínas del clan CD de las cisteína proteinasas, debido a su posible función como activador trans de otras proteasas y su participación durante los eventos de citoadherencia, así como su identidad como potencial biomarcador, es una posible proteína blanco para el desarrollo de un fármaco alternativo para el tratamiento de la tricomonosis. Por lo tanto, se requiere una plataforma de expresión que permita obtener la TvLEGU-1 recombinante en su conformación nativa, activable, incluyendo el correcto plegamiento y las modificaciones postraduccionales adecuadas, para futuras evaluaciones estructurales y funcionales.

HIPÓTESIS

La TvLEGU-1 es una cisteína proteinasa tipo legumáina perteneciente al clan CD que participa en la adhesión a la célula blanco y su precursor (TvLEGU-1) se puede expresar en forma recombinante enzimáticamente activa.

OBJETIVOS

General

Expresar de forma activa el fragmento de DNA que codifica para el precursor de la cisteína proteinasa de tipo legumaína TvLEGU-1 de *Trichomonas vaginalis*.

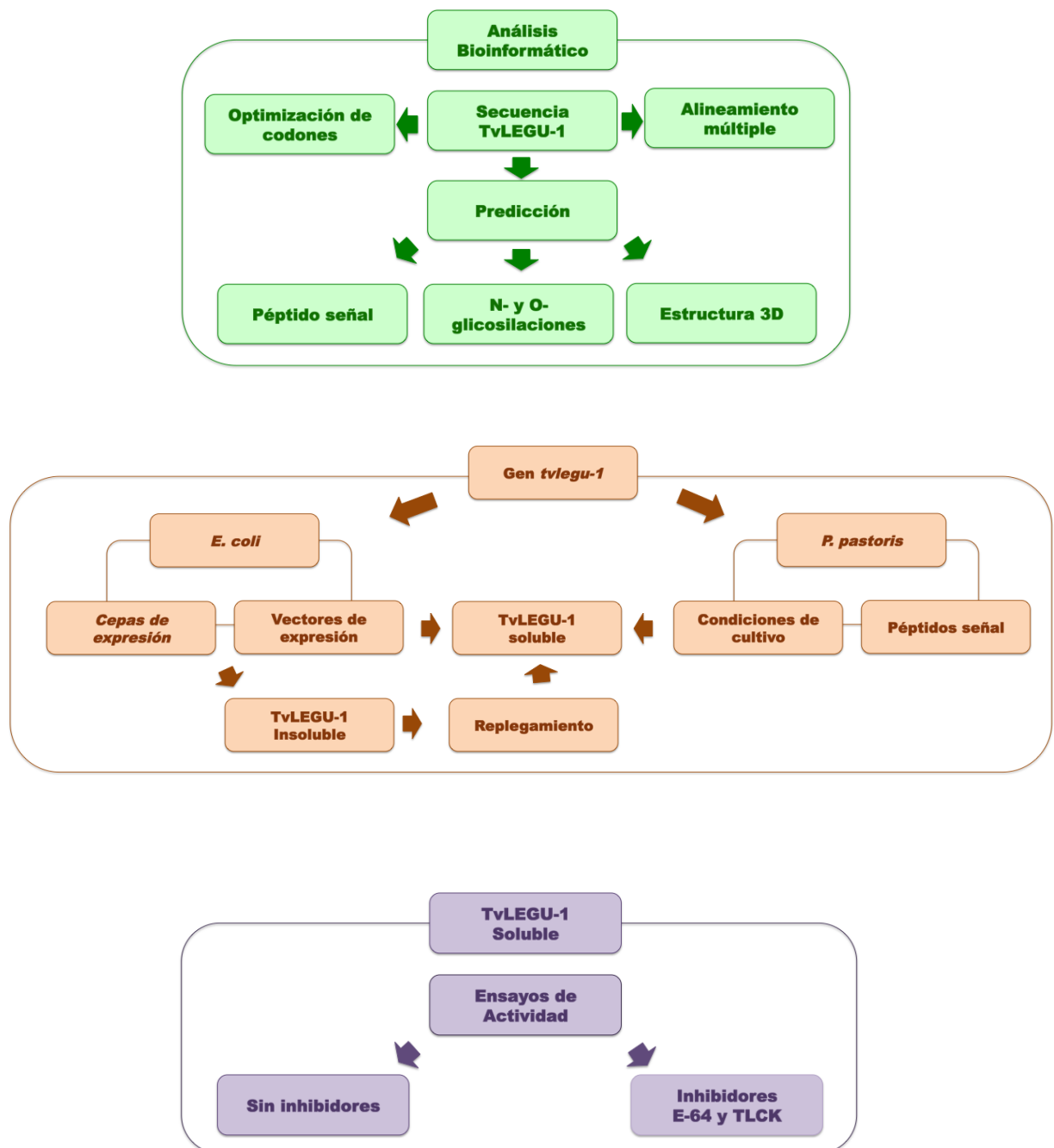
Específicos

- Realizar un análisis bioinformático de la secuencia de la TvLEGU-1.
- Expresar el precursor de la TvLEGU-1 utilizando las plataformas de expresión de la bacteria *E. coli* y la levadura *P. pastoris*.
- Determinar y validar la actividad de legumaína de la TvLEGU-1 recombinante.

MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental para el desarrollo y cumplimiento de los objetivos planteados en el proyecto se muestra en la **Figura 9**.

Figura 9. Estrategía experimental



Herramientas bioinformáticas utilizadas durante el análisis *in silico* de la secuencia de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis*

La secuencia primaria de la proteína TvLEGU-1, a expresar en forma recombinante en las plataformas de expresión de *E. coli* y *P. pastoris*, se analizó con el uso de distintas herramientas bioinformáticas disponibles en la red, con el objetivo de predecir algunas de las propiedades físicas, químicas y estructurales de la proteína.

El análisis de alineamiento múltiple de la secuencia de la TvLEGU-1 con la secuencia de las leguminaínas de humano (*Homo sapiens*) (gi|56682964|ref|NP_001008530.1|), ratón (*Mus musculus*) (gi|7242187|ref|NP_035305.1|), toro (*Bos taurus*) (gi|27806555|ref|NP_776526.1|), *S. mansoni* (gi|6851050|emb|CAB71158.1|) y soya (*Glycine max*) (gi|351720847|ref|NP_001236678.1|), para revisar su arquitectura y organización de los dominios proteicos que la conforman se llevó a cabo utilizando el programa InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Hunter et al. 2012). Mientras que para predecir la similitud de la TvLEGU-1 con respecto a la secuencia de algunas leguminaínas reportadas para otros organismos se realizó utilizando el programa de análisis de identidad y similitud de secuencias (SIAS, “sequence identity and similarity”, por sus siglas en inglés) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

La predicción de la presencia de alguna secuencia en el extremo N-terminal de la TvLEGU-1 que correspondiera a algún péptido señal se llevó a cabo mediante el servidor SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen et al. 2004).

La predicción de posibles sitios de O-glicosilación y/o N-glicosilación presentes en la TvLEGU-1 se hizo por medio de los programas NetOGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) y NetNGly 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), respectivamente.

Para modelar la estructura terciaria teórica de la proteína TvLEGU-1 se usó la herramienta I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang and Zhang 2015; Zhang 2008), basada en la estrategia de modelamiento por “Threading” o hilado tomando como modelo la estructura tridimensional (3D) reportada para las leguminaínas de humano (PDB: 4n6o, 4awb, y 4fgu) y ratón (4noj), obtenidas por cristalografía y analizadas por difracción de “rayos X”. Se evaluó la calidad del modelo calculando el “Z-score” con la

herramienta “Ramachandran plot evaluation”, una opción del servidor “What if” (<http://swift.cmbi.ru.nl/whatif/>).

Microorganismos, medios y condiciones de cultivo

Las técnicas de DNA recombinante se llevaron a cabo por manipulaciones en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* crecida en el medio Luria-Bertani (LB) (Tryptona 1%, Extracto de levadura 1%, NaCl 1%) y LB con baja sal (LB-baja sal) (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%), con ampicilina (100 μ g / mL) o zeocina (25 μ g / mL) como antibióticos de selección.

Durante la inducción de la expresión en el sistema de *E. coli* en algunos casos se utilizó el medio “Terrific” [(MT) Tryptona 1.2%, Extracto de levadura 2.4%, Glicerol 0.4% (v/v), amortiguado a pH 7.2 con una solución de KH₂PO₄ 0.17 M y K₂HPO₄ 0.72 M].

El sistema “EasySelect® Pichia Expression kit”, incluyendo la cepa *P. pastoris* X-33, el plásmido pPICZB, pPICZ α B, Zeocin y el Kit de Transformación “Pichia EasyComp™” se adquirieron de Invitrogen (San Diego, CA, EUA). Todos los oligonucleótidos usados se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA.). El plásmido pUC57-*tvlegu-1* que contiene el gen optimizado *tvlegu-1* (número de acceso KX812517 del Genbank) fue sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ, EUA). Las enzimas de restricción requeridas y la T4-DNA ligasa se obtuvieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). El anticuerpo Anti-His (C-term)-HRP se adquirió de Invitrogen. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico y obtenidos de diversas fuentes. La tinción de levaduras para su análisis por citometría de flujo se realizó con el kit de “LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit” (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA).

Los medios de cultivo para el crecimiento de *P. pastoris* se prepararon siguiendo las recomendaciones del manual “EasySelect® Pichia Expression kit” (Invitrogen) en YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%). Se utilizó zeocina (100 μ g / mL) como antibiótico de selección. Las transformantes de *P. pastoris* se cultivaron rutinariamente a 30 °C en medio YPD o medio complejo amortiguado con glicerol como fuente de carbono [(BMGY) Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Glicerol 1%, Base de nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos 1.34%, Biotina 4×10^{-5} %, Fosfato de potasio 100 mM (pH

6.0)]. El medio de inducción utilizado en este estudio fue el medio complejo amortiguado con metanol como fuente de carbono suplementado con casaminoácidos y EDTA [(BMMH-CA-EDTA), 1.34% Base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos, 4×10^{-5} % Biotina, 100 mM Fosfato de potasio (pH 6.0), casaminoácidos al 1% (p/v), EDTA 5 mM, se añadió metanol al 0.5% cada 24 h] y antiespumante “Antifoam 204” 0.01% (Sigma). La base nitrogenada de levadura sin aminoácidos se adquirió de Invitrogen. Hy-Case Amino (casaminoácidos) se adquirió de Sigma-Aldrich.

Vector de expresión pET-21b (+)

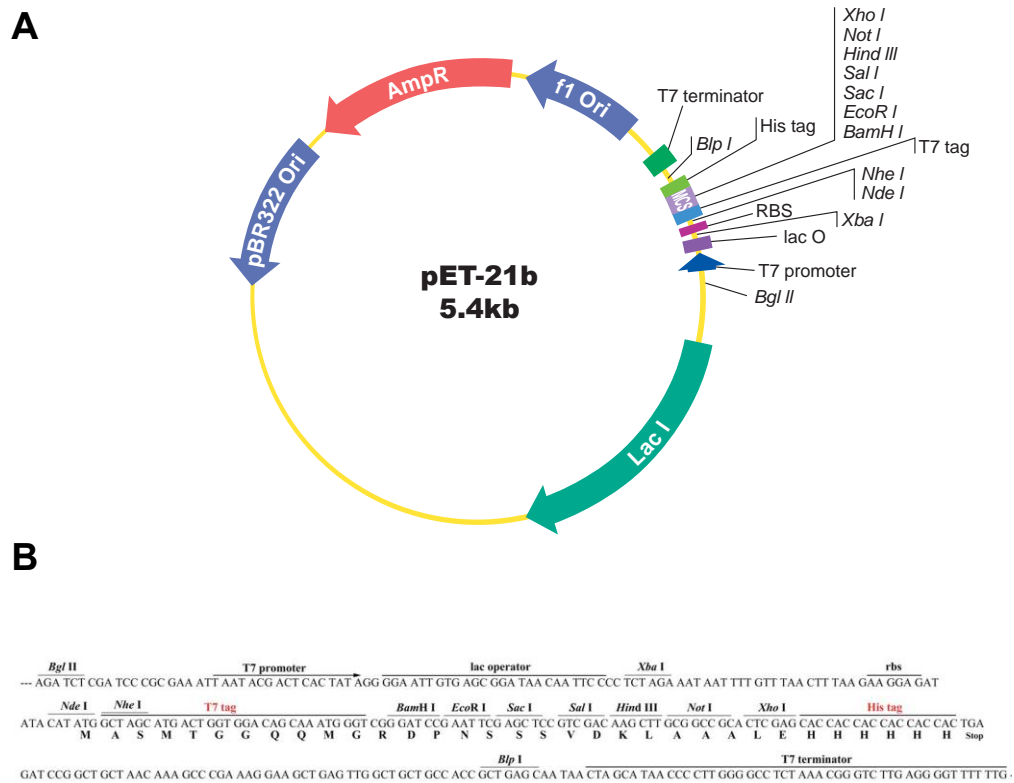
Muchos de los promotores presentes en los distintos vectores de expresión bacterianos no son fuertemente regulados y por lo tanto pueden presentar algún grado de expresión de la proteína recombinante de interés antes de la adición del inductor, fenómeno conocido como expresión basal (“leaky expression”). La expresión basal de proteínas puede resultar en la acumulación de proteínas recombinantes en forma de cuerpos de inclusión. Por lo tanto, el uso de promotores altamente regulados, tales como el promotor T7 de los vectores de expresión pET puede ayudar a regular la expresión de la TvLEGU-1 y de esta manera permitir su correcto plegamiento, evitando así su acumulación como cuerpos de inclusión (Makrides 1996; Studier 2005). Por lo cual con el objetivo de regular la expresión de la TvLEGU-1 recombinante y de esta manera evitar su acumulación como cuerpos de inclusión en el sistema de expresión de *E. coli*, una alternativa es la subclonación del gen *tvlegu-1* en un vector pET.

En el caso concreto de los sistemas de expresión pET (Novagen) la cepa de expresión contiene el DNA del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5 cuya actividad se induce por medio de la adición de IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). En este sistema, el vector de expresión pET utilizado para la expresión de la secuencia codificante para la proteína de interés, incorpora una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa, de manera que tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína a partir del vector (EMD Biosciences 2003; Furlong et al. 1992). Para realizar la subclonación dirigida del gen *tvlegu-1*, para su expresión en *E. coli*, se utilizó el vector de expresión pET-21b(+) (Novagen) cuyo mapa se muestra en la **Figura 10**. La expresión de genes clonados en este vector permite la

expresión de proteínas con la adición de una etiqueta de 6 histidinas (His-tag) en el extremo C-terminal de la proteína recombinante para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 10**).

Figura 10. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pET-21b (+)

A) Mapa del vector de expresión pET-21b (+) (5442 pb). **B)** Sitio múltiple de clonación donde se muestran las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas *Nde* I y *Bam*H I donde fue clonado el gen *tvlegu-1* (*Nde* I en el extremo 5' y *Bam*H I en el extremo 3') así como la secuencia que codifica para la etiqueta de 6 histidinas (extremo C-terminal). Además, este vector confiere resistencia a ampicilina (100 µg/mL) para facilitar la selección de clones transformantes.



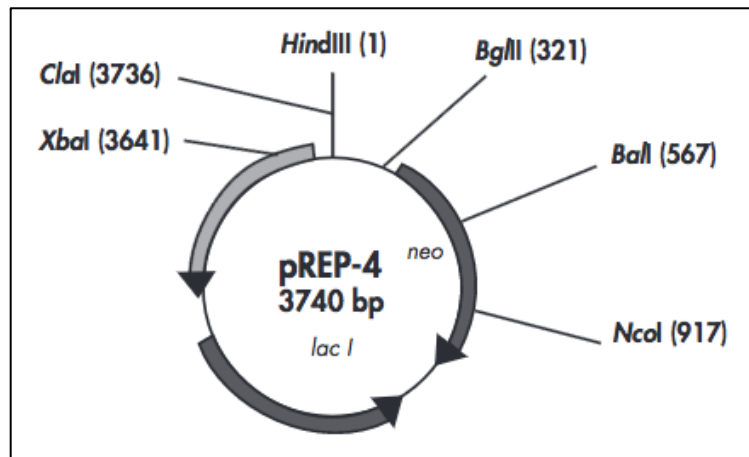
Vector pREP-4

El gen que codifica para la T7 RNA polimerasa contenido en el genoma de las cepas de *E. coli* (DE3), así como el gen de interés clonado en los vectores pET, se encuentran río abajo del sitio promotor/operador *lac*, por lo tanto, su transcripción es regulada y reprimida por la presencia de la proteína *lac*. Una manera eficiente de regular y reprimir la transcripción de estos genes es contar con la presencia de niveles elevados de la proteína represora *lac*.

El plásmido pREP-4, confiere resistencia a kanamicina y expresa constitutivamente la proteína represora *lac* codificada por el gen *lac I* (**Figura 11**). La presencia de múltiples copias del plásmido pREP-4 en las cepas de expresión puede asegurar la producción de altos niveles de la proteína represora, por lo tanto regular y reprimir la expresión tanto de las proteínas recombinantes como de la T7 RNA polimerasa. El vector pREP-4 confiere resistencia a kanamicina 25 µg / mL.

Figura 11. Mapa de restricción del plásmido pREP-4

El plásmido pREP-4, confiere resistencia a kanamicina y expresa constitutivamente la proteína represora *lac* codificada por el gen *lac I*.

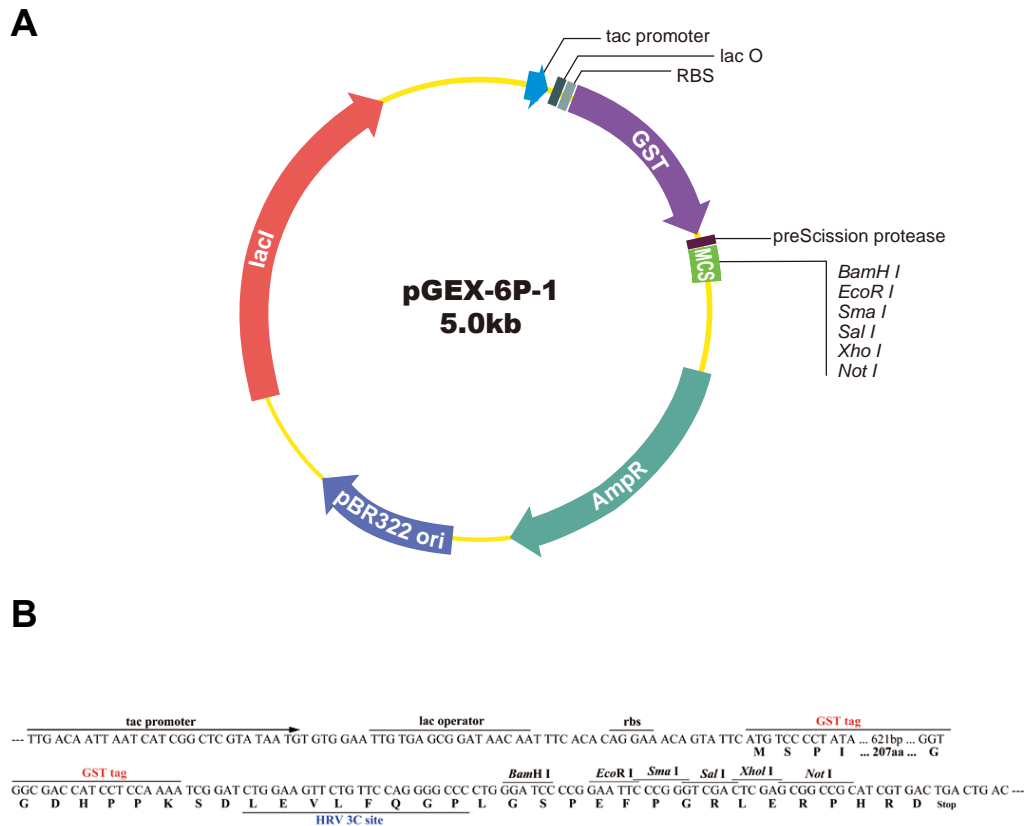


Vector de expresión pGEX-6P-1

Para realizar la subclonación dirigida del gen *tvlegu-1* que codifica para la TvLEGU-1, también se utilizó el vector de expresión pGEX-6P-1 (GE Healthcare) cuyo mapa se muestra en la **Figura 12**. En el caso del sistema pGEX (GE Healthcare) la expresión de las proteínas recombinantes no está sujeta a presencia de algún elemento integrado en el cromosoma de la bacteria que regule la expresión del gen de interés. En estos casos, los elementos reguladores del promotor para la expresión de proteínas recombinantes están incluidos en el vector, por lo que el mismo vector puede emplearse en combinación con diferentes cepas. La expresión de genes clonados en el vector pGEX-6P-1, permite una mayor solubilidad y estabilidad de las proteínas recombinantes al expresarse fusionadas a la glutatión S-transferasa (GST), lo que adicionalmente facilita su purificación mediante una cromatografía de afinidad a glutatión. El vector también contiene el sitio de corte para la HRV 3C (PreScission Protease)(GE Healthcare) (**Figura 12**) (Knaust 2000).

Figura 12. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pGEX-6P-1

A) Mapa del vector de expresión pGEX-6P-1 (4984 pb). **B)** Sitio múltiple de clonación donde se muestran las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas *BamH* I y *Not* I donde fue clonado el gen *tvlegu-1* completo (*BamH* I en el extremo 5' y *Not* I en el extremo 3'), la secuencia parcial que codifica para la glutatión S-transferasa (GST) (extremo N-terminal), así como el sitio de corte para la HRV 3C (PreScission Protease) (GE Healthcare). Además, este vector confiere resistencia a ampicilina (50 µg/mL) para facilitar la selección de clonas transformantes.

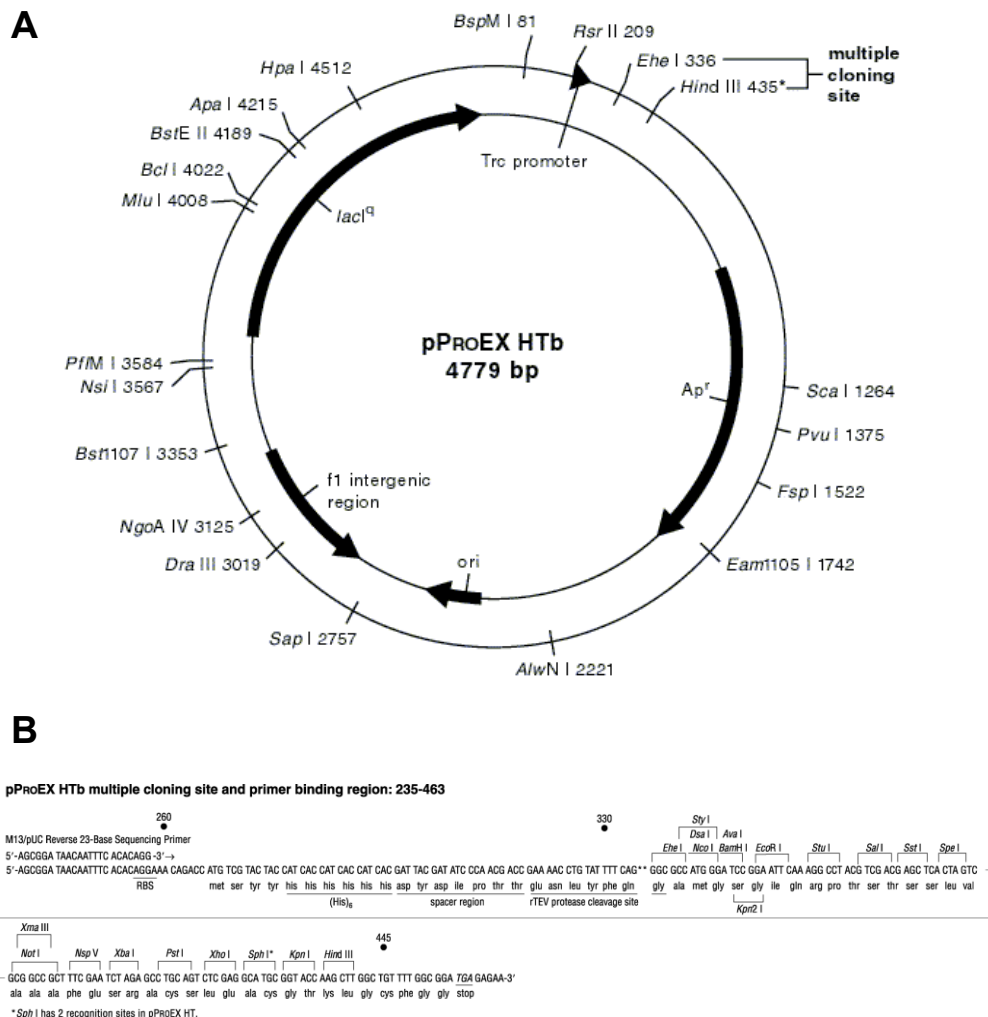


Vector de expresión pPROEX-HTb

Para realizar la subclonación dirigida del gen *tvlegu-1* completo que codifica para la TvLEGU-1, además se utilizó el vector de expresión pPROEX-HTb (Life Technologies) cuyo mapa se muestra en la **Figura 13**. El vector pPROEX-HTb contiene una secuencia que codifica para una etiqueta de seis histidinas (6xHis-tag) (**Figura 13**), que es añadida en el extremo N-terminal de la proteína recombinante, para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad a níquel; rio a bajo de esta secuencia se encuentra la secuencia codificante para el sitio de corte de la proteasa TEV de tabaco. La expresión de la proteína recombinante se encuentra regulada bajo el control del promotor sintético *trc* (Brosius et al. 1985), derivado de los promotores *trp* y *lacUV5* de *E. coli*.

Figura 13. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pPROEX-HTb

A) Mapa del vector de expresión pPROEX-HTb (4779 pb). B) Sitio múltiple de clonación donde se muestran las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas *BamH* I y *Not* I donde fue clonado el gen *tvlegu-1* (*BamH* I en el extremo 5' y *Not* I en el extremo 3'), la secuencia parcial que codifica para la etiqueta de 6 histidinas (6x His-tag) (extremo N-terminal), así como la secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV de tabaco. Además, este vector confiere resistencia a ampicilina (50 µg/ml) para facilitar la selección de clonas transformantes.

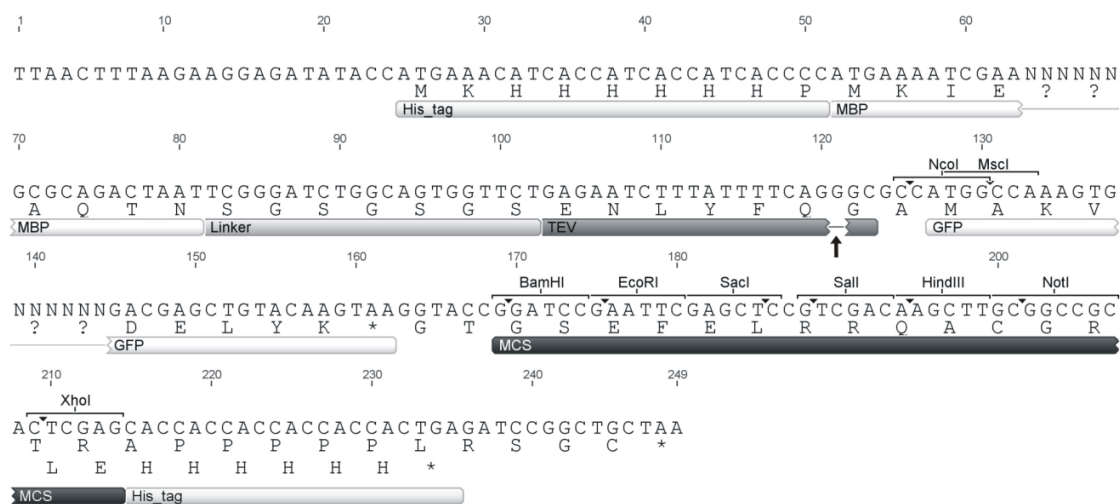


Vector de expresión pCri-1b

Para realizar la subclonación dirigida del gen *tvlegu-1* optimizado con codones preferenciales para *E. coli* y expresar la TvLEGU-1 fusionada al motivo de unión a maltosa (MBP), se utilizó el vector de expresión pCri-1b (Goulas et al. 2014) cuyo mapa se muestra en la **Figura 14**. El vector pCri-1b contiene una secuencia que codifica para una etiqueta de seis histidinas (6xHis-tag) (**Figura 14**), que es añadida en el extremo N-terminal de la proteína recombinante, para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad a níquel; enseguida de esta secuencia se encuentra la secuencia codificante para el motivo de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés), río a bajo se encuentra el sitio de corte de la proteasa TEV de tabaco. La expresión de la proteína recombinante se encuentra regulada bajo el control de la región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa, de manera que tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína a partir del vector (EMD Biosciences 2003; Furlong et al. 1992). El vector pCri-1b confiere resistencia a kanamicina (50 µg / mL).

Figura 14. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pCri-1b

Secuencia de nucleótidos y traducción del sitio múltiple de clonación del vector pCri-1b, donde se muestran las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas *Nde* I y *Not* I donde fue clonado el gen *tvlegu-1* completo con codones preferenciales para su expresión en *E. coli*. Fragmentos de la secuencia del MBP y de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) omitidas en la secuencia del mapa del vector (N). La flecha negra indica el sitio de corte específico de la proteasa TEV de tabaco. Tomado de: Goulas et al. (2014).



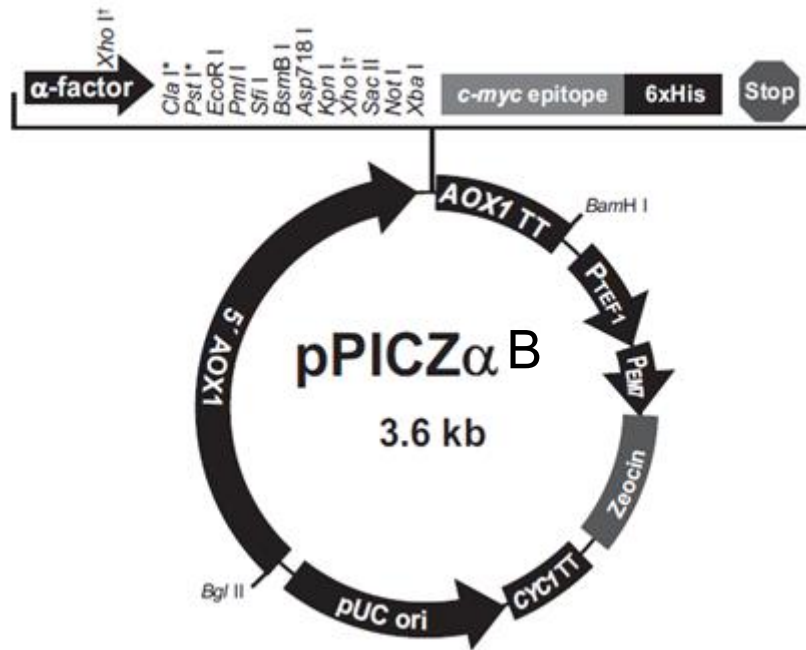
Vector de expresión pPICZ α B para el sistema de *P. pastoris*

El vector pPICZ α B (Invitrogen) fue seleccionado para la expresión de la TvLEGU-1 en *P. pastoris*. Los diferentes elementos del vector y su localización se ilustran en la **Figura 15**. El vector pPICZ α B de 3593 pb está diseñado para la expresión en la levadura *P. pastoris* y su mantenimiento en *E. coli*. Este vector está basado en el elemento promotor del gen de la alcohol oxidasa *AOX1* de *P. pastoris*, el cual permite altos niveles de expresión inducidos por metanol. Río abajo de la secuencia del promotor *AOX1* se encuentra la secuencia codificante para el péptido señal de secreción del α -factor de *S. cerevisiae*, que permite la translocación de las proteínas recombinantes a través de la vía de secreción. Posterior (río abajo) a la secuencia del péptido señal está el sitio múltiple de clonación, que contiene 10 sitios de restricción para diferentes enzimas. Los sitios utilizados en este proyecto son *Pst* I y *Not* I. Enseguida del sitio múltiple de clonación está la secuencia que codifica para una etiqueta del epítotope c-myc y una secuencia que codifica para una etiqueta de 6 histidinas (6xHis-tag). La etiqueta del epítotope c-myc permite la detección de la proteína expresada por el anticuerpo anti-myc, mientras que la etiqueta de poli-histidinas permite la fácil purificación de la proteína. Después de la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas está el codón de paro de la traducción TGA y le sigue la sección que contiene la región nativa *AOX1* TT (terminador de la transcripción). Esta región contiene el terminador de la transcripción y la señal de poliadenilación para el gen de la *AOX1* el cual mejora la estabilidad del mRNA. Las siguientes dos regiones son los promotores *TEF1* y *EM7*, seguidos por el gen *Sh ble* (gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*). El gen *Sh ble* confiere resistencia para Zeocina. El promotor *TEF1* es responsable de la expresión del gen de resistencia a Zeocina en *P. pastoris*, mientras que el promotor *EM7* causa expresión del gen de resistencia en *E. coli*. Como la región *AOX1* TT trabaja para el gen clonado, esta región mejora el procesamiento y estabilidad del mRNA del gen *Sh ble*. Finalmente, está el origen de replicación pUC del plásmido en *E. coli* (Invitrogen March 2009).

Figura 15. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pPICZ α B

A) Mapa del vector de expresión pPICZ α B (3593 pb). **B)** Sitio múltiple de clonación donde se muestran las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas *Pst* I y *Not* I donde fue clonado el gen *tvlegu-1* (*Pst* I en el extremo 5' y *Not* I en el extremo 3'), la secuencia parcial que codifica para el epítopo c-myc y la etiqueta de 6 histidinas (6x His-tag) (bases 1275-1337). Además, este vector confiere resistencia a Zeocina, 25 μ g / mL y 100 μ g / mL, para facilitar la selección de clones transformantes de *E. coli* y *P. pastoris*, respectivamente.

A



B

5' end of *AOX1* mRNA 5' *AOX1* priming site

811 AACCTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCAGCTGG TTCCAATGTA

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

α-factor signal sequence

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

Xho I*

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Kex2 signal cleavage Pst I EcoR I Pml I Sfi I BsmB I

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC TGCAG GAATTCAC GTGGCCAG CCGGCCGTC TCGGA
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

Ste13 signal cleavage

Asp718 I Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I c-myc epitope

1243 TCGGTACCTC GAGCCGCGGC GGCCGCCAGC TTTCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu

polyhistidine tag

1300 GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTA
Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1352 GCCTTAGACA TGACTGTTCC TCAGTTCAAG TTGGCACTT ACGAGAAGC CGGTCTTGCT

3' *AOX1* priming site

1412 AGATTCTAAT CAAGAGGATG TCAGAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCAATTTTT

3' polyadenylation site

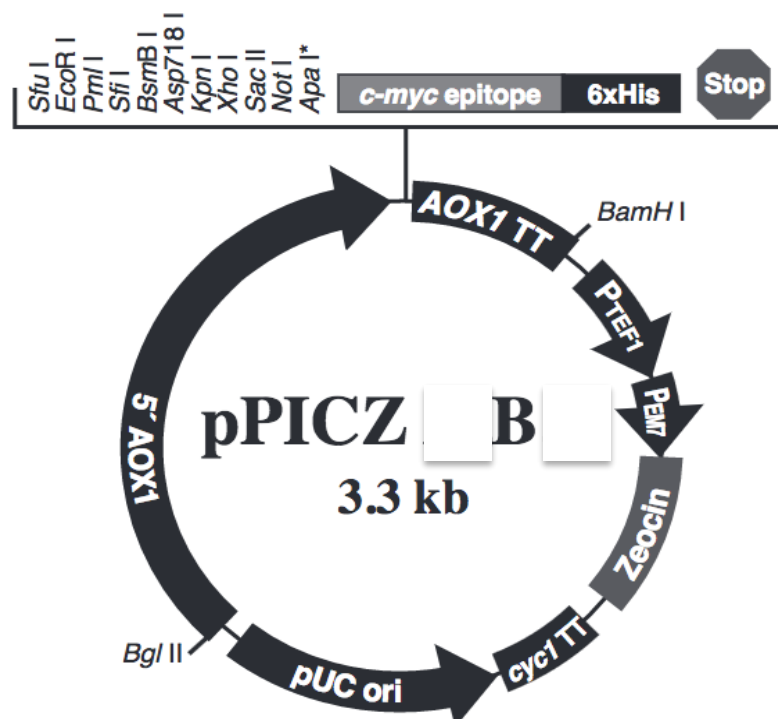
1472 GATACTTTTT TATTTGTAAC CTATATAGTA TAGGATTTTT TTTGTCATTT TGTTCTTCT

Vector de expresión pPICZB para el sistema de *P. pastoris*

El vector pPICZB (Invitrogen) fue seleccionado para la expresión intracelular de la TvLEGU-1, así como para su expresión fusionada a distintos péptidos señal de secreción en el sistema de *P. pastoris*. Los diferentes elementos del vector y su localización se ilustran en la **Figura 16**. El vector pPICZB de 3329 pb está diseñado para la expresión intracelular de proteínas en la levadura *P. pastoris* y su mantenimiento en *E. coli*. Este vector en comparación al vector pPICZaB carece de la secuencia que codifica para el péptido señal α -factor (Invitrogen March 2009).

Figura 16. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pPICZB

Mapa del vector de expresión pPICZB (3329 pb). En el sitio múltiple de clonación se muestran las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas *EcoR* I y *Not* I donde fue clonado el gen *tvlegu-1* optimizado con el uso de codones preferenciales para *P. pastoris*, la secuencia el diagrama que corresponde a la secuencia que codifica para el epítipo c-myc y la etiqueta de 6 histidinas (6x His-tag). Además, este vector confiere resistencia a Zeocina, 25 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, para facilitar la selección de clones transformantes de *E. coli* y *P. pastoris*, respectivamente.



Síntesis del gen *tvlegu-1* con el uso de codones preferenciales para los sistemas de expresión de *E. coli* y *P. pastoris*.

De acuerdo con la secuencia completa de DNA del gen *tvlegu-1* de *T. vaginalis* reportada en la base de datos del GenBank (Número de acceso AY326446; TVAG_426660) (Leon-Felix et al. 2004), la secuencia del gen correspondiente se optimizó con el uso de codones preferenciales para su expresión en los sistemas de expresión de *E. coli* y *P. pastoris* y fue sintetizada por GenScript USA (Piscataway, NJ. USA).

La secuencia del gen *tvlegu-1* optimizado (*tvlegu-1-opt*) con el uso de codones preferenciales para *P. pastoris* (Número de acceso del GenBank: KX812517) fue enviada en el plasmido pUC57-*tvlegu-1*.

La secuencia del gen *tvlegu-1* optimizado (*tvlegu-1-opt-e.coli*) con el uso de codones preferenciales para *E. coli* fue enviado en el plasmido pUC57-*tvlegu-1-e. coli*.

Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Sambrook 1989). Brevemente, se partió de la biomasa de un cultivo de 3 ml de *E. coli* en medio LB, la cual se separó por centrifugación $20,000 \times g$ por 2 min. El paquete celular obtenido se resuspendió en 100 μL del amortiguador de resuspensión P1 frío (ver **Apéndice I**) y se le adicionaron 200 μL del amortiguador de lisis P2 (**Apéndice I**) preparado en el momento, se mezcló suavemente y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 150 μL del amortiguador de neutralización P3 frío (**Apéndice I**) y se incubó durante 5 min a 4° C. El lisado celular obtenido se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C, se descartó la pastilla y se continuó trabajando con el sobrenadante, al cual se le adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, en una relación 25:24:1 (Sigma). La fase acuosa y orgánica se mezclaron vigorosamente y la emulsión se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4° C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga y el DNA plasmídico se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol. El DNA precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, la fase líquida se eliminó por decantación y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 1 h para posteriormente resuspenderla en 30 μL de agua grado biología molecular estéril y se almacenó a -20° C.

Preparación de células calcio-competentes

Un cultivo de células de *E. coli* se creció en 3 mL de medio LB, si es necesario se adiciona antibiótico (Ampicilina 100 µg / mL, kanamicina 25 µg /mL o 50 µg / mL) y se incubó a 37 °C a 250 rpm toda la noche. Posteriormente, se tomaron 1.6 mL del cultivo para inocular un matraz con 50 mL de medio LB y se incubó a 37 °C a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0.6. Después, se centrifugó el cultivo a 20,000 × g durante 10 min a 4 °C, la pastilla se recuperó y se resuspendió con 5 mL de CaCl₂ (0.1 M). Enseguida, se incubó en hielo durante 2 h. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C, la pastilla se resuspendió con 5 mL de CaCl₂ (0.1 M) estéril y se agregaron 88 µL de DMSO por cada mililitro de células en CaCl₂. Se hicieron alícuotas de 100 µL de células calcio-competentes y se almacenaron a -70 °C hasta su uso (Sambrook 1989).

Transformación de células calcio-competentes de *E. coli*

La transformación de células calcio-competentes de *E. coli* DH5α, BL21 (DE3), C41(DE3) / pREP-4 y SHuffle Express se realizó por el método de choque térmico. Las células competentes (50 µL) se transformaron con la mezcla transformante (ligación o plásmido) y se incubaron a 4 °C por 30 min. Posteriormente, se sometieron a choque térmico por 42 s a 42 °C, inmediatamente se incubaron en hielo por 3 min y después se adicionó 450 µl de medio LB sin antibiótico, se incubó a 37 °C por 1 h con agitación y se sembró en placas de LB-agar con el antibiótico (Ampicilina 100 µg /mL, kanamicina 25 µg / mL o 50 µg / mL) y se incubaron a 37 °C por 16 h. En el caso de la transformación de células químicamente competentes de *E. coli* DH5α durante la clonación en vectores de expresión para el sistema de *P. pastoris*, el antibiótico de selección fue zeocina (25 µg / mL).

Análisis del DNA en gel de agarosa

Las diferentes muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y 2 %, aplicándose 100 V durante 60 min en una cámara de electroforesis Owl B1A EasyCast® (ThermoFisher Scientific). Las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y la captura de imágenes se realizó utilizando un fotodocumentador

GelDoc™XR+ Gel Documentation System (BioRad). Como marcador de tamaño molecular se utilizaron los marcadores de 1kb DNA Ladder y 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Digestiones con enzimas de restricción

Cada uno de los fragmentos de DNA amplificados por PCR, el DNA plasmídico de los diferentes vectores de expresión y de las diferentes construcciones obtenidas se sometió a una doble digestión simultánea utilizando las enzimas de restricción *EcoR* I, *Kpn* I, *Pst* I, *Not* I, *Nde* I y *BamH* I (NEB). La digestión se llevó a cabo como se describe a continuación: 15 µL de DNA plasmídico (2.5 µg de DNA) o fragmento de DNA amplificado por PCR (2.5 µg de DNA), 1µL de cada una de las enzimas de restricción (20 unidades), 3 µL del amortiguador NEBuffer 10x (NEB) compatible con las enzimas de restricción, 1.5 µL de albumina de suero bovino (BSA) (20x) y la cantidad de agua necesaria para un volumen final de 30 µL. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 6 h.

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA correspondientes a los diferentes vectores de expresión y al gen *tvlegu-1*, previamente digeridos con las diferentes enzimas de restricción, se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1% por el método de extracción y purificación de DNA recomendado por el kit “Qiagen gel extraction kit”, para su posterior ligación.

Ligación de los fragmentos de DNA

Para llevar a cabo la reacción de ligación entre los fragmentos de DNA del gen *tvlegu-1* y cada uno de los vectores de expresión previamente digeridos y purificados, se preparó una reacción de ligación en una proporción 3:1 (inserto: vector) en un volumen final de 15 µL como sigue: 5 µL (100 ng) del inserto *tvlegu-1*, 3 µL (50 ng) del vector de expresión, 0.5 µL de la enzima T4 DNA ligasa (200 unidades) (NEB), 1.5 µL de amortiguador T4 DNA ligase 10x (NEB) y 5 µL de agua. La mezcla de ligación se incubó durante 16 h a 16° C y se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* DH5α con 1.5 µL de la mezcla de ligación.

Selección de clonas transformantes para confirmar la presencia de la construcción de interés

Las colonias resultantes de la transformación con cada una de las construcciones (clonas transformantes) que presentaron resistencia al antibiótico de selección fueron crecidas en 3 mL de medio LB o LB bajo en sales con la adición de antibiótico (Ampicilina 100 µg / mL, kanamicina 25 µg / mL o 50 µg / mL, zeocina 25 µg / mL) y se incubaron por 16 h a 37° C y 200 rpm en una incubadora con agitación orbital, posteriormente se les extrajo el DNA plasmídico utilizando del kit “QIAprep Spin Miniprep” (Qiagen). Con el DNA plasmídico obtenido se hicieron digestiones con las enzimas de restricción para confirmar la presencia del inserto correspondiente al gen *tvlegu-1*. Por último, el DNA plásmidico correspondiente a cada una de las construcciones obtenidas se envió a secuenciar para confirmar la secuencia nucleotídica.

Condiciones de PCR para la amplificación del gen *tvlegu-1* para su subclonación en diferentes vectores de expresión

La amplificación por PCR del fragmento de DNA del gen *tvlegu-1* se llevó a cabo utilizando un termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 94 °C por 5 min (precalentamiento); 30 ciclos de 94 °C por 30 s (desnaturalización), 50 °C por 30 s (alineamiento), 72 °C por 1 min (extensión) y 1 ciclo de 72 °C por 7 min. La reacción de amplificación a nivel preparativo se llevó a cabo un volumen de 50 µl con los siguientes componentes: 5 µl de amortiguador de reacción para Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen), 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 5 µl de DNA genómico de *T. vaginalis* (50 ng), 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (10 pmol/µl), 1 µl de Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen) y 36 µl de agua estéril. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, posteriormente se purificó a partir del gel con el kit “QIAquick Gel Extraction kit”.

Durante la amplificación del fragmento de DNA del gen *tvlegu-1* (opt) para su clonación en los plasmidos de expresión que contienen cada una las secuencias señal para *P. pastoris*, la reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 94 °C

por 5 min (precalentamiento); 30 ciclos de 94 °C por 30 s (desnaturalización), 55 °C por 30 s (alineamiento), 72 °C por 1 min (extensión) y 1 ciclo de 72 °C por 7 min.

Análisis de proteínas por SDS-PAGE

Para el análisis de proteínas de las muestras mediante SDS-PAGE, se adicionó 100 µL del amortiguador de muestra 2x SDS-PAGE a 100 µL de muestra (provenientes del sobrenadante del cultivo en el caso de *P. pastoris*, extracto total y la fracción soluble e insoluble tanto para *E. coli* y *P. pastoris*) y se hirvieron por 5 min. Las muestras procesadas de esta manera se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% de 0.75 mm de espesor en una cámara de electroforesis vertical (BioRad Mini-Protean® II Cell). Se utilizaron los marcadores de peso molecular “Precision Plus Protein Standards” (BioRad), y las bandas se visualizaron por tinción con el colorante azul de Coomassie.

Ensayo de Western blot de la TvLEGU-1 recombinante

En un recipiente con amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, Glicina 0.2M, Metanol 20%) frío se preparó el “sandwich” (evitando la formación de burbujas) en el siguiente orden: lado oscuro de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro Mini Trans-Blot® Filter paper (BioRad), gel de poliacrilamida a ser transferido (colocando los marcadores de peso molecular del lado derecho), membrana de nitrocelulosa (NC) de 0.45 µm (BioRad), papel filtro Mini Trans-Blot® Filter paper (BioRad), esponja y lado transparente de la unidad de transferencia. Enseguida, se colocó el lado negro de la unidad de transferencia coincidiendo con la cara negra de la cámara de transferencia, la cual se colocó en el tanque de transferencia junto con la unidad de enfriamiento. La transferencia se realizó con agitación suave en frío a 60 V durante 30 min y se aumentó el voltaje a 90 V durante 60 min. Para verificar la transferencia, las membranas de NC se tiñeron con solución de rojo de Ponceau (Sigma), se hizo la captura de la foto en el fotodocumentador y se destiñeron con una solución de PBS 1x; después las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo (Sveliflyt, Nestlé) al 10% en una solución de PBS 1x-Tween 20 al 0.05% toda la noche en agitación suave a 4° C.

Las membranas previamente bloqueadas que contienen la TvLEGU-1 recombinante, se incubaron a 4° C con agitación durante toda la noche con su respectivo anticuerpo primario

(anticuerpo anti-TvLEGU-1r policlonal [dilución 1:1000], anticuerpo anti-GSTr policlonal [dilución 1:3000], anti-péptido “NEVVAPKADAKI” policlonal [dilución 1:1000], o el anticuerpo anti-His tag acoplado a HRP [Anti-His(C-term)-HRP ,dilución 1:10,000]) en PBS 1x-Tween 20 al 0.05% y leche descremada en polvo al 5%. Las membranas se lavaron cinco veces con una solución de PBS 1x-Tween 20 al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de anticuerpo y disminuir inespecificidad durante el revelado. Las membranas de NC se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario respectivo (IgG anti-conejo o IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa) (BioRad) a una dilución 1:3000 en PBS 1x-Tween 20 al 0.05%-leche al 2.5%. La membrana de NC se lavó cinco veces por 10 min a temperatura ambiente con PBS 1x- Tween 20 al 0.1 % y se revelaron por quimioluminiscencia con “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” (ThermoScientific) y “SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate” (ThermoScientific) acorde a lo recomendado por el fabricante. La señal de quimioluminiscencia se detectó mediante la exposición de una placa radiográfica XOMat (Kodak ®) o mediante el uso de un fotodocumentador (ChemiDoc™XRS Gel Documentation System, BioRad).

Obtención de las diferentes construcciones para expresar la TvLEGU-1 en *E. coli*

Subclonación del gen nativo *tvlegu-1* en el vector de expresión pET-21b (+)

Para subclonar el fragmento de DNA que codifica para el precursor completo de la TvLEGU-1 en el vector pET-21b, primero el DNA plasmídico de la construcción pColdI-*tvlegu-1* (Rodríguez-Cabrera 2007b) se sometió a una doble digestión simultánea con las enzimas de restricción *Nde I* y *BamH I*. Un fragmento de aproximadamente 1.2 kb que se liberó durante la digestión, correspondiente al gen *tvlegu-1*, se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%.

Adicionalmente, el DNA plasmídico del vector pET-21b (+) también se digirió simultáneamente con las mismas enzimas. La banda correspondiente al plásmido linearizado (5.442 kb) se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%.

Los fragmentos de DNA correspondientes al gen *tvlegu-1* y el vector pET-21b (+) se ligaron como previamente se describió para obtener la construcción pET-21b (+)-*tvlegu-1*.

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *tvlegu-1* para su subclonación en los vectores de expresión pGEX-6P-1 y pPROEX-HTb

Con base en la secuencia de DNA del gen *tvlegu-1* (Leon-Felix et al. 2004), se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes para los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante para el precursor completo de la TvLEGU-1, adicionando los sitios de restricción para las enzimas *BamH I* y *Not I*, respectivamente. Se eligieron estos sitios de restricción para la subclonación dirigida del gen *tvlegu-1* en el vector de expresión pGEX-6P-1 (GE Healthcare), ya que forman parte del sitio múltiple de clonación de este vector y no se encuentran presentes en la secuencia del gen a clonar; además de que el gen queda en fase río abajo de la secuencia codificante para la glutatión S-transferasa (GST) (extremo N-terminal) y la secuencia de corte de la "PreScission Protease" (GE Healthcare). El fragmento de DNA del gen *tvlegu-1* amplificado por PCR con estos oligonucleótidos también se utilizó para la subclonación dirigida en el vector de expresión pPROEX-HTb (Life Technologies), ya que también forman parte del sitio múltiple de clonación de este vector. La secuencia y nombre de estos oligonucleótidos se muestra en la **Tabla 1**. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente (Sigma-Aldrich) y se hidrataron con agua estéril a una concentración de 10 pmol / μ L para su uso y se almacenaron a -20° C.

Tabla 1. Oligonucleótidos sintetizados para la amplificación del gen *tvlegu-1* para su subclonación en los vectores de expresión pGEX-6P-1 y pPROEX-HTb.

Oligo	Enzima	Secuencia	Vectores
Directo	5' <i>BamH I</i>	CTGAGGATCCATGTTCTGCCTC TTCAGCTCGC	pGEX-6P-1/ pPROEX-HTb
Reverso	5' <i>Not I</i>	TATGCGGCCGCTGTTAGCAGATG GCATCAATAGC	pGEX-6P-1/ pPROE-HTb

Subclonación del fragmento de DNA del gen *tvlegu-1* en los vectores de expresión pGEX-6P-1 y pPROEX-HTb

El fragmento de DNA del gen *tvlegu-1* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos respectivos de la **Tabla 1** y DNA genómico de *T. vaginalis* como DNA molde. Posteriormente el producto de PCR se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%.

Tanto el producto de PCR del fragmento del gen *tvlegu-1* previamente purificado, así como el DNA plasmídico de los vectores pGEX-6P-1 y pPROEX-HTb, se sometieron a una doble digestión con las enzimas *BamH* I y *Not* I. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los fragmentos de DNA con los sitios cohesivos *BamH* I y *Not* I se purificaron a partir del gel.

Con los fragmentos de DNA del gen *tvlegu-1* y de los vector pGEX-P6-1 y pPROEX-HTb previamente cortados y purificados se preparó una reacción de ligación para obtener las construcciones *tvlegu-1*-pGEX-6P-1 y *tvlegu-1*-pPROEX-HTb.

Subclonación del gen *tvlegu-1-opt-e. coli* optimizado en el vector de expresión pCri-1b (+)

Para subclonar el fragmento de DNA que codifica para el precursor completo de la TvLEGU-1 en el vector pCri-1b, primero el DNA plasmídico de la construcción pUC57-*tvlegu-1-opt-e. coli* enviada por GenScript USA (Piscataway, N.J. USA) se sometió a una doble digestión simultánea con las enzimas de restricción *Nde* I y *Not* I. Un fragmento de aproximadamente 1.2 kb que se liberó durante la digestión, correspondiente al gen *tvlegu-1*, se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%.

Adicionalmente, el DNA plasmídico del vector pCri-1b también se digirió simultáneamente con las mismas enzimas. La banda correspondiente al plásmido linearizado (7.2 kb) se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%.

Los fragmentos de DNA correspondientes al gen *tvlegu-1-opt-e. coli* y el vector pCri-1b se ligaron como previamente se describió para obtener la construcción *tvlegu-1-opt-e. coli* - pCri-1b.

Condiciones de expresión de la TvLEGU-1 utilizando las construcciones *tvlegu-1*-pET-21b (+), *tvlegu-1*-pGEX-6P-1, *tvlegu-1*-pPROEX-HTb y *tvlegu-1-opt-e. coli*-pCri-1b en las cepas de expresión *E. coli* C41(DE3) / pREP-4, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* SHuffle Express y *E. coli* BL21(DE3), respectivamente.

Una colonia de cada una de las cepas de expresión de *E. coli* previamente transformadas con el respectivo DNA plasmídico de cada una de las construcciones se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 1L con 100 mL de medio y el respectivo antibiótico de selección, los cultivos se incubaron controlando la temperatura y agitación en una incubadora con agitación orbital (MRC Orbital Shaker Incubator). Una vez alcanzada cierta densidad óptica (600 nm) se indujo la expresión de la TvLEGU-1 con la adición de IPTG y se mantuvo el cultivo a una agitación y temperatura controlada por el tiempo restante de la inducción. En la **Tabla 2** se presentan las condiciones de expresión específicas que se utilizaron para la inducción de la expresión de la TvLEGU-1 en las cepas de *E. coli* cuando se utilizaron las construcciones pET-21b- *tvlegu-1* (+), pGEX-6P-1- *tvlegu-1*, pPROEX-HTb- *tvlegu-1* y pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli*.

El análisis de la expresión se realizó por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), para lo cual se centrifugó 1 mL de cultivo y se preparó bajo condiciones desnaturizante.

Tabla 2. Condiciones de expresión específicas que se utilizaron para la expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de expresión de *E. coli* cuando se utilizaron las construcciones *tvlegu-1*-pET-21b (+), *tvlegu-1*-pGEX-6P-1, *tvlegu-1*-pPROEX-HTb y *tvlegu-1-opt-e. coli*-pCri 1b.

Construcción	Cepa de <i>E. coli</i>	Medio y antibiótico de resistencia	Condiciones de cultivo	Condiciones de Inducción de la expresión
<i>tvlegu-1</i> -pET-21b (+)	C41(DE3) / pREP-4	Medio Terrific Ampicilina (100 µg / mL) Kanamicina (25 µg /mL)	37 °C y 200 rpm	0.6 de D.O 600 nm, 0.5 mM IPTG, 37 °C y 200 rpm por 6 h
<i>tvlegu-1</i> -pGEX-6P-1	<i>BL21</i> (DE3)	Medio Terrific Ampicilina (100 µg / mL)	37 °C y 200 rpm	0.6 de D.O 600 nm, 0.5 mM IPTG, 37 °C y 200 rpm por 6 h
<i>tvlegu-1</i> -pPROEX-HTb	SHuffle Express	Medio LB Ampicilina (100 µg / mL)	37 °C y 200 rpm	0.6 de D.O 600 nm, 0.5 mM IPTG, 37 °C y 200 rpm por 4 h
<i>tvlegu-1-opt-e. coli</i> -pCri-1b.	<i>BL21</i> (DE3)	Medio LB Kanamicina (50 µg / mL)	37 °C y 250 rpm	0.5 de D.O 600 nm, 0.5 mM IPTG, 20 °C y 250 rpm por 16 h

Análisis de la solubilidad de la TvLEGU-1 y condiciones para purificación por afinidad a níquel a partir de la fracción soluble

Para analizar la solubilidad de la TvLEGU-1 al término de la inducción, 100 mL del cultivo se centrifugaron a 4500 rpm por 30 min a 4°C y la pastilla celular se resuspendió en 4 mL de amortiguador de lisis (**Apéndice I**); después se adicionó lisozima (1 mg / mL, se incubó por 30 min a 4° C con agitación constante, se le agregó DNAsa (0.01 mg / mL) durante 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min y se separó el sobrenadante (fracción soluble) de la pastilla (fracción insoluble).

Una vez que se confirmó por SDS-PAGE y WB la presencia de la TvLEGU-1 en la fracción soluble, esta se pasó a través de una columna con 1 mL de resina de afinidad a níquel “Ni Sepharose™ 6 Fast Flow” (GE Healthcare Bio Sciences AB) previamente equilibrada con 20 mL de amortiguador de lisis (**Apéndice I**) a un flujo de 1 mL / min. Posteriormente, la columna se lavó con 15 mL del amortiguador de lavado (**Apéndice I**) para eliminar la proteína unida inespecíficamente. La proteína se eluyó mediante un gradiente por pasos con una mezcla de amortiguador de lavado y amortiguador de elución (**Apéndice I**) a concentraciones 100, 200 y 500 mM de Imidazol. Se tomaron muestras de cada etapa de la purificación y se analizaron por SDS-PAGE y WB.

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *tvlegu-1* para su subclonación en los diferentes vectores de expresión para *P. pastoris*

Oligonucleótidos para amplificar el gen *tvlegu-1* para su subclonación en el vector pPICZαB

Con base en la secuencia de DNA de gen *tvlegu-1* (Leon-Felix et al. 2004), se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes para los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante para el precursor de la TvLEGU-1 sin la secuencia que codifica para los primeros cuatro aminoácidos, adicionando los sitios de restricción para las enzimas *Pst* I y *Not* I, respectivamente. Se eligieron estos sitios de restricción para la subclonación dirigida en el vector de expresión pPICZαB (Invitrogen), ya que forman parte del sitio múltiple de clonación de este vector y no se encuentran presentes en la secuencia del gen *tvlegu-1* a

clonar; además de que el gen queda en fase río abajo de la secuencia codificante para el péptido señal de secreción del α -factor de *S. cerevisiae* (extremo N-terminal) y la secuencia codificante para el epítipo c-myc y la etiqueta de histidinas (6x His-tag). La secuencia y nombre de estos oligonucleótidos se muestra en la **Tabla 3**. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente (Sigma-Aldrich) y se hidrataron con agua estéril a una concentración de 10 pmol / μ L para su uso y se almacenaron a -20 °C.

Oligonucleótidos para la amplificación fragmento de DNA codificante para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70

Con base en la secuencia de DNA del vector MAT α 57-70/HRP, se observó que se podía utilizar el oligonucleótido para secuenciación 5'AOX1 para amplificar por su extremo 5' al fragmento de DNA que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70, aprovechando que tanto para la secuencia del vector pPICZ α B (Invitrogen) como para el vector MAT α 57-70/HRP, rio arriba de este oligonucleótido se encuentra el sitio de restricción para la enzima *Hind* III (5'-AAGCTT-3'). Por lo tanto, para amplificar por su extremo 3' el fragmento de DNA que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70, se diseñó el oligonucleótido correspondiente adicionando el sitio de restricción *Pst* I, que está contenido en el sitio múltiple de clonación del vector pPICZ α B (Invitrogen). Se eligieron estos sitios de restricción para la subclonación dirigida en el vector de expresión pPICZ α B (Invitrogen), ya que forman parte del sitio múltiple de clonación de este vector y no se encuentran presentes en la secuencia de DNA que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70. En la **Figura 17** se muestra la secuencia de DNA que codifica para el péptido señal α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* contenida en el vector expresión pPICZ α B (Invitrogen), así como la secuencia de DNA que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 contenida en el vector MAT α 57-70/HRP. Una alícuota de este vector fue amablemente donado por la Dra. Joan Lin-Cereghino de la Universidad del Pacífico (California, USA) (Lin-Cereghino et al. 2013). La secuencia y nombre de estos oligonucleótidos se muestra en la **Tabla 3**. Estos oligonucleótidos fueron

sintetizados químicamente (Sigma-Aldrich) y se hidrataron con agua estéril a una concentración de 10 pmol/ μ L para su uso y se almacenaron a -20° C.

Oligonucleótidos para amplificar el gen *tvlegu-1-opt* que codifica para la TvLEGU-1 para su expresión de manera intracelular en *P. pastoris*

Con base en la secuencia de DNA de gen *tvlegu-1-opt* (Número de acceso del GenBank: KX812517). Para lograr este objetivo, se diseñaron oligonucleótidos que contienen la secuencia del gen que codifica para la TvLEGU-1, flanqueado en el extremo 5'→3' tanto por la secuencia consenso Kozak tomada del gen *AOX1* (GAAACGATGNN) que permitirá el reconocimiento del inicio de la traducción del gen *tvlegu-1-opt* en *P. pastoris* (Primer ATG), así como la secuencia del sitio de restricción *EcoR* I y en su extremo 3'→5' el sitio de restricción *Not* I. Se eligieron estos sitios de restricción para la subclonación dirigida en el vector de expresión intracelular pPICZB (Invitrogen), ya que forman parte del sitio múltiple de clonación de este vector y no se encuentran presentes en la secuencia del gen *tvlegu-1* a clonar. La secuencia y nombre de estos oligonucleótidos se muestra en la **Tabla 3**. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente (Sigma-Aldrich) y se hidrataron con agua estéril a una concentración de 10 pmol / μ L para su uso y se almacenaron a -20° C.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *tvlegu-1* para su subclonación en los diferentes vectores de expresión para el sistema de *P. pastoris*

Oligo	Dirección	Sitio	Secuencia	Vector
Directo	5'→3'	<i>Pst</i> I	ATA CTGCAGC ACAGCTCGCAAGGTGTGATAGATTCGCAG	pPICZαB
Reverso	5'→3'	<i>Not</i> I	TAT GCGGCCG CCTTAGCAGATGGCATCAATAGCAGC	pPICZαB
5'AOX1	5'→3'	N/A	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	MATα 57-70/HRP
Reverso	5'→3'	<i>Pst</i> I	CTGCAGC CTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAG	MATα 57-70/HRP
Directo	5'→3'	<i>EcoR</i> I	CCGA ATT CGAA ACG ATGTTTTGCCTTCTTCAACTTGCTAG ATGTGACAGATTCGCC	pPICZB
Reverso	5'→3'	<i>Not</i> I	TT GCGGCCG CACAAATGGCGTCAATAGCTGCTTTAATG	pPICZB

pPICZαB: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *tvlegu-1-opt* para su clonación en el vector expresión pPICZαB. Sitios de restricción *Pst* I y *Not* I (negrita). Nucleótidos adicionales para manter en fase el gen *tvlegu-1* en el vector pPICZαB (cursivas)

MATα 57-70/HRP: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la secuencia de DNA que codifica para el péptido señal modificado MATα: Δ 57-70 contenida en el vector MATα 57-70/HRP. Sitios de restricción *Pst* I (negrita).

pPICZB: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *tvlegu-1-opt* para su expresión intracelular en *P. pastoris* utilizando el vector pPICZB. Sitios de restricción *EcoR* I y *Not* I (negrita). secuencia consenso Kozak tomada del gen *AOX1* (GAAACGATGNN) que permitirá el reconocimiento del inicio de la traducción del gen *tvlegu-1-opt* en *P. pastoris* (Primer **ATG**).

Figura 17. Secuencia de DNA que codifica para los péptidos señal α -MF y MAT α Δ 57-70 de *Saccharomyces cerevisiae*

Se muestra la secuencia de DNA que codifica para el péptido señal α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* contenida en el vector expresión pPICZ α B (Invitrogen), así como la secuencia de DNA que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 contenida en el vector MAT α 57-70/HRP, una alícuota de este vector fue amablemente donado por la Dra. Joan Lin-Cereghino de la Universidad del Pacífico (California, USA) (Lin-Cereghino et al. 2013). También se presenta la secuencia de los oligonucleótidos utilizados (subrayado en rojo), así como los sitios de restricción para las enzimas de restricción *Hind* III (5'-aagctt-3', en cursiva) y *Pst* I (5'-ctgcag-3', en cursiva).

MAT α 57-70/HRP

tttatcatcattattagcttactttcataattgcgactggtccaattgacaagcttttg
atTTtaacgactTTtaacgacaacttgagaagatcaaaaaaactaattattcgaaacg
atgagatttccttcaatTTttactgctgTTTTattcgcagcatcctccgattagctgct
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A
ccagtcaacactacaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgtcatcggt
P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G
tactcagatttagaaggggatttcgatgTTgctgTTTTgccattttccgccagcattgct
Y S D L E G D F D V A V L P F S A S I A
gctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggctgaagctcagttaaccct
A K E E G V S L E K R E A E A Q L T P

pPICZ α B

tttatcatcattattagcttactttcataattgcgactggtccaattgacaagcttttg
atTTtaacgactTTtaacgacaacttgagaagatcaaaaaaactaattattcgaaacg
atgagatttccttcaatTTttactgctgTTTTattcgcagcatcctccgattagctgct
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A
ccagtcaacactacaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgtcatcggt
P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G
tactcagatttagaaggggatttcgatgTTgctgTTTTgccattttccaacagcacaat
Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N
aacgggttattgTTtataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaagggta
N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V
ctctcgagaaaagagaggctgaagctgcaggaattcacgtggccagccggccgctcgcg
S L E K R E A E A A G I H V A Q P A V S
gatcggatcctcgagccgcgccgcccagctttctagaacaaaaactcatctcagaag
aggatctgaatagcgcgctcgaccatcatcatcatcattga

Obtención de las diferentes construcciones para expresar la proteína TvLEGU-1 en el sistema de *P. pastoris*

Subclonación del gen nativo *tvlegu-1* en el vector de expresión pPICZ α B

Para subclonar el fragmento de DNA que codifica para el precursor de la TvLEGU-1 sin los primeros cuatro aminoácidos en el vector pPICZ α B, el fragmento de DNA del gen nativo *tvlegu-1* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos respectivos (**Tabla 3**) utilizando DNA genómico de *T. vaginalis* como DNA molde. Posteriormente, el producto de PCR se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%.

Tanto el producto de PCR del fragmento del gen *tvlegu-1* previamente purificado, así como el DNA plasmídico del vector pPICZ α B, se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Pst* I y *Not* I. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificaron. Con los fragmentos de DNA del gen *tvlegu-1* y del vector pPICZ α B previamente cortados y purificados se preparó una reacción de ligación para obtener las construcciones pPICZ α B- *tvlegu-1*. Con la construcción pPICZ α B- *tvlegu-1* obtenida se transformaron células de *P. pastoris* X-33 y se evaluó la inducción de la expresión y secreción de la TvLEGU-1 recombinante.

Subclonación del gen nativo *tvlegu-1* en el vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70

Para subclonar el fragmento de DNA codificante para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 en el vector pPICZ α B, primero el fragmento de DNA se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos respectivos (**Tabla 3**) utilizando el DNA plasmídico del vector MAT α 57-70/HRP como DNA molde. El producto de PCR se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%.

Tanto el producto de PCR del fragmento de DNA codificante para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70, así como el DNA plasmídico del vector pPICZ α B, se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Hind* III y *Pst* I. Durante la digestión del vector pPICZ α B se eliminaría la secuencia codificante para el péptido señal de secreción del α -factor de *S. cerevisiae* y sería substituido posteriormente, durante la subclonación, por el fragmento de DNA codificante para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70. Los productos de

digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los fragmentos de DNA con los sitios cohesivos *Hind* III y *Pst* I, se purificaron a partir del gel y con ellos preparó una reacción de ligación para obtener el vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70.

Para subclonar el fragmento de DNA que codifica para el precursor de la TvLEGU-1 sin los primeros cuatro aminoácidos en el vector pPICZB- MAT α : Δ 57-70, el DNA plasmídico del vector pPICZB-MAT α : Δ 57-70, se digirió con las enzimas de restricción *Pst* I y *Not* I. El producto de digestión se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificó a partir del gel. Con el fragmento de DNA del gen *tvlegu-1* previamente obtenido y el fragmento de DNA del vector pPICZB-MAT α : Δ 57-70 previamente cortado y purificado, se preparó una reacción de ligación para obtener las construcciones pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1*. Con la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70- *tvlegu-1* obtenida se transformaron células de *P. pastoris* X-33 y posteriormente se evaluó la inducción de la expresión y secreción de la TvLEGU-1 recombinante.

Subclonación del gen *tvlegu-1-opt* en el vector de expresión intracelular pPICZB

El fragmento de DNA del gen *tvlegu-1* (opt) se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos respectivos (**Tabla 3**) y DNA plasmídico del vector pUC57-*tvlegu-1* como DNA molde. El producto de PCR se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%. Tanto el producto de PCR del fragmento del gen *tvlegu-1* (opt) previamente purificado, así como el DNA plasmídico del vector pPICZB, se sometieron a una doble digestión con las enzimas *EcoR* I y *Not* I. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificaron. Con los fragmentos de DNA del gen *tvlegu-1* (opt) y del vector pPICZB previamente cortados y purificados se preparó una reacción de ligación para obtener las construcciones pPICZB- *tvlegu-1* (opt). Con la construcción pPICZB- *tvlegu-1* (opt) obtenida se transformaron células de *P. pastoris* X-33 y posteriormente se evaluó la inducción de la expresión intracelular de la TvLEGU-1 recombinante por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y WB.

Transformación de la levadura *P. pastoris* X-33 con cada una de las distintas construcciones para la expresión de la TvLEGU-1 recombinante

El DNA plasmídico (5 µg) de cada una de las distintas construcciones, para la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en *P. pastoris*, se linearizó con la enzima de restricción *Sac* I. Los esferoplastos de células de la cepa X-33 de *P. pastoris* se transformaron con cada uno de los vectores linearizados de acuerdo con las instrucciones del kit de transformación “*Pichia* EasyComp™ Transformation Kit”. Las células transformantes se seleccionaron por su habilidad para crecer en placas de YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%, Agar 2%) que contenían Zeocina (100 µg / mL).

Amplificación por PCR para analizar la integración del cassette de expresión en el DNA genómico de las levaduras transformantes

Para determinar directamente la integración del plásmido de expresión al DNA genómico de la levadura se utilizó el método reportado por Linder y colaboradores en 1996 (Linder et al. 1996) como se describe a continuación: Cada clona transformante se creció en un tubo de ensaye con 5 mL de medio YPD durante 24 h a 30° C y 200 rpm. Posteriormente, se tomaron 10 µL de cada cultivo y se centrifugaron a 20,000 × g por 5 min. La pastilla se resuspendió en 10 µL de agua (desionizada/esterilizada). A cada alícuota se le agregó 5 µL de Liticasa (5U / µL) y se incubó durante 10 min a 30° C. La muestra se congeló a -80° C por 10 min.

La amplificación por PCR del fragmento de DNA que corresponde al cassette de expresión se llevó a cabo en un volumen de 50 µL como se describe: 5 µL de amortiguador de reacción para Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen), 5 µL de una solución de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de una mezcla de dNTPs 10 mM, 5 µL de del lisado celular de cada cultivo de levaduras transformantes, 1 µL del oligonucleótido 5'AOXI (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3')(10 pmol / µL), 1 µL del oligonucleótido 3'AOXI (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')(10 pmol / µL), 1µL de Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen) y 31 µL de agua estéril. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La reacción de PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: un

ciclo de 94° C por 2 min (precalentamiento); 25 ciclos de 94° C por 1min (desnaturalización), 55° C por 1 min (alineamiento), 72° C por 1 min (extensión) y 1 ciclo de 72° C por 7 min.

Evaluación de la resistencia a zeocina de las transformantes de *P. pastoris*

Para evaluar la resistencia a zeocina, se seleccionaron transformantes para las cuales previamente se confirmó la presencia del cassette de expresión y se crecieron en 3 mL de medio YPD líquido sin zeocina a 30° C y 200 rpm durante 16 h. Posteriormente cada clona se sembró por estría en placas de YPD-Agar que contenía diferentes concentraciones de zeocina (100, 250, 500 y 1000 µg / mL).

Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en las transformantes *P. pastoris* X-33 pPICZαB-*tvlegu-1* y *P. pastoris* X-33 pPICZB-MATα: Δ 57-70-*tvlegu-1*

Una colonia de la levadura *P. pastoris* X-33 transformada con cada una de las construcciones, pPICZαB-*tvlegu-1* o pPICZB-MATα: Δ 57-70-*tvlegu-1*, se creció en 20 mL de medio BMGY contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL a una temperatura de 30° C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica OD600 de aproximadamente 20. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3000 × g y la biomasa se resuspendió en 200 mL del medio BMMY contenidos en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se incubó a una temperatura de 30° C y 250 rpm. La inducción de la expresión de la TvLEGU-1 se llevó a cabo con la adición de metanol a una concentración final de 0.5 % (v/v) cada 24 h durante 48 h. Así mismo, una colonia de la cepa nativa *P. pastoris* X-33 se creció e indujo bajo las mismas condiciones (control negativo de expresión de la TvLEGU-1). La expresión de TvLEGU-1 recombinante se comprobó por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y WB con el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1.

Inducción de la expresión de TvLEGU-1 en *P. pastoris* a escala de 2L utilizando la transformante *P. pastoris* X-33-pPICZαB-*tvlegu-1*

La inducción de la expresión de TvLEGU-1 en *P. pastoris* se llevó a cabo en un biorreactor de 2 L Applikon (Applikon Biotechnology). El cultivo se realizó empleando dos etapas: lote con glicerol y lote alimentado con metanol. La primera etapa se llevó a cabo a 30°

C y pH 5 en 1 L de medio de sales basales (FBS) con 50 g / L de glicerol como fuente de carbono, hasta que se agotó (22-24 h). La segunda etapa se inició 24 h después de iniciar el cultivo, una vez que el glicerol del medio se consumió, evento que se identificó mediante el registro de un aumento en el oxígeno disuelto. En esta etapa se reajustó el pH a 6 y se inició la alimentación con 100 % de metanol (6.5 mL / L h y sales PTM1) por al menos 60 h. El valor del oxígeno disuelto se mantuvo por arriba del 20% de saturación con suplementación de mezclas de oxígeno-aire según fue necesario. Del cultivo se evaluó el crecimiento celular mediante la lectura de la densidad óptica O.D.600 nm.

Cultivo de lote con glicerol

La jarra de 2 L del biorreactor conteniendo 1 L del medio de sales basales (FBS) y glicerol como fuente de carbono (26.7 mL / L H_3PO_4 al 85 %, 0.93 g / L de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 18.2 g / L K_2SO_4 , 14.9 g / L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.13 g / L KOH, 50 g / L de glicerol) se esterilizó en una autoclave. Después de la esterilización, la temperatura en el medio de cultivo se ajustó a 30° C, la aireación a 1 vvm (1 L aire / L medio min), la agitación a 700 rpm y el pH se ajustó a 5 con una solución de NH_4OH al 30 %. Antes de proceder a la inoculación, se añadieron al medio de cultivo 2 mL de biotina 500 X (0.02 % concentración final), 2 mL de sales PTM1 ($CuSO_4$ 24 mM, NaI 0.53 mM, $MnSO_4$ 19.87 mM, Na_2MoO_4 0.83 mM, H_3BO_3 0.32 mM, $CoCl_2$ 2.10 mM, $ZnCl_2$ 0.15 mM, $FeSO_4$ 0.23 mM) y 0.01 % de antiespumante “Antifoam 204” (Sigma-Aldrich Co). El medio de cultivo se inoculó con una alícuota de 10 mL de inóculo previamente preparado. Esta etapa el cultivo se mantuvo a 30° C, con 1 vvm de aireación (1 L aire / L medio min), una agitación de 700 rpm y el pH se controló a 5 con una solución de NH_4OH al 30 %, hasta que se agotó la fuente de carbono (glicerol) que fue evidenciado por un aumento brusco en el registro del oxígeno disuelto en el medio de cultivo (22-24 h).

Cultivo por lote alimentado con metanol (inducción de la expresión)

Esta etapa se realizó por 60 h con la adición de metanol al 100%, conteniendo 12 mL / L de biotina 0.02 % y 12 mL / L de sales PTM1, con una bomba peristáltica del módulo de control del biorreactor de 2 L (Applikon) a un flujo de 6.5 mL /L h. El valor del oxígeno

disuelto se mantuvo al 20 %, esto fue posible al mantener una agitación entre 700 y 1000 rpm, así como con la adición de una mezcla de oxígeno puro y aire a un flujo de entre 1-1.5 y 0.2-0. vvm, respectivamente. Al final de esta etapa se recuperó el medio de cultivo utilizando una bomba peristáltica a través de uno de los puertos de alimentación del fermentador. El medio de cultivo se centrifugó en frascos de poliestireno de 200 mL a 3500 x g durante 30 min para separar el medio de cultivo libre de células. Posteriormente, tanto el medio de cultivo libre de células como la biomasa obtenida se almacenaron a 4°C para su posterior análisis por SDS-PAGE y ensayos de WB.

Diseño de Oligonucleótidos que codifican para distintos péptidos señal de secreción en *P. pastoris*

Los vectores de expresión que contienen las diferentes secuencias de DNA que codifican para los distintos péptidos señal de secreción derivados de los genes de la alfa amilasa de *Aspergillus niger*, de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori*, de la inulinasa de *Kluyveromyces maxianus*, de la invertasa de *S. cerevisiae*, de la proteína “killer” de *S. cerevisiae*, de la lisozima de *Gallus gallus* y de la albumina de suero de *Homo sapiens*, que facilitan la expresión y secreción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* se construyeron como sigue. Los oligonucleótidos complementarios 5´ fosforilados (**Tabla 4**) (**Apéndice II**) se alinearon en un termociclador (**Tabla 5**); los oligonucleótidos complementarios hibridados que contienen los sitios complementarios de restricción de las enzimas *EcoR* I-*Kpn* I se clonaron en el vector pPICZB en los mismos sitios de restricción, para crear los plásmidos con diferentes péptidos señal (**Tabla 11**). El producto de ligación se transformó por choque térmico a 42° C en células de *E. coli* DH5α calcio-competentes. Las transformantes se seleccionaron en placas de LB-Agar con Zeocina (25 µg / mL). Las clonas positivas se eligieron mediante un análisis de restricción, la orientación y fidelidad de la secuencia se verificó mediante secuenciación (**Apéndice III**). Los oligonucleótidos que codifican para los distintos péptidos señal contienen la secuencia consenso Kozak (5´-GAAACGATG-3´, sitio de inicio de la traducción en negritas) del gen *AOX 1*, actuando como sitio de inicio de la translación (Cavener and Ray 1991; Kozak 1999).

Tabla 4. Oligonucleótidos complementarios 5´fosforilados que codifican para los diferentes péptidos señal

Nombre	Origen	Secuencia 5´-3´
Péptido señal de la alfa amilasa (AA)	<i>Aspergillus niger</i>	Oligonucleótido directo: <u>AATTCGAAACGATGGTCGCTTGGTGGTCTTTGTTT</u> CTGTACGGTCTTCAGGTCGCTGCACCTGCTTTGGC <u>TGGTAC</u> Oligonucleótido complementario reverso: CAGCCAAAGCAGGTGCAGCGACCTGAAGACCGTA CAGAAACAAAGACCACCAAGCGACCATCGTTTCG
Péptido señal de la glucoamilasa (GA)	<i>Aspergillus awamori</i>	Oligonucleótido directo: <u>AATTCGAAACGATGTCTTTTAGATCCTTGTTGGCT</u> TTGTCTGGTTTGGTTTGTCTGGTTTGGCTGGTAC Oligonucleótido complementario reverso: CAGCCAAACCAGAACAAACCAAACCAGACAAAG CCAACAAGGATCTAAAAGACATCGTTTCG
Peptide señal de la albumina de suero (SA)	<i>Homo sapiens</i>	Oligonucleótido directo: <u>AATTCGAAACGATGAAGTGGGTTACCTTTATCTCT</u> TTGTTGTTTCTTTTCTCTTCTGCTTACTCTGGTAC Oligonucleótido complementario reverso: CAGAGTAAGCAGAAGAGAAAAGAAACAACAAG AGATAAAGGTAACCCACTTCATCGTTTCG
Péptido señal de la inulinasa (IN)	<i>Kluyveromyces maximus</i>	Oligonucleótido directo: <u>AATTCGAAACGATGAAGTTAGCATACTCCTTGTTG</u> CTTCATTGGCAGGAGTCAGTGCTGGTAC Oligonucleótido complementario reverso: CAGCACTGACTCCTGCCAATGGAAGCAACAAGGA GTATGCTAACTTCATCGTTTCG
Péptido señal de la invertasa (IV)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oligonucleótido directo: <u>AATTCGAAACGATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTC</u> CTTTGGCTGGTTTGCAGCCAAAATATCTGCAGG

		<u>TAC</u> Oligonucleótido complementario reverso: CTGCAGATATTTTGGCTGCAAAACCAGCCAAAAG GAAAAGGAAAGCTTGCAAAAGCATCGTTTCG
Péptido señal de la lisozima (LZ)	<i>Gallus gallus</i>	Oligonucleótido directo: <u>AATTC</u> GAAACGATGCTGGGTAAGAACGACCCAAT GTGTCTTGTTTTGGTCTTGTTGGGATTGACTGCTTT GTTGGGTATCTGTCAAGGTGGTAC Oligonucleótido complementario reverso: CACCTTGACAGATACCCAACAAAGCAGTCAATCC CAACAAGACCAAAACAAGACACATTGGGTCGTTC TTACCCAGCATCGTTTCG

Todos los oligonucleótidos directos contienen la secuencia consenso Kozak que corresponde a la secuencia del inicio de la translación del gen *AOX1* (cursivas), donde **ATG** es el sitio de inicio de la traducción (negritas), en el extremo 5' el sitio compatible-cohesivo de la enzima de restricción *EcoR* I sin la primera Guanina (G) (por ejemplo, AATTC)(subrayado) y en el extremo 3' el sitio compatible-cohesivo de la enzima de restricción *Kpn* I sin la primera citosina (C) (por ejemplo, GGTAC)(subrayado).

Tabla 5. Condiciones de alineamiento de los oligonucleótidos complementarios 5´fosforilados en el termociclador.

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Paso 1:	1	95	5
Paso 2:	40*	95 (-1°C/ciclo)	1
Paso 3:	1	55	30
Paso 4:	20*	55 (-1°C/ciclo)	1
Paso 5:		4	Constante

(*) La notación -1°C/ciclo indica que la temperatura disminuye en 1° C por ciclo.

Clonación del gen *tvlegu-1-opt* en los plásmidos de expresión que contienen un péptido señal diferente para su expresión y secreción en *P. pastoris*

El plásmido pUC57-*tvlegu-1-opt* se usó como DNA molde para la amplificación por PCR del gen *tvlegu-1-opt* usando los iniciadores (**Tabla 6**). El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificó a partir del gel. La reacción de ligación entre el fragmento del gen *tvlegu-1-opt* y el DNA plasmídico de cada uno de los distintos vectores que contienen la secuencia de DNA que codifica para los diferentes péptidos señal de secreción (**Tabla 11**), se transformó en células de *E. coli* DH5 α calcio-competentes. Con las diferentes construcciones obtenidas se transformó células de *P. pastoris* X-33 y posteriormente se evaluó la inducción de la expresión y secreción de la TvLEGU-1 recombinante por SDS-PAGE y WB.

Tabla 6. Oligonucleótidos sintetizados para la amplificar el gen *tvlegu-1-opt* para su expresión y secreción en *P. pastoris* utilizando los diferentes péptidos señal de secreción.

Oligo		Enzima	Secuencia
Directo	5'	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCAATGTTTTGCCTTCTTCA ACTTGCTAGATGTGACAG
Reverso	5	<i>Not</i> I	TTGCGGCCGCACAAATGGCGTCAATA GCTGCTTTAATG

Ensayos de inducción de la expresión y secreción de la TvLEGU-1 a pequeña escala con las clonas de *P. pastoris* X-33 transformadas con los distintos cassettes de expresión

Una colonia de *P. pastoris* X-33 transformada con cada una de las construcciones previamente obtenidas que contienen la secuencia de DNA que codifica para la TvLEGU-1 fusionada a los diferentes péptidos señal de secreción, se creció en 10 mL de medio BMGY en tubos cónicos de 50 mL a una temperatura de 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica OD 600 nm de entre 4-6. Posteriormente, cada cultivo se centrifugó a 3000 x g y la biomasa se resuspendió en 10 mL del medio BMMY en tubos cónicos de 50 mL y se incubaron a una temperatura de 30° C y 250 rpm, la inducción de la expresión se llevó a cabo con la adición de metanol a una concentración final de 0.5 % (v/v) cada 24 h durante 48 h. Así mismo, una colonia de la cepa nativa *P. pastoris* X-33 se creció e indujo bajo las mismas condiciones (control negativo de expresión de la TvLEGU-1). Para comprobar la expresión y secreción de TvLEGU-1 recombinante, se llevó a cabo un ensayo de “Dot-blot” con muestras de los sobrenadantes libres de células de cada uno de los cultivos, utilizando anticuerpos policlonales anti-TvLEGU-1.

Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en sobrenadantes por un ensayo tipo “Dot-blot”

El ensayo de “Dot-blot” se realizó en una placa de 96 pozos usando un colector de microfiltración “Bio-dot microfiltration manifold” (BioRad). Muestras (100 μ L) de cada uno de los sobrenadantes libres de células de distintos cultivos se absorbieron en una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m (BioRad), previamente humedecida en PBS 1 \times , aplicando un flujo de vacío constante. Una vez aplicadas las muestras, la membrana se lavó tres veces adicionando PBS 1 \times a cada uno de los pozos donde se había colocado las muestras, aplicando un flujo de vacío constante; después la membrana se bloqueó con leche descremada en polvo al 10 % en PBS 1 \times -Tween 20 al 0.05 % (PBS-T) toda la noche en agitación suave a 4 °C, se enjuagó con PBS-T.

La membrana se incubó a 4 °C con agitación durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-His tag acoplado a HRP (Anti-His(C-term)-HRP; dilución 1: 10,000) en una solución de PBS-T y leche descremada en polvo al 5%. La membrana se lavó 5 \times con PBS-T durante 10 min a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de anticuerpo y disminuir inespecificidades durante el revelado. Posteriormente, la membrana se lavó cinco veces por 10 min a temperatura ambiente con una solución de PBS 1 \times - Tween 20 al 0.1 %. Al terminar los lavados se reveló por quimioluminiscencia con el kit “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” (ThermoScientific) y “SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate” (ThermoScientific) acorde a lo recomendado por el fabricante. La señal de quimioluminiscencia se detectó y registró en el fotodocumentador ChemiDocTMXRS (BioRad).

Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en las transformantes *P. pastoris* X-33 pPICZB-AA-tvlegu-1-opt

Una colonia de *P. pastoris* X-33 transformada con la construcción pPICZB-AA-tvlegu-1-opt, se creció en 100 mL de medio BMGY en un matraz Erlenmeyer de 250 mL a una temperatura de 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica OD600 de entre 2-6. El cultivo se centrifugó a 3000 x g y la biomasa se resuspendió en 100 mL del medio BMMY-CA-EDTA en un matraz Erlenmeyer bafleado de 1 L y se indujo con la adición de metanol a

una concentración final de 0.5% (v/v) cada 24 h durante 48 h. La inducción de la expresión de TvLEGU-1 con metanol se llevó a cabo a dos diferentes temperaturas 30 y 16 °C, para estudiar el efecto de la expresión de la TvLEGU-1 sobre la levadura *P. pastoris*. Así mismo, una colonia de la cepa nativa *P. pastoris* X-33 se creció e indujo bajo las mismas condiciones (control negativo de expresión de la TvLEGU-1). La expresión de TvLEGU-1 recombinante, se detectó por SDS-PAGE y WB con anticuerpos monoclonales Anti-His(C-term)-HRP, dilución 1: 10,000.

Correlación entre la densidad óptica a 600 nm y el peso seco

Para determinar el peso seco de la biomasa de los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*, muestras de 5 mL por duplicado se filtraron y lavaron con agua destilada a través de membranas de celulosa (0.22 µm, Millipore), secadas y pesadas previamente. Los filtros que contenían la biomasa de los cultivos se secaron a 80 °C, se enfriaron en un desecador y se pesaron. Se correlacionó las medidas de densidad óptica a 600 nm (OD 600 nm) y peso seco para un cultivo de 40 h de la cepa X-33 de *P. pastoris*; ambas cantidades fueron directamente proporcionales a la densidad del cultivo. Se obtuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0.9953 para la correlación entre el peso seco y la densidad óptica a 600 nm.

Determinación del peso seco para las clonas transformantes de *P. pastoris* durante las cinéticas de crecimiento

Muestras de 5 mL se tomaron cada 24 h del cultivo de cada clona recombinante durante los ensayos de expresión en matraces, se determinó la densidad óptica OD_{600nm} mediante el uso de un espectrofotómetro de UV-Vis y se convirtió a peso seco (g / L) usando la curva previamente obtenida.

Lisis mecánica de levaduras

El botón celular de 100 mL de cada cultivo inducido con metanol se resuspendió en 10 mL del amortiguador de lisis (Fosfato de Sodio 50 mM, pH 7.4, glicerol 5 %, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM). Posteriormente, se agregó un volumen igual de perlas de vidrio (426 a 600 µm,

Sigma), previamente lavadas en una solución de HCl 5 M, y se llevó a cabo la lisis celular mediante la agitación de la suspensión en un vortex con 8 ciclos de agitación durante 30 s con intervalos de incubación en hielo durante 30 s.

Determinación del número de copias del gen *tvlegu-1-opt* usando PCR digital de gota “Droplet digital PCR (ddPCR)”

El número de copias de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* se determinó por ddPCR como se describió previamente por Camara y col., en el 2016 (Camara et al. 2016). Para realizar la ddPCR, primero se aisló DNA genómico de las levaduras transformantes con la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* usando el kit de purificación de DNA “QIAmp® DNA blood”. El DNA genómico se cortó con las enzimas de restricción *BamH* I y *EcoR* I, para obtener fragmentos más pequeños que 5 kb y evitar la fragmentación del gen de interés *tvlegu-1-opt*. Teniendo en cuenta 6000 copias de genoma por microlitro como el rango dinámico óptimo para el sistema QX100 “Droplet Digital™ PCR Application guide” (Bio-Rad), 0.4 ng del DNA genómico digerido de cada muestra se añadió a la mezcla de reacción, lo que equivale a 40,000 copias del genoma de *P. pastoris*. Para la amplificación del fragmento de DNA del gen *tvlegu-1-opt*, se diseñaron tanto oligonucleótidos y una sonda que contiene el fluoróforo “CAL Fluor Orange 560 (CalFluor560)” en su extremo 5'. Para normalizar los datos, se usó el gen de la actina beta de *P. pastoris* (*ACT1*) como control endógeno, para el cual también se diseñó un par de oligonucleótidos junto con una sonda que contiene el fluoróforo “6-fluorescein amidite (6-FAM)” en su extremo 5'. A ambas sondas se les adicionó el bloqueador “Black Hole Quencher-1 (BHQ-1)” en su extremo 3' (**Tabla 7**). Cada PCR se realizó en una mezcla de reacción de 20 µL como a continuación se describe: 10 µL de la mezcla de “ddPCR™ Supermix for Probes” (BioRad), 900 nM de cada primer, 250 nM de cada sonda, 0.4 ng de DNA genómico cortado y la cantidad necesaria de agua libre de DNAsas/RNAsas. Las gotas que contienen las diferentes mezclas de reacción se formaron usando un generador de gotas “Droplet Generator” (BioRad) y se transfirieron a una placa de PCR de 96 pozos. Las reacciones se incubaron a 95 °C durante 10 min para activar la polimerasa “hot-start” y se sometieron a protocolo de dos pasos que incluye, un paso de 30 s a 94 °C y un paso de 1 min a 61 °C por 40 ciclos. La detección de fluorescencia se llevó a cabo

usando el sistema “QX100 Droplet Digital PCR System” y el programa “Software Quanta Soft v.1.1.38” (BioRad). El número de copias para cada clona se obtuvo calculando el cociente entre la señal positiva para el gen *tvlegu-1-opt* y la señal del gen *ACT1*.

Tabla 7. Oligonucleótidos y sondas usadas para el ensayo de PCR digital de gota (ddPCR).

Nombre	Amplicón (pb)	Tm	% GC	Secuencia 5´-3´
Oligo directo TvL	142	63	50	AATCACGGTGGACCAGGTAT
Oligo reverso TvL	-	63.3	45	AACAGGCCTCAATACCGAAA
Oligo directo ACT1	121	61.9	45	ATGTTCCCAGGTATTGCTGA
Oligo reverso ACT1	-	62.3	50	TAGAACCACCGATCCATACG
Sonda TvL	-	73.2	59	TCCACCAGGGACACCATCTGGA
Sonda ACT1	-	72.4	54.5	TGCCTTGGCTCCATCTTCGATG

Tm, temperatura de alineamiento (en °C); % GC, contenido de guanina y citosina de los oligonucleótidos (en %). TvL: gen *tvlegu-1*, ACT1: gen de la actina beta de *P. pastoris*.

Determinación de la viabilidad celular por un análisis de citometría de flujo

Para los ensayos de citometría de flujo, muestras de los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* se lavaron con una solución estéril de NaCl al 0.9% y se resuspendieron a una OD 600 nm final de 1. A cada muestra se le agregó 1 µL de SYTO-9 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y 1 µL de yoduro de propidio (IP;

Molecular Probes), se agitaron cuidadosamente en vortex y se incubaron a temperatura ambiente, protegiéndoles de la luz, durante 15 a 30 min antes de ser analizadas mediante citometría de flujo, tal como lo indica el kit “LIVE/DEAD® Yeast Viability kit”. Todas las mediciones de citometría se realizaron utilizando el citómetro de flujo BD LSRFortessa™ SORP con láseres de excitación RFP de 488 nm y 561 nm (BD Biosciences, San José, CA, USA). Se midieron 203 células por análisis. Como controles negativo y positivo se usaron células no tratadas y células de *P. pastoris* X-33 sometidas a estrés térmico a 75°C, respectivamente. Las regiones de análisis se construyeron combinando los puntos de fluorescencia rojos y verdes para diferenciar entre las diversas subpoblaciones celulares. Se colectó la fluorescencia verde en el canal FITC-A (525/50) para células teñidas con SYTO-9 (eje X) frente a la fluorescencia roja que se colectó en el canal A - PE- Rojo de Texas (610/20) para células teñidas con ioduro de propidio (eje Y). Para todas las mediciones, las señales se recogieron utilizando una escala logarítmica. Las levaduras que se tiñeron con SYTO-9 pero que se excluyeron de la tinción con IP se localizaron dentro de la región Q3 (**Figura 48** y **Figura 53**). El porcentaje de células teñidas con IP se calculó posteriormente a partir de la región (Q2) con respecto al número total determinado solamente por la tinción con SYTO-9. Se aplicó rutinariamente una gráfica de puntos entre el tamaño celular (FSC, “forward-scattered light”, por sus siglas en inglés) y la granularidad (SSC, “side-scattered light”, por sus siglas en inglés) para excluir los residuos celulares e incluir una población de células individuales de tamaño similar para el análisis de citometría de flujo. Los datos de citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo vx 0.7 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

Medición de la actividad proteolítica de legumaina en los sobrenadantes y su validación por especificidad de sustrato

La actividad proteolítica de legumaina se midió por la hidrólisis del sustrato fluorogénico específico Z - Ala - Ala - Asn - MCA (benciloxicarbonil - L - alanil - L - alanil - L - asparagina - 4 - metil - coumaril - 7 - amida): 3209 - v, Peptide Institute Inc., Osaka, Japón) como se ha descrito previamente (Johansen et al., 1999). La mezcla de reacción (200 µL) conteniendo ácido cítrico 39.5 mM, Na₂HPO₄ 121 mM, pH 5.8, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, CHAPS (ácido 3[(3-colamidopropil) dimetilamonio] propanosulfónico) 0.01%, Z-Ala-Ala-Asn-MCA (10 µM, concentración final) y el sobrenadante libre de células (50 µl) se

colocó en una placa opaca Nunc™ de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se realizaron las mediciones, basadas en el aumento de la fluorescencia durante 5 h. La temperatura se mantuvo a 30 ° C, y todas las mediciones se realizaron por triplicado. La liberación de MCA se midió mediante longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 460 nm, respectivamente en un espectrofluorómetro (Gemini EM Microplate Reader, Molecular Devices, USA) utilizando el software de análisis de datos SoftMax Pro (Molecular Devices, USA). Para la actividad relativa, se trazó la pendiente máxima media de la curva derivada de las tres repeticiones cuantificadas en unidades fluorescentes relativas por hora (RFU h⁻¹) usando el software Sigma Plot (Systat Software Inc. San José, CA, USA). La actividad específica (RFU μg⁻¹h⁻¹) se calculó dividiendo la fluorescencia relativa (RFU μl⁻¹h⁻¹) entre el peso seco (g L⁻¹) determinado para cada tiempo. La especificidad del sustrato se midió mediante el monitoreo de la actividad enzimática en presencia de E-64 0.18 mM y TLCK 1 mM utilizados como potentes inhibidores de CPs de tipo papaína y CPs tipo legumaína, respectivamente.

RESULTADOS

Análisis de la secuencia de la cisteína proteinasa tipo legumaína TvLEGU-1 de *Trichomonas vaginalis*

La secuencia del gen *tvlegu-1* (Número de acceso AY326446) que codificada para la TvLEGU-1 de *T. vaginalis*, se obtuvo de la base de datos del GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Leon-Felix et al. 2004). La secuencia primaria de la TvLEGU-1 se compone de 388 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 42.935 kDa, que al ser analizada en el programa InterPro reveló que esta proteína corresponde a las proteinasas de la familia C13, que pertenece al clan CD de las cisteína proteinasas.

Aunque la secuencia primaria de la TvLEGU-1 presenta tanto una baja identidad como una baja similitud con respecto algunas de las secuencias de legumainas reportadas para otros organismos (**Tabla 8**), mediante el alineamiento múltiple (**Figura 18**), se identificó que los aminoácidos Histidina (His¹¹⁹) y Cisteína (Cys¹⁶⁴), característicos de la diada catalítica (His-Cys) de esta familia de CPs permanecen conservados en la secuencia de la TvLEGU-1 (Chen et al. 1998; Dall and Brandstetter 2013; Mottram et al. 2003; Zhao et al. 2014). Adicionalmente, también se identificaron los tres motivos prominentes reportados para esta familia de proteinasas (**Figura 18**); un motivo situado en el extremo N-terminal (motivo I), característico de las proteínas que presentan un plegamiento de tipo caspasa-hemoglobinasa (CHF, caspase-hemoglobinase fold por sus siglas en inglés) (Aravind and Koonin 2002), así como los motivos formados por cuatro aminoácidos hidrofóbicos que preceden tanto a la Histidina (His¹¹⁹) como a la Cisteína (Cys¹⁶⁴) catalítica, motivo II y motivo III, respectivamente.

En contraste con la mayoría de las legumainas reportadas que presentan un péptido señal en su secuencia, para la TvLEGU-1 no se identificó ninguna secuencia que corresponda a algún tipo de péptido señal conservado en la región del amino-terminal (**Figura 18**), cuando fue analizada mediante el programa “SignalP 4.1 Server”, como en el caso de la legumaina de humano que inicia con un péptido señal (Met¹-Ala¹⁷), que es liberado durante su secreción (Dall and Brandstetter 2013; Dall and Brandstetter 2016).

Aunque ya se ha reportado experimentalmente que la TvLEGU-1 es modificada postraduccionalmente en *T. vaginalis* con la adición de O-glicosilaciones y N-glicosilaciones (Rendón-Gandarilla et al. 2013), hubo la necesidad de realizar nuevamente un análisis de la secuencia primaria de la TvLEGU-1 que permitiera la predicción de posibles sitios de glicosilación, ya que en algunos sistemas de expresión de proteínas recombinantes, las proteínas son modificadas con la adición de O-glicosilaciones y/o N-

glicosilaciones como en el caso de levaduras (Tanner and Lehle 1987), cultivo de células de mamífero (Hossler 2012) y el cultivo de células de insecto (Shi and Jarvis 2007). Sin embargo, el análisis *in silico* sugiere que la TvLEGU-1 presenta únicamente cinco posibles sitios de O-glicosilación (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) y ningún sitio de N-glicosilación (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Gupta 2004).

Tabla 8. Análisis de identidad y similitud entre la secuencia de aminoácidos de la TvLEGU-1 y la secuencia de algunas legumaínas reportadas

Organismo	Identidad (%)					
	<i>T.vaginalis</i>	Humano	ratón	toro	<i>S. mansoni</i>	soya
<i>T. vaginalis</i>	100	-				
Humano	3.35	100	-			
ratón	4.89	8.54	100	-		
toro	4.12	82.9	8.77	100	-	
<i>S. mansoni</i>	6.44	6.99	6.06	6.99	100	-
soya	4.89	5.08	5.97	4.84	6.52	100

Organismo	Similitud (%)					
	<i>T. vaginalis</i>	Humano	ratón	toro	<i>S. mansoni</i>	soya
<i>T. vaginalis</i>	100	-				
Humano	38.65	100	-			
ratón	35.82	38.65	100	-		
toro	37.88	99.74	37.88	100	-	
<i>S. mansoni</i>	37.88	40.46	39.17	40.46	100	-
soya	39.43	40.2	41.75	40.46	37.8	100

Secuencias de la cistein proteinasa 1 tipo legumaina de *T. vaginalis* (gi|39573850|gb|AAQ93039.1), de humano (*Homo sapiens*) (gi|56682964|ref|NP_001008530.1), de ratón (*Mus musculus*) (gi|7242187|ref|NP_035305.1), de toro (*Bos taurus*) (gi|27806555|ref|NP_776526.1), de *S. mansoni* (gi|6851050|emb|CAB71158.1) y de soya (*Glycine max*) (gi|351720847|ref|NP_001236678.1). (SIAS, sequence identity and similarity, por sus siglas en inglés) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

Figura 18. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la TvLEGU-1 (AAQ93039.1) con algunas legumainas reportadas

Alineamiento múltiple de la secuencia de la cistein proteinasa 1 tipo legumaina de *T. vaginalis* (AAQ93039), de humano (*Homo sapiens*) (Q99538), de toro (*Bos taurus*) (27806555), de ratón (*Mus musculus*) (7242187), de soya (*Glycine max*) (351720847) y de *S. mansoni* (6851050). Los recuadros muestran las diferentes regiones: Péptidos señal (verde) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Motivo I (negro) característico de las proteínas que presentan un plegamiento de tipo caspasa-hemoglobinasa (CHF, “caspase-hemoglobinase fold” por sus siglas en inglés) (Aravind and Koonin 2002) y los Motivos II y III (negros) indican los cuatro aminoácidos con características hidrófobas que preceden a los residuos catalíticos His (rojo) y Cys (azul), respectivamente.

```

      20                               40
Q99538 M-----VWKVAVFLSVAL-----GIGAVP I--D----- 21
27806555 M-----IWEFTVLLSLVL-----GTGAVP L--E----- 21
7242187 M-----TWRVAVLLSLVL-----GAGAVP VGV D----- 23
351720847 MALDRS I I SKTTWYSVVLWMMVVLVRVHGAAARPNRKEWDSV I KLPTEPVD 51
6851050 MMLF-----SLFL I S I L H I L L V K C Q L D-----TNYEVS 28
AAQ93039 MF-----CLLQLARC----- 10

      60      80      100
Q99538 -DPEDGGKHWV---V I V A---GSNGWYNR HQA--DA--CHAYQ I I HRN 59
27806555 -DPEDGGKHWV---V I V A---GSNGWYNR HQA--DA--CHAYQ I V HRN 59
7242187 -DPEDGGKHWV---V I V A---GSNGWYNR HQA--DA--CHAYQ I I HRN 61
351720847 ADSDEVGTRWA---V L V A---GSNGYGNR HQA--DV--CHAYQL L I K G 90
6851050 DETVSDNNKWA---V L V A---GSNGYPNR HQA--DV--CHAYHVLRSK 67
AAQ93039 -----DRFA---V L I A---GSNDFYNR HQA--D I--FNMYQQLV KR 42

      120      140
Q99538 G I P D E Q I V M M Y D D I A Y S E D N P T P G I V I N R P N G T D V Y Q G V P K -D Y T G E D V T 109
27806555 G I P D E Q I V M M Y D D I A N S E D N P T P G I V I N R P N G S D V Y Q G V L K -D Y T G E D V T 109
7242187 G I P D E Q I V M M Y D D I A N S E E N P T P G V V I N R P N G T D V Y K G V L K -D Y T G E D V T 111
351720847 G L K E E N I V V F M Y D D I A T N E L N P R H G V I I N H P E G E D L Y A G V P K -D Y T G D N V T 140
6851050 G I K P E H I I T M M Y D D I A Y N L M N P F P G K L F N D Y N H K D W Y E G V V I -D Y R G K K V N 117
AAQ93039 G F D D Q H I T M M A Y D D I A L S S E N P F R G K V F H T L K H V N I Y P G S S K I N Y A H N S V T 93

      160      180      200
Q99538 P Q N F L A V L R G D A E A V K G I G S G K V L K S G P Q D H V ---F I Y F---T D---H G 149
27806555 P K N F L A V L R G D A E A V K G V G S G K V L K S G P R D H V ---F V Y F---T D---H G 149
7242187 P E N F L A V L R G D A E A V K G K G S G K V L K S G P R D H V ---F I Y F---T D---H G 151
351720847 T E N L F A V I L G D K S K L K G -G S G K V I N S K P E D R I ---F I Y Y---S D---H G 179
6851050 S K T F L K V L K G D K S A ---G G K V L K S G K N D D V ---F I Y F---T D---H G 152
AAQ93039 A D Q F Y T V L T -----T L K S T T S D N V ---Y I Y Y---D N---H G 120

      220      240      260
Q99538 -S T G I L V F P N E ---D-L H V K D L N E T I H Y M Y K H K M Y R K M ---V F Y I ---E 187
27806555 -A T G I L V F P N E ---D-L H V K D L N E T I R Y M Y E H K M Y Q K M ---V F Y I ---E 187
7242187 -A T G I L V F P N D ---D-L H V K D L N K T I R Y M Y E H K M Y Q K M ---V F Y I ---E 189
351720847 -G P G I L G M P N M ---P Y L Y A M D F I D V L K K K H A S G S Y K E M ---V I Y V ---E 218
6851050 -A P G L I A F P -D---D E L Y A K Q F M S T L K Y L H S H K R Y S K L ---V I Y I ---E 190
AAQ93039 -G P G I L G V P D G V P G G Y I E A E P L A K A F D T M E A K G L Y G K L ---F F G I ---E 162

      260      280      300
Q99538 -A C---E S G S M M N H L -P D N I N V Y A T T A A N P R E S S Y A C Y Y D-----E K R S 226
27806555 -A C---E S G S M M N H L -P P D I N V Y A T T A A N P R E S S Y A C Y Y D-----E Q R S 226
7242187 -A C---E S G S M M N H L -P D D I N V Y A T T A A N P K E S S Y A C Y Y D-----E E R G 228
351720847 -A C---E S G S V F E G I M P K D L N I Y V T T A S N A Q E N S W G T Y C P G M D P S P P P E Y I 265
6851050 -A C---E S G S M F Q R I L P S N L S I Y A T T A A S P T E S S Y G T F C D D-----P T I T 231
AAQ93039 -A C---Y S G S V A A V F R A K --N M C T I T A A N D D E S S Y A A V Y D-----S T V G 200

      320      340      360
Q99538 T Y L G D W Y S V N W M E D S D V E D L T K E T L H K Q Y H L V K S H T N T-----S H V M Q Y 270
27806555 T F L G D W Y S V N W M E D S D V E D L T K E T L H K Q Y Q L V K S H T N T-----S H V M Q Y 270
7242187 T Y L G D W Y S V N W M E D S D V E D L T K E T L H K Q Y H L V K S H T N T-----S H V M Q Y 272
351720847 T C L G D L Y S V A W M E D S E A H N L K R E S V K Q Q Y K S V K Q R T S N F N N Y A M G S H V M Q Y 316
6851050 T C L A D L Y S Y D W I V D S Q T H H L T Q R T L D Q Q Y K E V K R E T N L-----S H V Q R Y 275
AAQ93039 V Y L S N E F S N Y F M A Y L D S N--P Q N T I G N L Y T K V K A Q T T-----G S H V C Y Y 242

      360      380      400
Q99538 G N K T I S T M K V M Q F Q G M K R K A S S P V P L P P V-----T H L D L T P S P D V P L T I M K 316
27806555 G N K S I S A M K L M Q F Q G L K H Q A S S P I S L P A V-----S R L D L T P S P E V P L S I M K 316
7242187 G N K S I S T M K V M Q F Q G M K H R A S S P I S L P P V-----T H L D L T P S P D V P L T I L K 318
351720847 G D T N I T A E K L Y L Y Q G F D---P A T V N F P P Q N G R L E T K M E V V N Q R D A E L F L L W 364
6851050 G D T R M G K L H V S E F Q G S R D K S S T E N D E P P M K P R H S-----I A S R D I P L H T L H 321
AAQ93039 G D V N M K N L K L S D F L G T P N E V V A P-----K A D A K I D I I P H Y L A T K S T L Y 285

      420      440      460
Q99538 R K L M N T N D L E E S R -Q L T E E I Q R H L D A R H L I E K S V R K I V S L L A A S E A E V E Q L 366
27806555 R K L M S T N D L Q E S R -R L V Q K I D R H L E A R N I I E K S V R K I V T L V S G S A A E V D R L 366
7242187 R K L L R T N D V K E S Q -N L I G Q I Q Q F L D A R H V I E K S V H K I V S L L A G F G E T A E R H 368
351720847 Q M Y Q R S N H Q S E N K T D I L K Q I A E T V K H R K H I D G S V E L I G V L L Y G P G K G S S V L 415
6851050 R Q I M M T N N -A E D K S F L M Q I L G L K L K R R D L I E D T M K L I V K V M N N-----E E I 366
AAQ93039 Q L A Q S T D A K I A G R A K V A--L H E V I A A A E K L D L T L T S I A E I L E P---E T K N V 331

      460      480      500
Q99538 L S E R A P-----L T G H S C Y P E A L L H F R T -H C F N W H S P T Y E Y A L R-----H L Y 406
27806555 L S Q R A P-----L T E H A C Y Q T A V S H F R S -H C F N W H N P T Y E Y A L R-----H L Y 406
7242187 L S E R T M-----L T A H D C Y Q E A V T H F R T -H C F N W H S V T Y E H A L R-----Y L Y 408
351720847 Q S V R A P G S S L V D D W T C L K S M V R V F E T -H C-----G T L T Q Y G M K-----H M R 455
6851050 P N T K A T I D Q T L D---C T E S V Y E Q F K S -K C F-----T L Q Q A P E V G G---H F S 405
AAQ93039 L R A K-----C G K I T P E Y F E V L H Y F-----T E K Y G V V K G D D M I K L R 366

      520      540
Q99538 V L V N L C E K P Y P L H R I K L S M D H V C L G H Y----- 433
27806555 V L V N L C E N P Y P I D R I K L S M N K V C H G Y----- 433
7242187 V L A N L C E A P Y P I D R I E M A M D K V C L S H Y----- 435
351720847 A F A N I C N S G V S E A S M E E A C L A A C E G Y N A G L F H P S N R G Y S A 495
6851050 T L Y N Y C A D G Y T A E T I N E A I I K I C-----G 429
AAQ93039 V L V N L A L K -H K V A D I K A A I D A I C----- 388

```

Modelo 3D de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis*

El modelo tridimensional del precursor de la TvLEGU-1 se obtuvo mediante modelado por homología usando el servidor iTasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang and Zhang 2015; Zhang 2008). Para la construcción de este modelo se consideró como molde las estructuras tridimensionales reportadas tanto para la legumaína de humano (4n6o, 4awb y 4fgu) (Dall and Brandstetter 2013) como la legumaína de ratón (Zhao et al. 2014) (4noj), con las cuales presento una similitud mayor al 35%. La **Figura 19D** muestra el modelo tridimensional de la TvLEGU-1. Este modelo sugiere que al igual que la legumaína de humano (Dall and Brandstetter 2016), la TvLEGU-1 está formada por un dominio con actividad de proteínasa. Este dominio abarca desde la Met¹ hasta el Asn²⁶⁰ y consiste en una placa central de seis hojas-beta rodeada de cinco alfa-hélices (**Figura 20B**) que es topológicamente equivalente a la arquitectura reportada para las caspasas y paracaspasas (McLuskey and Mottram 2015), lo cual confirma su identidad tanto en estructura como en secuencia con las cisteína proteínasas de la familia C13 y C14 que comprenden a las legumaínas y caspasas, respectivamente.

Adicionalmente, el precursor de la TvLEGU-1, al igual que los precursores tanto de la legumaína de humano (Dall and Brandstetter 2016) como de ratón (Zhao et al. 2014), revela que su extremo carboxilo-terminal está organizado en dos partes: un fragmento denominado péptido de activación (AP, “activation peptide”, por sus siglas en inglés) posicionado inmediatamente después del dominio de actividad de proteínasa entre el Glu²⁶¹ y el Asp²⁷² y un dominio formado por cinco alfa-hélices comprendido entre la Ile²⁷³ y la Cys³⁸⁸, que presenta un plegamiento tipo DD (DD-like, “death domain”, por sus siglas en inglés) (Feinstein et al. 1995; Reed et al. 2004; Weber and Vincenz 2001), también denominado dominio de estabilización y modulación de la actividad de legumaína (LSAM, “legumain stabilization and activity modulation”, por sus siglas en inglés) (Dall and Brandstetter 2016; McLuskey and Mottram 2015) (**Figura 19D** y **Figura 20B**).

Figura 19. Modelos de la estructura 3D de las proteinasas tipo legumaína de humano y de *T. vaginalis*

A) Diagrama de la pro-legumaína de humano. Color rosa: Péptido señal (Met¹-Ala¹⁷) (SP), verde claro: fragmento N-terminal del pro-péptido de 8 aminoácidos (Val¹⁸-Asp²⁵) (NTF), verde oscuro: dominio catalítico (Gly²⁶-Lys²⁸⁹) (G²⁶-KRK²⁸⁹) que contiene la diada catalítica His¹⁴⁸-Cys¹⁸⁹, pro-dominio en el extremo C-terminal que comprende, color azul: péptido de activación (AP; KRK²⁸⁹-N³²³) y en color naranja: módulo de estabilización y modulación de la actividad (LSAM; D³²⁴-Y⁴³³) con una estructura de tipo “death-domain-like”, que es estabilizada por enlaces disulfuro. Tomado de: (Dall and Brandstetter 2016). **B)** Modelo 3D de la legumaína de humano (Q99538) (*Homo sapiens*) (PDB: 4fgu): Dominio catalítico (Gly²⁶-Lys²⁸⁹) (G²⁶-KRK²⁸⁹) que contiene la diada catalítica His¹⁴⁸-Cys¹⁸⁹ (color verde oscuro), Pro-dominio que incluye el péptido de activación (AP; KRK²⁸⁹-N³²³) (color azul) y el dominio de estabilización y modulación de la actividad de legumaína (LSAM; Aps³²⁴-Tyr⁴³³) (color naranja) (Dall and Brandstetter 2016). **C)** Diagrama de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis*. verde claro: Fragmento N-terminal del dominio catalítico (Met¹-Asn²⁶⁰) que contiene la diada catalítica His¹¹⁸-Cys¹⁶⁴, pro-dominio en el extremo C-terminal que comprende, color azul: péptido de activación (AP; Glu²⁶¹-Asp²⁷²) y en color naranja: el dominio de estabilización y modulación de la actividad de legumaína (LSAM; Ile²⁷³-Cys³⁸⁸). **D)** Modelo 3D teórico de la TvLEGU-1 (AAQ93039) de *T. vaginalis* obtenido “*in silico*” usando el servidor iTasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang and Zhang 2015; Zhang 2008): Dominio con actividad del legumaína y que presenta un plegamiento tipo legumaína (verde oscuro) y Dominio LSAM (color naranja).

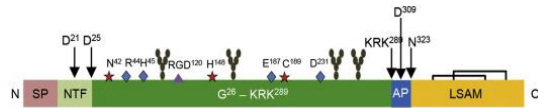
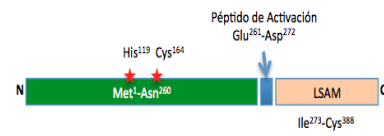
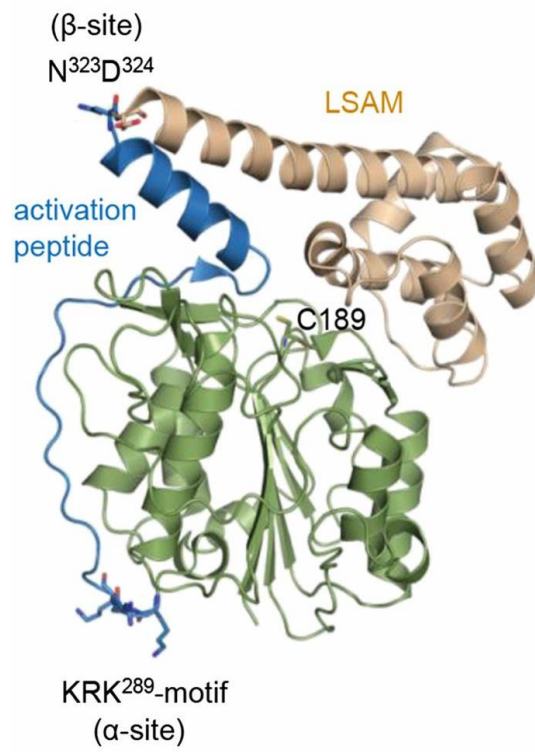
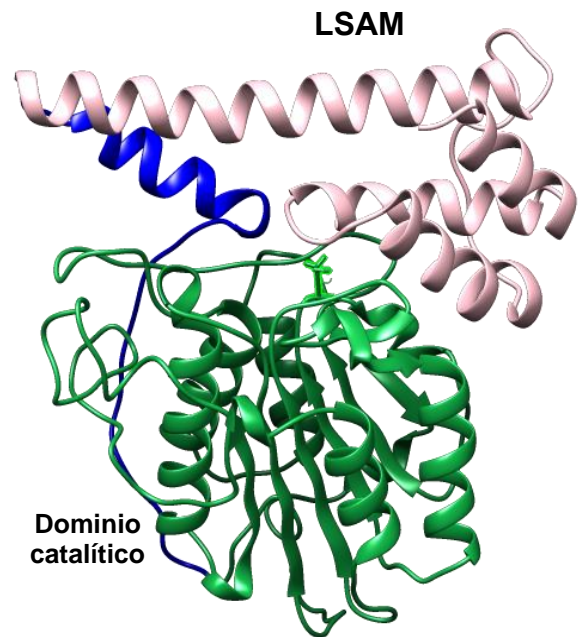
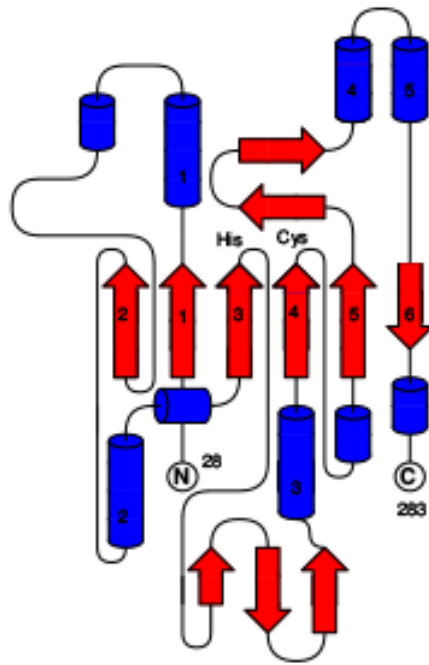
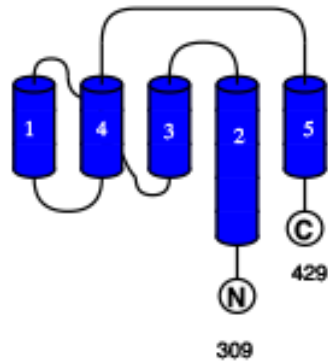
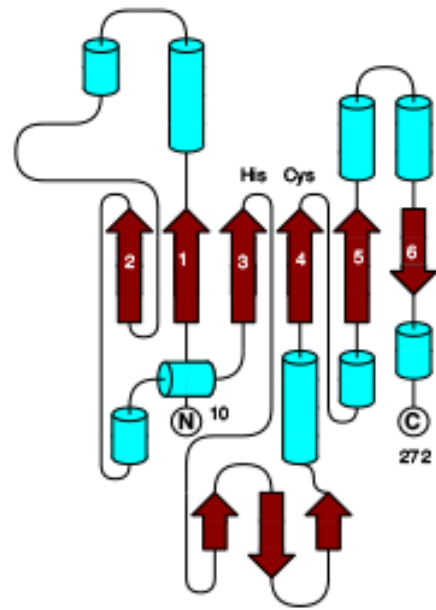
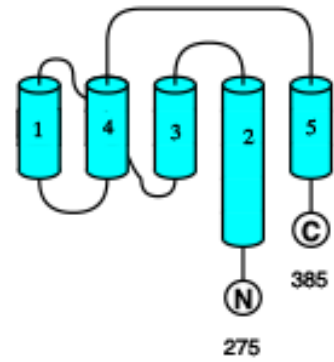
A**C****B****D**

Figura 20. Topología estructural de la cisteína proteinasa tipo legumaína

A) La legumaína de humano (*Homo sapiens*) (Q99538) (PDB: 4fgu) consiste en una placa central de seis hojas-beta (1-6, rojo) rodeadas de cinco alfa-helices (1-5, azul) (Dominio catalítico, Lys²⁸ - Phe²⁶⁰), que contiene la diada catalítica His¹⁴⁸ - Cys¹⁸⁹, y el pro-dominio situado en el extremo C-terminal (Asp³⁰⁹ - Cys⁴³⁰) formado por cinco alfa-hélices con un plegamiento tipo DD (“death domain”, por sus siglas en inglés) (Feinstein et al. 1995; Reed et al. 2004; Weber and Vincenz 2001), también denominado LSAM (“legumain stabilization and activity modulation”, por sus siglas en inglés) (Dall and Brandstetter 2016; McLuskey and Mottram 2015). **B)** TvLEGU-1 de *T. vaginalis* (AAQ93039), que consiste en una placa central de seis hojas-beta (Dominio catalítico) (1-6, marrón) rodeadas de cinco alfa-hélices (1-5, verde), que abarca desde la Met¹ hasta el Asn²⁶⁰ y su extremo carboxilo-terminal está organizado en dos distintas partes: un fragmento denominado péptido de activación (AP, “activation peptide”, por sus siglas en inglés), posicionado inmediatamente después del dominio de actividad de proteinasa entre el Glu²⁶¹ y el Asp²⁷², y un pro-domino formado por cinco alfa-helices comprendido entre la Ile²⁷³ y la Cys³⁸⁸, que presenta un plegamiento tipo DD (Feinstein et al. 1995; Reed et al. 2004; Weber and Vincenz 2001), también denominado LSAM (Dall and Brandstetter 2016; McLuskey and Mottram 2015).

A**Legumaína de Humano (Q99538)****Dominio catalítico****Pro-dominio****B****TvLEGU-1 (AAQ93039)****Dominio catalítico****Pro-dominio**

Expresión de la TvLEGU-1 en *E. coli*

En un trabajo previo, Rodríguez-Cabrera (2007) clonó la secuencia que codifica para el precursor de la TvLEGU-1 sin los primeros diez aminoácidos del N-terminal en el vector pColdI. Por ensayos de expresión en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* demostró que la TvLEGU-1 se expresó como cuerpos de inclusión. Estos resultados sugieren que la TvLEGU-1 es una proteína difícil de expresar en *E. coli*. Por lo que en el presente trabajo se decidió clonar el fragmento de DNA que codifica para la TvLEGU-1 en otros vectores de expresión y probar su expresión en diferentes cepas de *E. coli* para determinar si era posible obtenerla en su conformación nativa y susceptible de activarse.

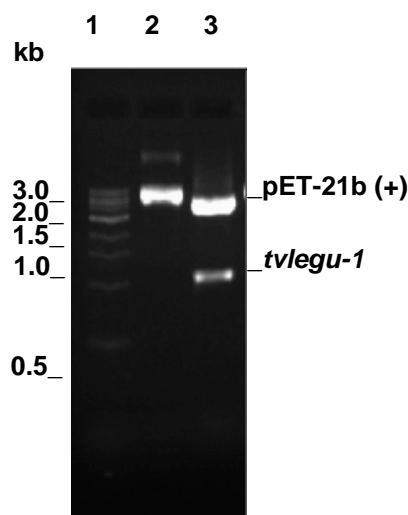
Expresión de la TvLEGU-1 en *E. coli* usando el vector pET-21b (+)

Subclonación del gen *tvlegu-1* en el vector de expresión pET-21b (+)

La construcción pColdI-*tvlegu-1* que contiene el fragmento de DNA que codifica para el precursor de la TvLEGU-1 (Rodríguez-Cabrera 2007b), se digirió con las enzimas de restricción *Nde* I y *Bam*H I (NEB) y se liberó un fragmento de aproximadamente 1.2 kb. Este fragmento se subclonó en el vector de expresión pET-21b (+) y se obtuvo la construcción pET-21b (+)-*tvlegu-1* que contiene la secuencia que codifica para el precursor de la TvLEGU-1 sin los primeros diez aminoácidos.

El DNA plasmídico de la construcción pET-21b (+)-*tvlegu-1* que se extrajo de una de las clonas que presentó resistencia al antibiótico (ampicilina 50 µg/mL), se digirió con las enzimas de restricción *Nde* I y *Bam*H I (NEB) y se liberó un fragmento de aproximadamente 1.2 kb, correspondiente al fragmento de DNA que codifica para la TvLEGU-1 (**Figura 21**). Como Rodríguez-Cabrera (2007) confirmó por secuenciación la correcta clonación y orientación del gen *tvlegu-1* en el vector pColdI, no fue necesario seleccionar clonas candidatas para confirmar la correcta clonación del gen en el vector pET-21b (+).

Figura 21. Análisis de restricción del DNA plasmídico de la construcción pET-21b



Gel de agarosa 1%. Perfil electroforético de la digestión del DNA plasmídico de la construcción pET-21b (+)-*tvlegu-1* con las enzimas *NdeI* y *BamHI* (NEB) para corroborar la presencia del inserto de interés. Marcador de peso molecular de 1 kb Ladder (**carril 1**), DNA plasmídico pET-21b (+)-*tvlegu-1* sin digerir (**carril 2**), DNA plasmídico pET-21b (+)-*tvlegu-1* digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (**carril 3**). pET-21b (+) (5.4 kb), *tvlegu-1* (1.2 kb).

Expresión de la TvLEGU-1 recombinante en la cepa *E. coli* C41(DE3) /pREP-4 usando la construcción pET-21b (+)-*tvlegu-1*

Para esta etapa del trabajo, la cepa *E. coli* C41(DE3) se transformó con el plásmido pREP-4 para contar con copias adicionales del gen *lac I*. La cepa *E. coli* C41(DE3), es una cepa derivada de BL21 (DE3) que tiene al menos una mutación aún no caracterizada que previene la muerte celular asociada con la expresión de proteínas recombinantes tóxicas. Además de crecer en medio LB o medio mínimo, esta cepa no contiene resistencia intrínseca a algún antibiótico (Dumon-Seignovert et al. 2004). Por lo que la cepa *E. coli* C41(DE3) /pREP-4 fue capaz de crecer en kanamicina y expresar el represor *lac I*.

Debido a que en geles de SDS-PAGE al 12% no se logró observar la sobre expresión de la TvLEGU-1 (42 kDa) durante un ensayo de inducción con la cepa recombinante *E. coli* C41(DE3) /pREP-4-pET-21b(+)-*tvlegu-1* (**Figura 22A**), se realizó un ensayo de purificación de la TvLEGU-1 por afinidad a níquel a partir de la fracción soluble.

Como se puede observar en el ensayo de SDS-PAGE al 12%, en ninguno de los carriles de los pasos de purificación se observa el enriquecimiento de algún péptido del tamaño esperado (42 kDa) (**Figura 22A**, línea 2-9), por lo que para comprobar la expresión de la TvLEGU-1 recombinante se realizó un ensayo de WB utilizando el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1, generado contra la TvLEGU-1 recombinante (Rendón-Gandarilla 2007b). En la **Figura 22A** se muestra el patrón proteico de lo que se transfirió a una membrana de NC para el ensayo de WB.

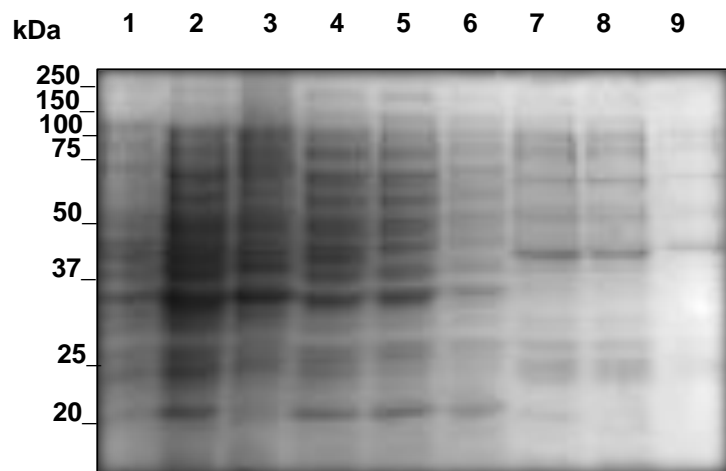
En la **Figura 22B** se muestra la inmunodetección para la TvLEGU-1 expresada en la cepa *E. coli* C41(DE3) /pREP-4-pET-21b (+)-*tvlegu-1* y se observa el reconocimiento de un péptido del tamaño esperado únicamente en las muestras del extracto total del cultivo inducido, fracción insoluble y fracción soluble (**Figura 22B**, línea 2-4). Adicionalmente, se observa el reconocimiento de un péptido de aproximadamente ~37 kDa, así como otros péptidos de menor tamaño, que podrían corresponder al procesamiento y/o degradación de la TvLEGU-1 recombinante durante su expresión en el ambiente reductor de citoplasma de *E. coli*. Bajo estas condiciones de expresión aparentemente se logró obtener la TvLEGU-1 en su forma soluble, por lo tanto, fue necesario buscar otra estrategia que permitiera su obtención en forma soluble y a la vez limitar su degradación proteolítica. Cabe mencionar que durante un ensayo de actividad en un zimograma utilizando gelatina como sustrato, en comparación con papaína (control positivo de actividad proteolítica) no se observó actividad de la TvLEGU-1 recombinante.

Figura 22. Expresión de la TvLEGU-1 en la cepa *E. coli* C41 (DE3)/pREP-4 usando la construcción pET-21b(+)-*tvlegu-1*

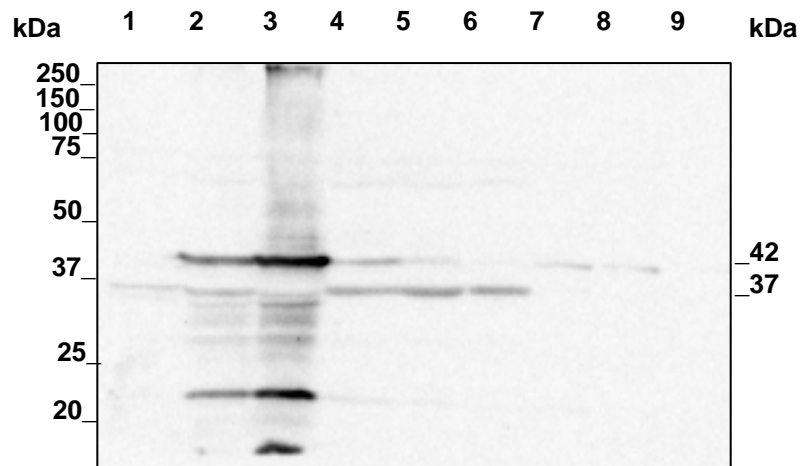
A) Electroforesis en gel de poliacrilamida. SDS-PAGE al 12%, de la expresión y purificación de la TvLEGU-1 recombinante por afinidad a níquel, posteriormente transferida a membrana de NC para el ensayo de WB. Extracto proteico total de *E. coli* C41(DE3) /pREP-4-pET-21b (+)-*tvlegu-1* sin inducir **(1)**, inducido a 37°C durante 6h con 0.5 mM de IPTG **(2)**, fracción insoluble **(3)**, fracción soluble **(4)**, fracción que pasa a través de la columna de níquel **(5)**, lavado con 10 mM de Imidazol **(6)**, elución con 100 mM de Imidazol **(7)**, elución con 200 mM Imidazol **(8)**, elución con 500 mM de Imidazol **(9)**. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Estandar.

B) Inmunodetección de la TvLEGU-1 expresada en la cepa de *E. coli* C41(DE3) /pREP-4-pET-21b (+)-*tvlegu-1* por WB para el reconocimiento de TvLEGU-1 recombinante (42 kDa, 37 kDa). Revelada por quimioluminiscencia.

A



B



Expresión de la TvLEGU-1 en *E. coli* usando el vector pGEX-6P-1

Subclonación del gen completo *tvlegu-1* en el vector de expresión pGEX-6P-1

Los sistemas que emplean proteínas de fusión son una alternativa para expresar proteínas recombinantes con alto rendimiento, siendo apropiados además por poseer esquemas de purificación simples. En estos sistemas, la detección y seguimiento son relativamente sencillos debido a la expresión de péptidos o proteínas fusionadas a la proteína recombinante de interés en el extremo amino o carboxilo terminal. Además, el uso de estos sistemas disminuye o evita la formación de cuerpos de inclusión, mejora el plegamiento y limita la degradación proteolítica. Algunas de las proteínas usadas en estos sistemas son: la proteína A de estafilococo, la proteína G de estreptococo, la proteína glutatión S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* y la proteína de unión a maltosa (MBP) (Terpe 2003).

El vector pGEX-6P-1 expresa la proteína recombinante de interés fusionada a la GST, lo que facilita su purificación mediante una cromatografía de afinidad a glutatión (Knaust 2000). Aunque Rodríguez-Cabrera (2007) reportó la clonación del gene que codifica para la TvLEGU-1 en este vector de expresión bacteriano, no logró observar una banda de sobre expresión de la TvLEGU-1 en geles de SDS-PAGE, ni se detectó señal de reconocimiento en ensayos de WB utilizando el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1; adjudicando esto a la posible introducción de algún error de la secuencia que codifica para la TvLEGU-1 durante la PCR del gen para su clonación en el vector pGEX-6P-1 (Rodríguez-Cabrera 2007b). Para descartar esta posibilidad y explorar condiciones de expresión que permitieran obtener la TvLEGU-1 en su forma soluble, así como limitar su degradación cuando se expresa en *E. coli*, por lo que se clonó el gen que codifica para la TvLEGU-1 en el vector pGEX-6P-1.

El gen que codifica para el precursor completo de la TvLEGU-1 se amplificó por PCR utilizando DNA genómico de *T. vaginalis* como DNA molde (**Figura 23A**). Posteriormente, tanto el producto de PCR y el vector pGEX-6P-1 se sometieron a una doble digestión con las enzimas *BamH* I y *Not* I. Ambas digestiones se corrieron en geles de agarosa para purificar tanto la banda correspondiente al gen de la TvLEGU-1 como el plásmido de expresión por el método de extracción y purificación de DNA recomendado por el kit “Qiagen gel extraction kit”. En la **Figura 23B** se muestran las bandas correspondientes al fragmento del gen de la

TvLEGU-1 (carriles 5-6) y el vector pGEX-6P-1 (carriles 3-4) digeridos y purificados. Estos fragmentos se sometieron a una reacción de ligación en una proporción inserto vector de 10:1.

Transformación de células competentes de *E. coli* y análisis de las clonas recombinantes que contienen la construcción pGEX-6P-1-*tvlegu-1*

Células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α se transformaron por choque térmico con la mezcla de ligación. De las colonias transformantes que crecieron se seleccionaron 5 colonias y el DNA plasmídico de éstas se digirió simultáneamente con las enzimas *BamH* I y *Not* I. En un gel de agarosa al 1% se observó la liberación de un fragmento de aproximadamente 1.2 kb para todas las digestiones del DNA plásmidico de las 5 clonas que corresponde al tamaño del gen *tvlegu-1* (carriles 4 al 13) y una banda de aproximadamente ~5 kb que corresponde al vector pGEX-6P-1 (**Figura 23C**).

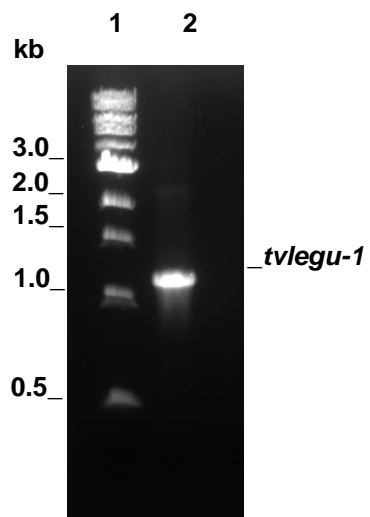
Para verificar que la secuencia y el marco abierto de lectura del gen clonado en el vector pGEX-6P-1 correspondía a la secuencia que codifica para la TvLEGU-1 reportada en la base de datos del NCBI (Leon-Felix et al. 2004), el DNA plasmídico de la construcción pGEX-6P-1-*tvlegu-1* de la primera clona positiva (pGEX-6P-1-*tvlegu-1*-clona 1) se envió a secuenciar empleando los oligonucleótidos 5'pGEX y 3'pGEX. Con las secuencias obtenidas, tanto del extremo 5'y 3', se realizó un alineamiento con la secuencia del gen *tvlegu-1*. Los resultados del alineamiento confirmaron que la secuencia del fragmento subclonado corresponden a la secuencia que codifica para la TvLEGU-1 (**Apéndice IV**), además contiene las secuencias 5'-GGATCC-3'y 5'-GCGGCCGC-3', que corresponden a la secuencia de corte de las enzimas de restricción *BamH* I y *Not* I, respectivamente.

Figura 23. Subclonación del gen *tvlegu-1* completo en el vector de expresión pGEX-6P-1

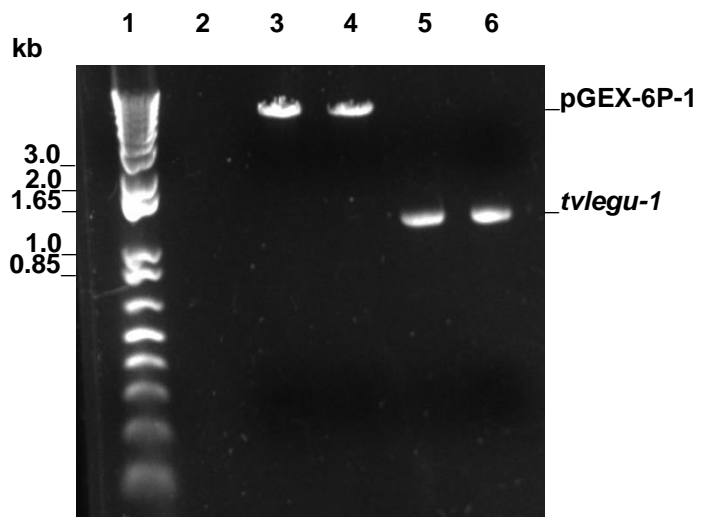
A) Amplificación por PCR del gen *tvlegu-1*. El fragmento de DNA que codifica para la TvLEGU-1 se amplificó por PCR (**carril 2**) utilizando DNA genómico de *T. vaginalis* como DNA molde. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TBE 0.5× y se utilizó marcador de tamaño molecular de 1kb “DNA Ladder” (**carril 1**).

B) Digestión y purificación del fragmento de DNA que codifica para la TvLEGU-1 y el vector de expresión pGEX-6P-1. El fragmento de DNA que codifica para la TvLEGU-1 amplificado por PCR (1.2 kb) (**carriles 5-6**) y el vector de expresión pGEX-6P-1 (4.984 kb) (**carriles 3-4**) se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, y se purificaron por el método de extracción y purificación de DNA recomendado por el kit Qiagen gel extraction kit. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.2% en amortiguador TBE 0.5× y se utilizó marcador de tamaño molecular de 1kb Plus (**carril 1**).

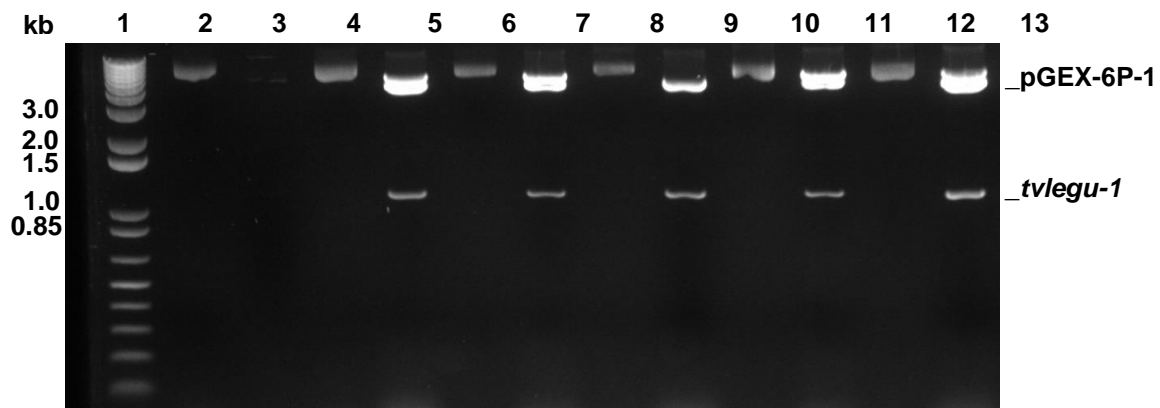
C) Análisis de restricción del DNA plasmídico de las clonas de DH5α transformadas con la construcción pGEX-6P-1-*tvlegu-1*. Doble digestión con las enzimas de restricción *BamH I* y *Not I* del DNA plasmídico de la construcción pGEX-6P-1-*tvlegu-1* de las 5 clonas seleccionadas (Clonas 1-5) (**Carriles 4-13**). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.0% en amortiguador TBE 0.5× y se utilizó marcador de tamaño molecular 1kb Plus (**carril 1**).



A



B



C

Expresión de la TvLEGU-1 recombinante en cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con la construcción pGEX-6P-1-tvlegu-1

Después de confirmada la clonación correcta del gen *tvlegu-1* completo en el vector pGEX-6P-1, se realizaron ensayos de expresión de la TvLEGU-1 fusionada a la GST en *E. coli* BL21 (DE3). EL peso molecular estimado para la TvLEGU-1 (42.9 kDa) fusionada a la GST es de 69.76 kDa (http://www.bi.up.ac.za/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=pepstats).

En la **Figura 24A** se muestra el perfil electroforético de la expresión de la proteína recombinante GST-TvLEGU-1 (69.76 kDa) de la clona 1 *E. coli* BL21 (DE3)-pGEX-6P-1-*tvlegu-1*, donde se observa la sobre expresión de una proteína de ~70 kDa (**carril 3**) correspondiente al tamaño esperado del precursor de la TvLEGU-1 (42.9 kDa) fusionado a la GST.

Las bacterias se lisaron para determinar si la proteína GST-TvLEGU-1 recombinante se encontraba en la fracción insoluble y/o soluble. En el análisis por SDS-PAGE al 10 % se observa la presencia de un péptido del tamaño esperado (~70 kDa), principalmente en la fracción insoluble (**Figura 24A**, carril 4).

Inmunodetección de la GST-TvLEGU-1 expresada en la cepa recombinante de *E. coli* BL21(DE3)-pGEX-6P-1-tvlegu-1

La expresión de la proteína GST-TvLEGU-1 recombinante se comprobó por ensayos de WB con los anticuerpos policlonales anti-TvLEGU-1 y anti-GST (Calla-Choque et al. 2014; Rendón-Gandarilla 2007b).

En la **Figura 24A** del gel réplica que se transfirió a una membrana de NC, se observa una banda de ~70 kDa en el extracto total después de 4 h de inducción (carril 3) y en la fracción insoluble (carril 4).

En el ensayo de WB con el anticuerpo policlonal anti-GST se observó el reconocimiento de una banda de ~70 kDa (**Figura 24B**) principalmente en la fracción insoluble (carril 4), que corresponde a la GST-TvLEGU-1 recombinante. Además, se observó el reconocimiento de una banda de 26 kDa correspondiente a la GST recombinante (carril 1)

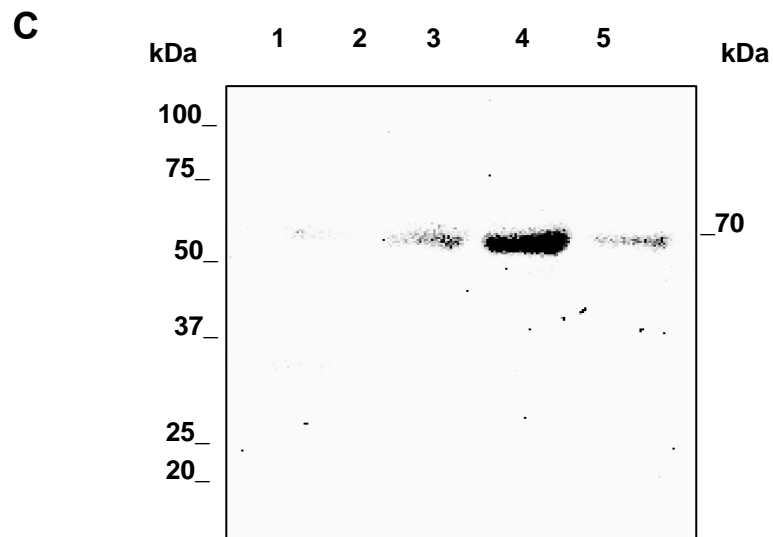
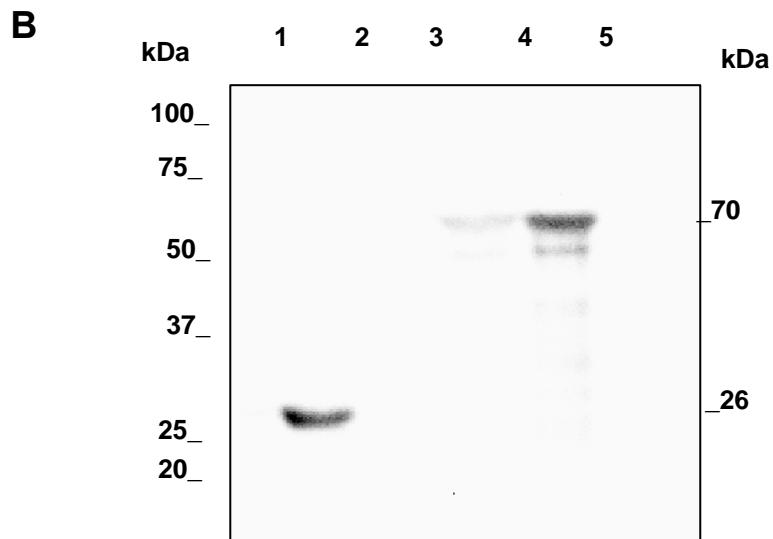
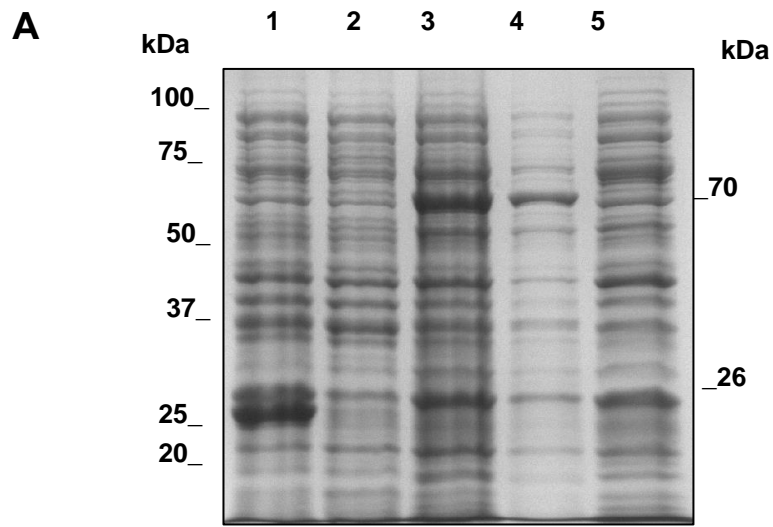
utilizada como control positivo. Con el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1 se observó el reconocimiento de una banda de ~70 kDa (**Figura 24C**), principalmente en la fracción insoluble (carril 4), así como en el extracto total después de 4 h de inducción (carril 3) y en la fracción soluble (carril 5). Aunque hubo un reconocimiento en la muestra correspondiente a la fracción soluble, al realizar un ensayo de afinidad a una resina de glutatión no hubo unión de la proteína recombinante a la resina, lo que sugiere que esta se encontraba en muy baja cantidad, por lo cual fue reconocida únicamente mediante el ensayo de WB.

Figura 24. Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con la construcción pGEX-6P-1-*tvlegu-1*

A) SDS-PAGE al 10% de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante fusionada a la GST. Extracto proteico total: de *E. coli* BL21(DE3)-pGEX-6P-1 que expresa únicamente la GST (~26 kDa) (**1**), de *E. coli* BL21(DE3)-pGEX-6P-1-*tvlegu-1* sin inducir (**2**), inducida a 37°C durante 4h con 0.5 mM de IPTG (**3**); fracción insoluble (**4**) y fracción soluble (**5**). Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Estandar.

B) Ensayo de Western Blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-GSTr. Se observó el reconocimiento de un péptido de ~26 kDa correspondiente a la GST (Control positivo) (**1**), así como también se reconoció un péptido de ~70 kDa en la muestra de la fracción insoluble, correspondiente a la expresión de la TvLEGU-1 fusionada a GST (**5**).

C) Ensayo tipo Western Blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1r. Se corroboró la expresión de la TvLEGU-1 en forma insoluble al reconocerse una banda de ~70 kDa principalmente en la fracción insoluble (**5**).



Expresión de la TvLEGU-1 en *E. coli* usando el vector pPROEX-HTb

Subclonación del gen completo *tvlegu-1* en el vector de expresión pPROEX-HTb

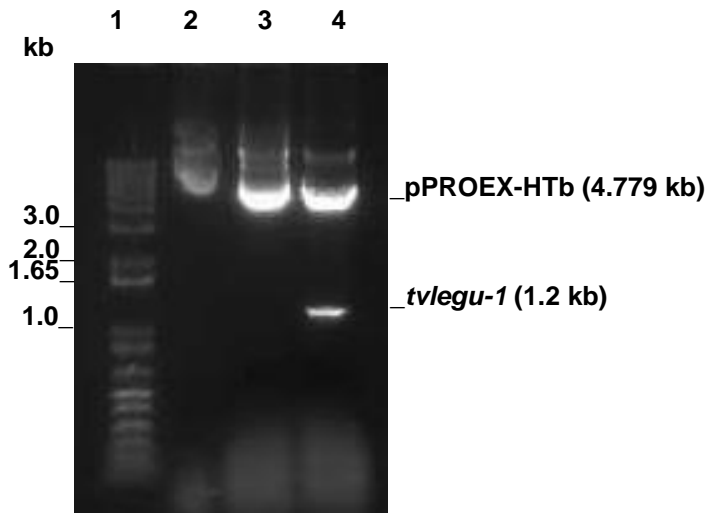
Aunque los intentos por obtener la TvLEGU-1 recombinante en forma soluble y en su conformación nativa en *E. coli*, utilizando distintos vectores y condiciones de expresión, no habían sido satisfactorios, se decidió probar la expresión de la TvLEGU-1 en *E. coli* utilizando el vector pPROEX-HTb. Se consideró trabajar con este vector de expresión con base en el reporte de Calla-Choque (Calla-Choque et al. 2014), donde se describe la clonación y expresión en forma soluble de la alfa-Actinina TvACTN3 de *T. vaginalis* utilizando este vector. Además, se aprovechó el hecho de que el fragmento del gen *tvlegu-1* previamente clonado en el vector pGEX-6P-1 se podía subclonar directamente en el vector pPROEX-HTb.

El fragmento de DNA que codifica para la TvLEGU-1 (1.2 kb) previamente clonado en el vector de expresión pGEX-6P-1, se liberó con las enzimas de restricción *BamH* I y *Not* I, y se subclonó en los mismos sitios del vector de expresión pPROEX-HTb.

Análisis de las clonas recombinantes que contienen la construcción pPROEX-HTb-*tvlegu-1*

El análisis de la doble digestión con las enzimas de restricción *BamH* I y *Not* I del DNA plasmídico de una de las clonas de *E. coli* DH5 α transformadas con la construcción pPROEX-HTb-*tvlegu-1*, muestra la liberación de un fragmento de DNA de aproximadamente 1.2 kb, que corresponde al tamaño del gen *tvlegu-1* (carril 4), y una banda de aproximadamente ~4.779 kb que corresponde al vector pPROEX-HTb (**Figura 25**).

Figura 25. Análisis de restricción del DNA plasmídico de una de las clonas de *E. coli* DH5 α transformadas con la construcción pPROEX-HTb-*tvlegu-1*



Las clonas obtenidas se crecieron en medio líquido, se les extrajo el DNA plasmídico y se sometió a una doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I (**carril 4**). DNA plasmídico de la construcción pPROEX-HTb-*tvlegu-1* sin digerir (**carril 3**). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.0% y se utilizó marcador de tamaño molecular 1kb Plus (**carril 1**).

Expresión de la TvLEGU-1 recombinante en cepa de *E. coli* SHuffle Express transformada con la construcción pPROEX-HTb-*tvlegu-1*

Una vez que por restricción se confirmó que el gen *tvlegu-1* se clonó el vector pPROEX-HTb, células químicamente competentes de la cepa SHuffle Express de *E. coli* se transformaron con la construcción pPROEX-HTb-*tvlegu-1*. La cepa SHuffle Express de *E. coli* es una cepa modificada genéticamente que permite la formación de puentes disulfuro en el citoplasma de *E. coli*. En esta cepa fueron mutados los genes de la Tiorredoxin reductasa (*trxB*) y el gen de la glutatión reductasa (*gor*), permitiendo que las Tiorredoxinas permanezcan en su estado oxidado y puedan participar en la formación de puentes difusulfuro en las proteínas que los requieren (Lobstein et al. 2012).

Para el ensayo de expresión de la TvLEGU-1 se indujo un cultivo de la cepa recombinante *E. coli* SHuffle Express-pPROEX-HTb-*tvlegu-1*. En la **Figura 26A** del perfil electroforético de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante se observa la sobre-expresión de una proteína de ~42 kDa (carril 2) similar al tamaño esperado de la TvLEGU-1 recombinante.

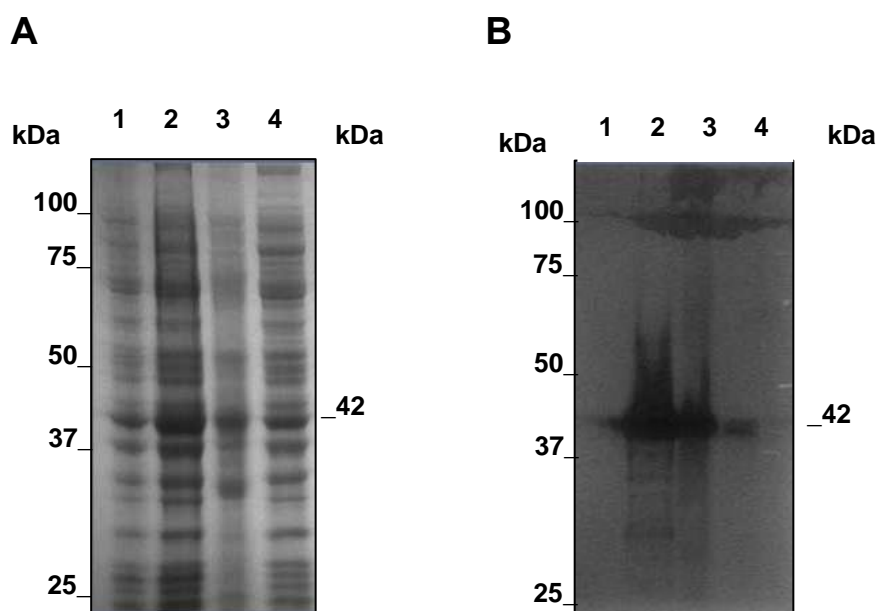
También se hizo el fraccionamiento para determinar si la TvLEGU-1 recombinante se encontraba en la fracción insoluble y/o soluble. En el gel de poliacrilamida se observa la banda del tamaño esperado (~42 kDa) en ambas fracciones (**Figura 26A**, carriles 3 y 4), que se confirmo por ensayos de WB con el anticuerpo anti-TvLEGU-1r (**Figura 26B**).

Inmunodetección de la TvLEGU-1 expresada en la cepa recombinante de *E. coli* SHuffle Express-pPROEX-HTb-*tvlegu-1*

Al utilizar el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1 se observa el reconocimiento de una banda de ~42 kDa (**Figura 26B**) tanto en el extracto proteico total después de 4 h de inducción (carril 2) como en la fracción soluble (carril 4) e insoluble (carril 3). Sin embargo, el mayor reconocimiento se observó en el extracto total después de las 4 h de inducción y en la fracción insoluble. Aunque hubo un ligero reconocimiento en la fracción soluble, así como un reconocimiento la región de 100 kDa. Al realizar un ensayo de purificación por afinidad a

histidinas de la fracción soluble no hubo unión de la proteína recombinante a la resina, lo que sugiere que ésta se encontraba en muy baja cantidad.

Figura 26. Expresión de la TvLEGU-1 en la cepa *E. coli* SHuffle Express usando la construcción pPROEX-HTb-*tvlegu-1*



A) Electroforesis en gel de poliacrilamida. SDS-PAGE al 10% de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en la cepa SHuffle Express de *E. coli*. SHuffle Express-pPROEX-HTb-*tvlegu-1* sin inducir (**1**), inducido a 37°C durante 4 h con 0.5 mM de IPTG (**2**), fracción insoluble (**3**), fracción soluble (**4**). Marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Estandar.

B) Ensayo de Western Blot con en anticuerpo anti-TvLEGU-1r. Se corroboró la expresión de la TvLEGU-1 tanto en el extracto proteico total después de 4 h de inducción (**2**) como en la fracción insoluble (**3**).

Expresión de la TvLEGU-1 en *E. coli* usando el vector pCri-1b

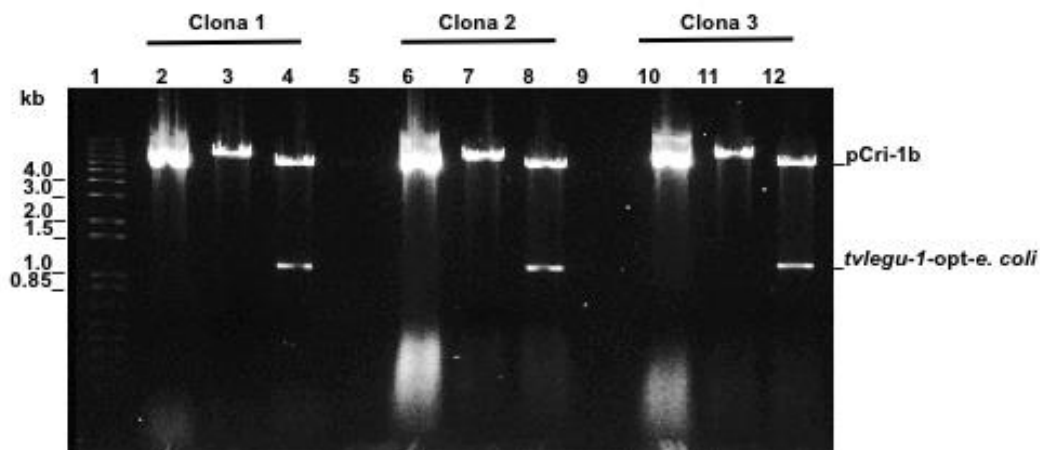
Subclonación del gen completo *tvlegu-1* optimizado (*tvlegu-1-opt-e. coli*) en el vector de expresión pCri-1b

Recientemente en el laboratorio de Biotecnología de Proteínas se adquirió el vector pCri-1b (Goulas et al. 2014), que contiene la secuencia codificante para la proteína de unión a maltosa (MBP, “maltose binding protein”, por sus siglas en inglés), una proteína que promueve el correcto plegamiento de proteínas recombinantes cuando se utiliza como proteína de fusión (Sun et al. 2011). Adicionalmente, este vector tiene la secuencia codificante para una etiqueta de histidinas (6 × His-tag) que permite purificar la proteína de fusión por afinidad a níquel.

Para probar la expresión de la TvLEGU-1 como una proteína de fusión unida al MBP, se clonó el gen *tvlegu-1* optimizado con el uso de codones preferenciales para el sistema expresión de *E. coli* (*tvlegu-1-opt-e. coli*) en el vector pCri-1b. El fragmento de DNA del gen *tvlegu-1-opt-e. coli* liberado del plasmido pUC57-*tvlegu-1-e. coli* con las enzimas *Nde* I y *BamH* I se clonó directamente en los mismos sitios del vector de expresión pCri-1b.

En la **Figura 27** se observa la liberación de un fragmento de ~1.2 kb de la doble digestión con las enzimas de restricción *Nde* I y *BamH* I del DNA plasmídico de 3 clonas, que corresponde al tamaño del gen *tvlegu-1* (carriles 4, 8 y 12) y una banda de ~7.2 kb que corresponde al vector pCri-1b linearizado.

Figura 27. Análisis de restricción del DNA plasmídico de las clonas de *E. coli* DH5 α transformadas con la construcción pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli*



Doble digestión con las enzimas de restricción *Nde* I y *Bam*H I del DNA plasmídico de la construcción pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli* de 3 clonas seleccionadas (Clonas 1-3) (**Carriles 2-12**). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.0% en amortiguador TBE 0.5X y se utilizó marcador de tamaño molecular 1kb Plus (**carril 1**). DNA plasmídico pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli* sin digerir (**carriles 2, 6 y 10**), DNA plasmídico pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli* digerido con la enzima *Nde*I (linearizado) (**carriles 3, 7 y 11**), DNA plasmídico pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli* digerido con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI (**carriles 4, 8 y 12**). pCri-1b-*tvlegu-1-opt-e. coli* (8.4 kb), pCri-1b (7.2 kb), inserto *tvlegu-1-opt-e. coli* (1.2 kb).

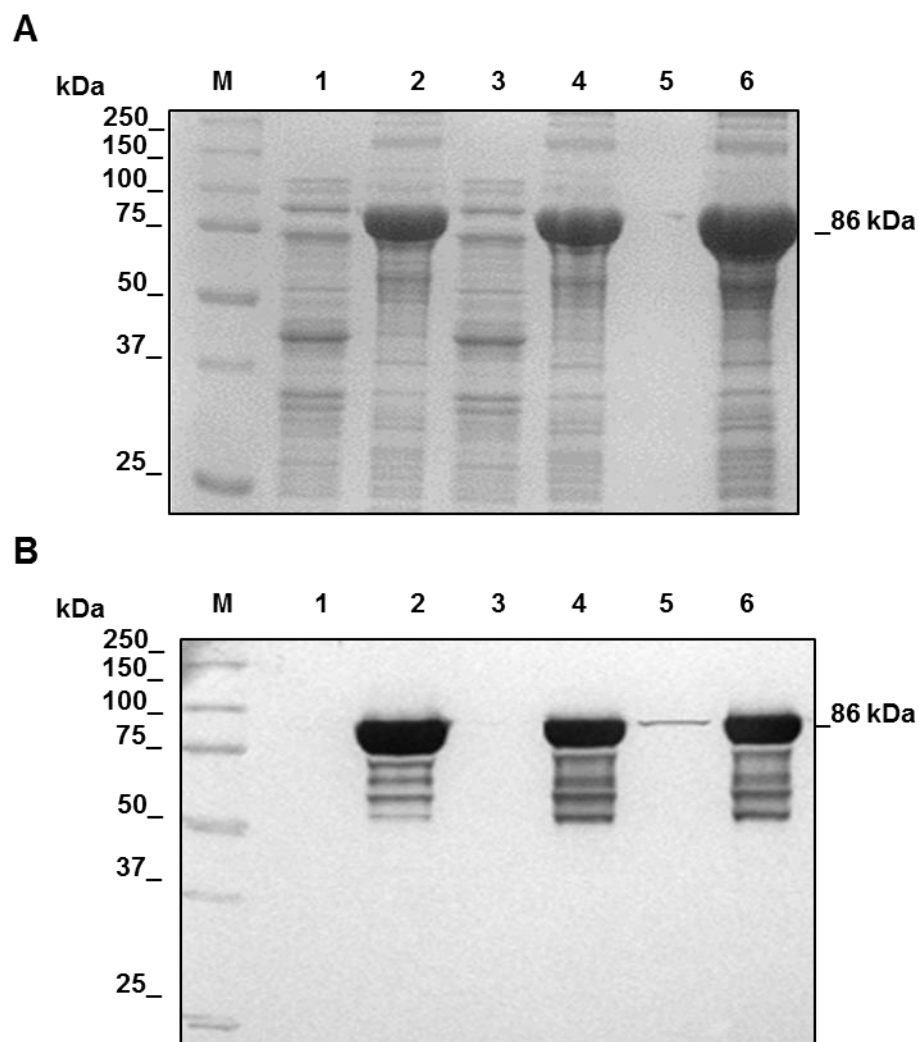
Expresión de la TvLEGU-1 recombinante en cepa de *E. coli* SHuffle Express T7 lysY transformada con la construcción pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli*

Una vez que se confirmó que el gen *tvlegu-1* se clonó correctamente en el vector pCri-1b, células químicamente competentes de la cepa SHuffle Express T7 lysY de *E. coli* se transformaron con cada una de las tres construcciones pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli* obtenidas (clona 1-3) (Lobstein et al. 2012).

Para el ensayo de expresión de la TvLEGU-1 con este vector se indujo con IPTG un cultivo de cada clona recombinante *E. coli* SHuffle Express T7 lysY- pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli* (clona 1-3) y se obtuvieron las fracciones soluble e insoluble. El peso molecular estimado para la TvLEGU-1 (42.9 kDa) fusionada al MBP (43.1 kDa) es de 86 kDa (http://www.bi.up.ac.za/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=pepstats).

Mediante un WB se determinó si la TvLEGU-1 fusionada al MBP recombinante se encontraba en la fracción insoluble y/o soluble. En los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE al 10 %) se observa la presencia de un péptido del tamaño esperado (86 kDa) únicamente en la fracción insoluble (**Figura 28A**, carriles 2, 4 y 6). Por WB utilizando el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1, se observó el reconocimiento de una banda de ~86 kDa (**Figura 28B**) en la fracción insoluble (carriles 2, 4 y 6), lo que confirma la expresión recombinante de la MBP-TvLEGU-1. Nuevamente se obtuvo la TvLEGU-1 recombinante en forma de cuerpos de inclusión. Esta proteína podría utilizarse para realizar ensayos de repliegamiento *in vitro*.

Figura 28. Expresión de la TvLEGU-1 en la cepa *E. coli* SHuffle Express T7 lysS usando la construcción pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli*



A) Electroforesis en gel de poliacrilamida. SDS-PAGE al 10% de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en la cepa SHuffle Express T7 lysS de *E. coli*. SHuffle Express-pCri-1b- *tvlegu-1-opt-e. coli* (clona1-3). Fracción soluble (**carriles 1, 3 y 5**) e insoluble (**carriles 2, 4 y 6**). M, Marcadores de peso molecular Precision Plus Protein standard.

B) Ensayo de Western Blot utilizando el anticuerpo anti-TvLEGU-1r. Se corroboró la expresión de la TvLEGU-1 fusionada a la MBP después de la inducción con IPTG como una proteína en formada de cuerpos de inclusión (~86 kDa) (**carriles 2, 4 y 6**).

Sumario de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en el sistema de *E. coli*

Los ensayos de expresión de la TvLEGU-1 recombinante en el sistema de *E. coli*, probados hasta ahora, resultaron en su obtención como una proteína agregada en forma de cuerpos de inclusión, aun cuando se utilizaron algunas estrategias de expresión que ayudan a mitigar los problemas de mal plegamiento durante la obtención heteróloga de proteínas en este sistema, tales como: disminución de la temperatura durante la etapa de inducción (Vasina and Baneyx 1997), su expresión recombinante como una proteína de fusión a etiquetas que ayudan a mejorar la solubilidad (Davis et al. 1999; Esposito and Chatterjee 2006; Kapust and Waugh 1999) y la regulación de la tasa de síntesis y expresión del gen para disminuir o evitar su expresión basal (Makrides 1996; Studier 2005). En la **Tabla 9** se resume los resultados de la expresión de la TvLEGU-1 en *E. coli*.

Tabla 9. Resultados de la expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de expresión bacteriano de *E. coli* utilizando diferentes construcciones y cepas de expresión

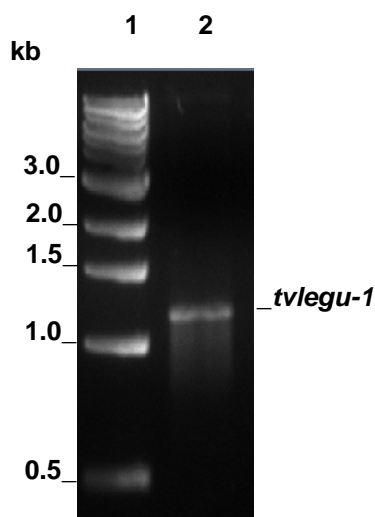
Construcción	Cepa de <i>E. coli</i>	Etiqueta	Expresión	Purificación	Replegamiento
<i>tvlegu-1</i>-pET-21b (+)	C41(DE3) / pREP-4	6 × His	Soluble: procesamiento y/o degradación C.I.	Afinidad a níquel	+
<i>tvlegu-1</i>-pGEX-6P-1	<i>BL21</i> (DE3)	Glutación - S - transferasa (GST)	C.I.	Afinidad a glutación	-
<i>tvlegu-1</i>-pPROEX-HTb	SHuffle Express	6 × His	C.I.	Afinidad a níquel	-
<i>tvlegu-1</i>-<i>opt-e. coli</i>-pCri-1b.	SHuffle Express T7 lysS	6 × His y proteína de unión a maltosa (MBP)	C.I.	Afinidad a maltosa y níquel	+

Expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de expresión de *P. pastoris*

Subclonación del gen nativo *tvlegu-1* en el vector de expresión pPICZ α B

En el 2008 Götz y col. (Gotz et al. 2008) reportaron la clonación del gen nativo *tvlegu-1* en el vector pPICZ α B para la expresión heteróloga de la TvLEGU-1 recombinante en el sistema de expresión de *P. pastoris*. Por medio de la comparación de aminoácidos de la TvLEGU-1 mediante un alineamiento con las secuencias reportadas en la base de datos para los zimógenos de la legumina de humano y del parásito *S. mansoni*, se estimó que el sitio de inicio del zimógeno de la TvLEGU-1 comienza a partir de la glutamina localizada en la posición cinco (Gln⁵, Q⁵) del N-terminal de la secuencia aminoacídica (Gotz et al. 2008). Por esta razón en el presente trabajo se diseñó un iniciador directo (5'→3') (**Tabla 3**) para amplificar el gen nativo *tvlegu-1* sin los primeros 15 nucleótidos que codifican para los aminoácidos comprendidos entre la Met¹ y la Lys⁵. El producto de amplificación a partir de una reacción de PCR de aproximadamente 1.2 kb (**Figura 29**), utilizando DNA de *T. vaginalis* como molde, se cortó y purificó para su posterior clonación en el vector de expresión pPICZ α B (Invitrogen). El vector pPICZ α B, con un tamaño de 3.593 kb, se usa para expresar y secretar proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Las proteínas recombinantes se expresan como proteínas fusionadas en su extremo amino terminal a la secuencia señal del factor alfa de apareamiento (α -MF, por sus siglas en inglés, con un tamaño de 10 kDa) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 15**).

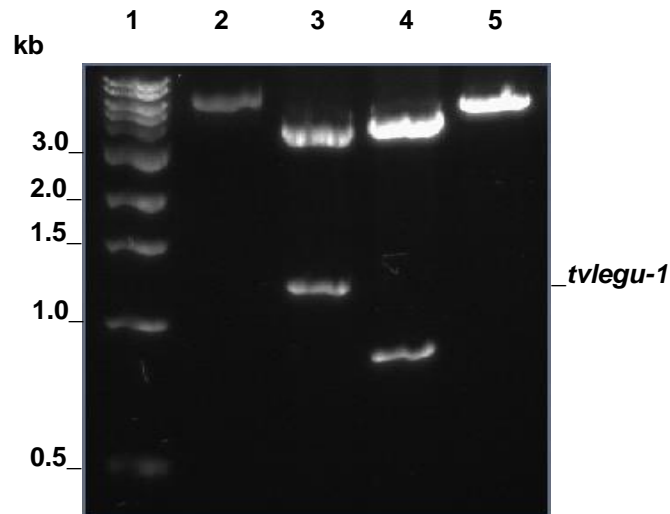
Figura 29. Amplificación por PCR del gen *tvlegu-1*



Un fragmento de DNA que codifica para la TvLEGU-1 se amplificó por PCR (**carril 2**) utilizando DNA genómico de *T. vaginalis* como DNA molde. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5× y se utilizó marcador de tamaño molecular de 1kb DNA Ladder (**carril 1**).

El fragmento amplificado por PCR que codifica para el precursor de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis* digerido con las enzimas *Pst* I y *Not* I, se subclonó en el vector pPICZαB previamente digerido con las mismas enzimas, para obtener la construcción pPICZαB-*tvlegu-1*. La mezcla de ligación vector-inserto se transformó en *E. coli* DH5α y se crecieron en placas de LB-agar-Zeocina (25 μg/mL). Con el DNA plasmídico de la construcción pPICZαB-*tvlegu-1* se realizó una doble digestión con las enzimas *Pst* I y *Not* I y se observó un fragmento ~1.2 kb y una banda de ~3.6 kb, correspondiente al ORF del precursor de la TvLEGU-1 y al vector pPICZαB, respectivamente (**Figura 30**, carril 3). En la digestión con la enzima *Hind*III se observaron dos fragmentos de ~0.8 y de ~3.8 kb (carril 4) y al digerir con la enzima *Sac* I se linearizó la construcción pPICZαB-*tvlegu-1*, observandose una banda de ~4.8 kb (carril 5).

Figura 30. Análisis de restricción del DNA plasmídico de las clonas de DH5 α transformadas con la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1*



El DNA plasmídico de una de las clonas se sometió a una doble digestión con las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I para liberar un fragmento de ~1.2 kb que corresponde al ORF del gen *tvlegu-1* (**carril 4**). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.0% en amortiguador TBE 0.5 \times y se utilizó marcador de tamaño molecular 1kb Plus (**carril 1**). La digestión con la enzima *Hind*III generó dos fragmentos ~0.8 kb y uno de ~3.8 kb (**carril 4**). Digestión con la enzima *Sac*I se linearizó la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* de ~4.8 kb (**carril 5**).

Secuenciación del DNA plasmídico de la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1*

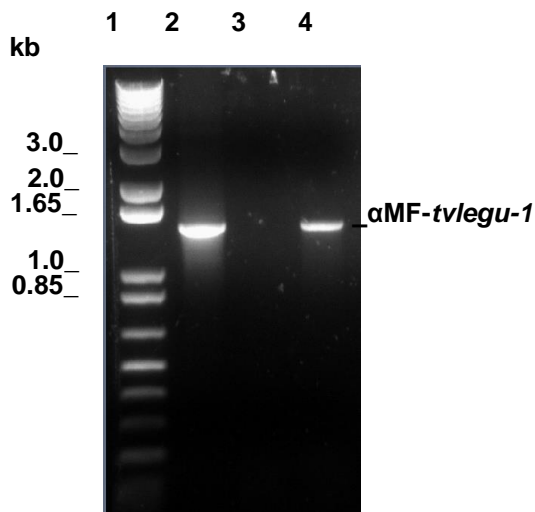
Una vez que se comprobó por un análisis de restricción la presencia del fragmento que codifica para el precursor de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis*, el vector de expresión pPICZ α B-*tvlegu-1* se envió a secuenciar con los oligonucleótidos 5'AOX1 y 3'AOX1. La secuencia obtenida de los electroferogramas enviados por el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM se comparó con la secuencia nucleotídica del gen nativo *tvlegu-1* reportada en la base de datos del NCBI (Leon-Felix et al. 2004) y se comprobó que efectivamente se tenía clonado el fragmento de interés en el vector pPICZ α B (Apéndice V).

Transformación de la levadura *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1*

Esferoplastos de la levadura *P. pastoris* X-33 se transformaron con aproximadamente 3.5 μ g del DNA plasmídico de la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* previamente digerida con la enzima de restricción *Sac* I. Las clonas transformantes se seleccionaron por resistencia a Zeocina en placas que contenían YPD-agar-Zeocina (100 μ g/mL). A una de las transformantes que presentó resistencia a Zeocina se realizó un análisis de PCR, utilizando los oligos 5'AOX1, 3'AOX1 y α -Factor.

El análisis de PCR de *P. pastoris* X-33 transformada con la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* para la expresión de la TvLEGU-1 reveló un fragmento de ~1.4 kb en un gel de agarosa al 1% utilizando los oligos α -Factor y 3'AOX1 (Figura 31, carril 2). Este resultado está de acuerdo con la distancia calculada de 1457 pb entre el sitio de alineamiento del oligo α -Factor y 3'AOX1 en la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1*, que corresponde al tamaño del gen nativo *tvlegu-1* fusionado a la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia señal del α -Factor de *S. cerevisiae* (Figura 31, carril 4) cuando se utilizó la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* como DNA molde en la PCR, este patrón no se observó al correr la reacción de PCR donde se utilizó DNA cromosómico de *P. pastoris* X-33 sin transformar (Figura 31, carril 3). Junto con la resistencia a Zeocina observada, esto indica una exitosa integración de la construcción en el DNA cromosómico de *P. pastoris*.

Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa del análisis de PCR de *P. pastoris* X-33 transformada con la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1*



Gel de agarosa al 1% para analiza el poductor de PCR de 1.4 kb (distancia calculada de 1457 pb entre el sitio de alineamiento de los oligonucleótidos directo α -Factor y reverso 3'AOX1 que corresponde a la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia señal del α -Factor de *S. Cerevisiae* fusionada al gen nativo *tvlegu-1*) al utilizar DNA genómico de la clona recombinante de *P. pastoris* X-33 transformada con la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* (**carril 2**) y DNA plasmídico de la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* (control positivo) (**carril 4**). No se observo ninguna banda al correr el producto de PCR donde se utilizó DNA genómico de *P. pastoris* X-33 sin transformar (control negativo) (**carril 3**). Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (**carril 1**).

Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en la transformante *P. pastoris* X-33-pPICZ α B-*tvlegu-1*

Para evaluar la expresión y secreción de la TvLEGU-1 en *P. pastoris* utilizando la secuencia señal del α -Factor de *S. cerevisiae*, una de las clonas de *P. pastoris* X-33 transformada con la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* se indujo con metanol durante 48 h. Así mismo, una colonia de la cepa nativa *P. pastoris* X-33 se creció e indujo bajo las mismas condiciones (control negativo de expresión de la TvLEGU-1), se tomaron muestras del sobrenadante libre de células y se realizó un análisis de proteínas mediante SDS-PAGE para detectar la expresión y secreción de la TvLEGU-1, para su posterior purificación y caracterización. En un primer análisis de SDS-PAGE no se logró observar la sobre-expresión de TvLEGU-1 en la muestra del sobrenadante de la clona transformante (datos no mostrados), por lo que fue necesario concentrar la proteína del sobrenadante por precipitación con TCA al 10% y se analizó por SDS-PAGE.

Como se puede observar en el carril 2 de la **Figura 32A** hay una doble banda de aproximadamente 42 kDa, que posiblemente corresponde a la sobre-expresión de la TvLEGU-1 en *P. pastoris*. Este tamaño corresponde con el tamaño de la TvLEGU-1 recombinante completa obtenida en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión usado como control (**Figura 32A**, carril 3).

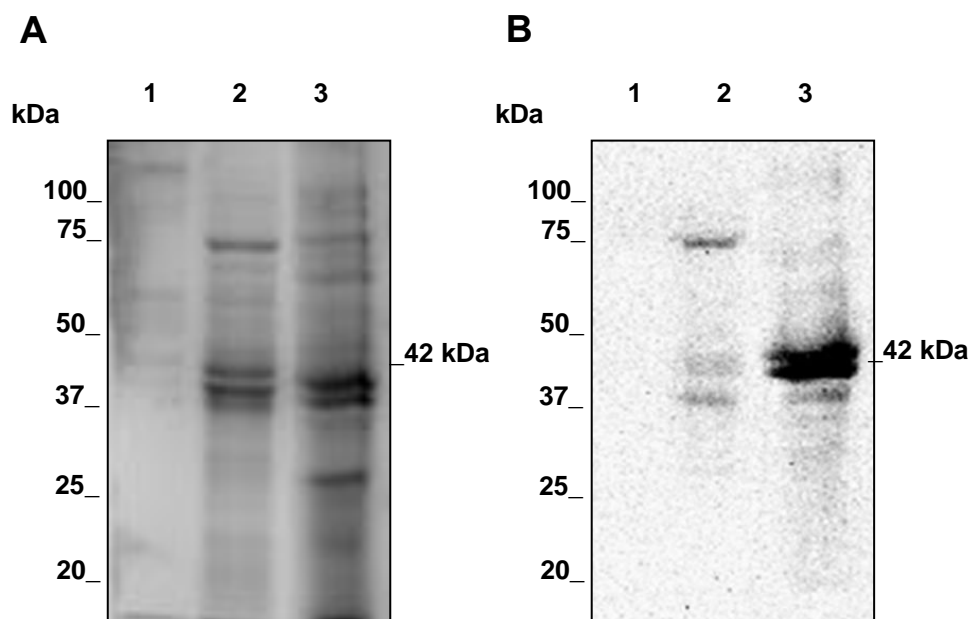
Ensayo tipo “Western blot” para confirmar la presencia de la TvLEGU-1 en el sobrenadante de *P. pastoris* X-33 pPICZ α B-*tvlegu-1*

Para comprobar la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en la levadura *P. pastoris*, se realizó un ensayo de WB con los anticuerpos policlonales anti-péptido-TvLEGU-1 generados contra el péptido NEVVAPKADAKI contenido en la secuencia proteica de la TvLEGU-1. En la **Figura 32A** se muestra el patrón proteico de lo que se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para el ensayo. En la **Figura 32B**, se observa que la muestra de la TvLEGU-1 expresada como cuerpos de inclusión en *E. coli* (control positivo) presentó un fuerte reconocimiento con los anticuerpos anti-péptido (carril 3), mientras que se observó un reconocimiento débil con la proteína con la proteína de *P.*

pastoris (carril 2). Estos resultados indican que la expresión y secreción de la TvLEGU-1 se pudo ver afectada por las condiciones de cultivo ensayadas, a pesar de que se utilizó la secuencia señal del factor alfa de apareamiento (α -MF, por sus siglas en inglés) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Uno de los parámetros importantes para la eficiente expresión en el sistema de expresión de *P. pastoris* es la adecuada oxigenación del medio durante la inducción con metanol, por lo que se recomienda el uso de matraces Erlenmeyer bafleados. Por lo tanto, posiblemente la poca o nula oxigenación durante la inducción, pudo ser una de las razones por las cuales no se logró observar con claridad la presencia de la TvLEGU-1 en el sobrenadante de *P. pastoris* X-33 pPICZ α B-*tvlegu-1* cuando se indujo con metanol al 0.5%, dado que el cultivo se realizó en matraces convencionales (sin baffles).

Figura 32. Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en la transformante *P. pastoris* X-33-pPICZ α B-*tvlegu-1*



A) SDS-PAGE al 10% de la proteína secretada durante la inducción con metanol al 0.5% de las levaduras: *P. pastoris* X-33 (**carril 1**) y la transformante *P. pastoris* X-33-pPICZ α B-*tvlegu-1* (**carril 2**); así como de la TvLEGU-1 expresada en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión utilizada control positivo (**carril 3**). Marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Estandar.

B) Ensayo de Western Blot con el anticuerpo policlonal anti-TvLEGU-1r para la inmunodetección de la TvLEGU-1.

Inducción de la expresión de la TvLEGU-1 en el sistema de *P. pastoris* a escala de 2L

El escalamiento del proceso de expresión en *P. pastoris*, de matraz agitado a fermentador, incrementa hasta diez veces la producción de la proteína recombinante (Li et al. 2007). Esto se debe principalmente a la capacidad que tiene la levadura para crecer en altas densidades celulares cuando se cultiva en fermentador, además de que parámetros tales como la temperatura, aeración (demanda de oxígeno), pH y la alimentación del

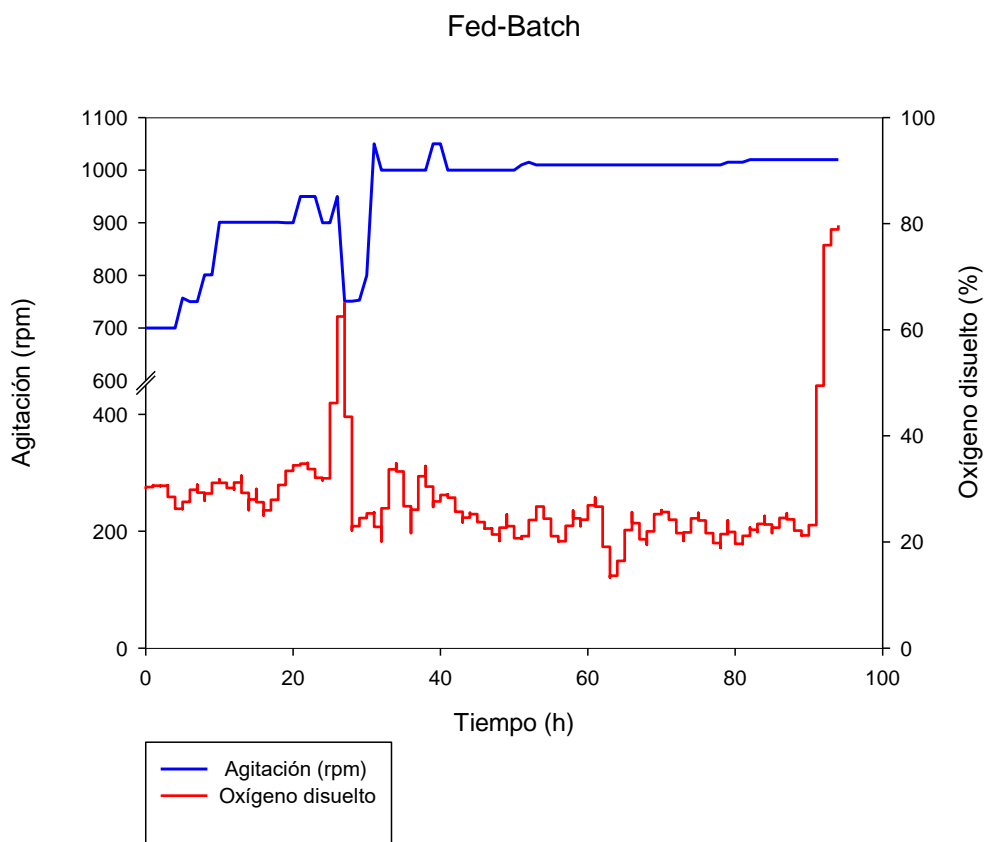
metanol pueden ser controlados (Cereghino et al. 2002). Por lo que, en esta etapa del presente trabajo se cultivó la clona *P. pastoris* X-33 pPICZ α B-*tvlegu-1* en un fermentador de 2L (Applikon Biotechnology) para llevar a cabo la inducción de la expresión de la TvLEGU-1. El proceso básicamente comprendió dos etapas: una etapa de lote (batch) utilizando glicerol como fuente de carbono, seguida de la etapa de inducción con la adición de metanol por lote alimentado (fed-batch). Durante la primera etapa se permitió al cultivo crecer a una velocidad máxima de crecimiento, con el objetivo de obtener una alta densidad celular (O.D. 600nm ~ 100) y 24 h después se inició la fase de inducción con la adición de metanol (6.5 mL/Lh), durante la cual se buscó la expresión y secreción de laTvLEGU-1 al medio de cultivo.

En la **Tabla 10** se presentan algunos de los parámetros que se controlaron durante la inducción de la expresión de la TvLEGU -1 en *P. pastoris* a una escala de 2L. Para el control de estos parámetros se utilizó un controlador Applikon ADI 1030; siendo el porcentaje de oxígeno disuelto uno de los parámetros más críticos durante la inducción con metanol al utilizar *P. pastoris* (Cereghino et al. 2002). Como se muestra en la **Figura 33**, el porcentaje de oxígeno disuelto se logró controlar por cerca del valor del setpoint (20%), esto fue posible al mantener una agitación entre 700 y 1000 rpm, así como con la adición de una mezcla de oxígeno puro y aire a un flujo de entre 1-1.5 y 0.2-0. vvm, respectivamente.

Tabla 10. Parámetros que se controlaron durante la inducción de la expresión de la TvLEGU -1 en el sistema de expresión de *P. pastoris* a una escala de 2L

Parámetro	Setpoint
Temperatura (°C)	30
pH	6.0
Oxígeno disuelto (%)	20
Agitación (rpm)	700-1000
Flujo de aire (vvm)	1-1.5
Flujo de oxígeno (vvm)	0.2-0.5
Metanol (mL/Lh)	6.5
Densidad óptica O.D. 600nm	100

Figura 33. Perfil de agitación y oxígeno disuelto durante la inducción de la expresión de la TvLEGU -1 en *P. pastoris* a una escala de 2L



El porcentaje de oxígeno disuelto se controló cerca del valor del setpoint (20%), esto fue posible al mantener una agitación entre 700 y 1000 rpm, así como con la adición de una mezcla de oxígeno puro y aire a un flujo de entre 1-1.5 y 0.2-0. vvm, respectivamente.

Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en *P. pastoris* a escala de 2L

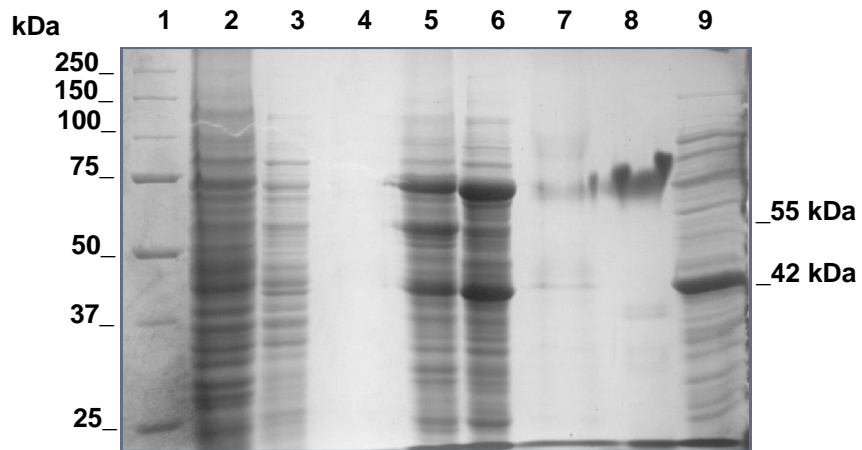
Después de haber transcurrido 60 h de inducción con metanol, cabría esperar que la expresión y por ende la secreción de la TvLEGU-1 utilizando la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1* mejorara al haber controlado y mantenido la demanda de oxígeno durante la etapa de inducción de la expresión (\approx 20% oxígeno disuelto)(Macauley-Patrick et al. 2005); sin embargo, la sobre-expresión de un péptido de 55 kDa (TvLEGU-1 fusionada al α -MF de *Sacharomyces cerevisiae*) en la muestra de la fracción insoluble de la cepa recombinante *P. pastoris* X-33-pPICZ α B-*tvlegu-1* (**Figura 34A**, carril 5) y su inmunodetección mediante un ensayo de WB utilizando anticuerpos policlonales anti-TvLEGU-1 (**Figura 34B**, carril 5), sugiere que bajo las condiciones ensayadas se mejoró la expresión de la TvLEGU-1, no así su correcto procesamiento (eliminación del α -MF) y por ende su secreción al medio de cultivo.

Figura 34. Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en *P. pastoris* a escala de 2L

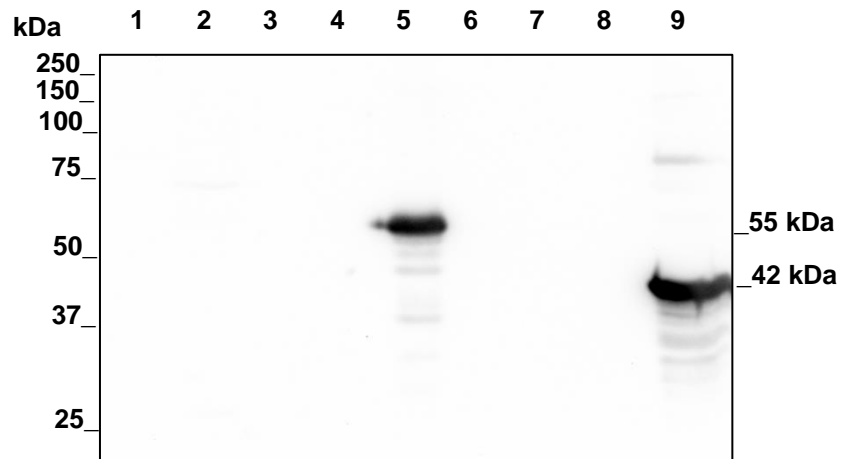
A) Electroforesis en gel de poliacrilamida de la expresión de la TvLEGU-1 en *P. pastoris* a escala de 2L. En el SDS-PAGE al 10% se muestra el sobrenadante de la cepa nativa X-33 de *P. pastoris* (**carril 3**) utilizando metanol al 0.5% como fuente de carbono; de la fracción insoluble (**carril 2**) y fracción soluble (**carril 3**) de la biomasa de *P. pastoris* X-33; sobrenadante del cultivo después de la inducción con metanol de la cepa *P. pastoris* X-33-pPICZ α B-*tvlegu-1* en el fermentador Applikon de 2 L (**carril 7**), así como muestras de la fracción soluble (**carril 6**) e insoluble (**carril 5**) de la pastilla celular de esta cepa recombinante. Marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Estandar (**carril 1**). Control positivo de TvLEGU-1 (42 kDa) expresada como cuerpos de inclusión en *E. coli* (**carril 9**).

B) Ensayo de WB con el anticuerpo anti -TvLEGU-1r para la inmunodetección de la TvLEGU-1 expresada en *P. pastoris*.

A



B



Obtención del vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70 para el sistema de *P. pastoris*

Aunque el α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los péptidos señal comúnmente más utilizados en *P. pastoris*, es evidente que en el caso de la expresión de la TvLEGU-1 fusionada a este péptido señal posiblemente esté ocasionando su retención en el retículo endoplasmático (ER) o el complejo de Golgi de la levadura (Allison and Young 1989). Se piensa que el correcto plegamiento y secreción de la proteína cargo en algunos casos se ven restringidos debido a la naturaleza hidrofóbica de los aminoácidos comprendidos entre la Asn⁵⁷ y la Ile⁷⁰, que conforman la tercera alfa hélice del α -MF (Lin-Cereghino et al. 2013). Algunas de las estrategias utilizadas para mejorar la secreción al utilizar este péptido señal involucran su modificación mediante la delección de la secuencia de nucleótidos que codifican para estos aminoácidos (Lin-Cereghino et al. 2013). Se ha reportado que con la remoción de esta alfa hélice (MAT α : Δ 57-70) se aumenta hasta en un 50% la secreción de la lipasa B de *Candida antarctica* y de la peroxidasa de rábano (HRP) en *P. pastoris* (Lin-Cereghino et al. 2013).

Por lo tanto, con el objetivo de determinar si la remoción de la tercera alfa hélice del α -MF contribuye al correcto procesamiento y secreción de la TvLEGU-1 en *P. pastoris*, se expresó la TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70, que tiene deletados los nucleótidos que codifican para los aminoácidos Asn⁵⁷ y la Ile⁷⁰ del α -MF de *Saccharomyces cerevisiae*. Para lograr este objetivo se diseñaron los iniciadores directo (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y reverso (5'-CTGCAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAG-3') para amplificar la secuencia de DNA que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70, contenida en el vector MATalpha 57-70/HRP (**Figura 17**). Una alícuota de este vector fue amablemente donado por la Dra. Joan Lin-Cereghino de la Universidad del Pacífico (California, USA) (Lin-Cereghino et al. 2013). El producto de la amplificación a partir de una reacción de PCR, de aproximadamente 0.315 kb, utilizando DNA plasmídico del vector MAT α 57-70/HRP como molde, se cortó de un gel de agarosa al 1% y se purificó, para posteriormente utilizarlo para sustituir la secuencia del α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* (0.34 kb) contenida en el vector expresión pPICZ α B (Invitrogen).

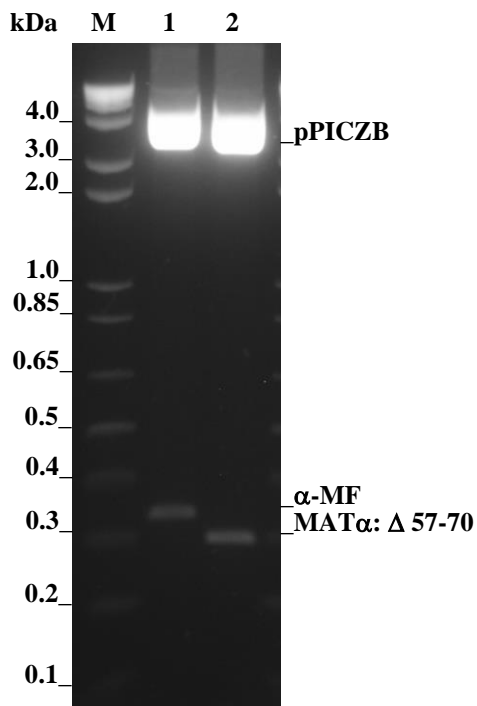
Para sustituir la secuencia de nucleótidos del α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* por la secuencia que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70, primeramente, mediante la digestión del vector pPICZ α B con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pst* I se liberó la secuencia de nucleótidos del α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* (0.34 kb), y el fragmento correspondiente al plásmido pPICZB se cortó de un gel de agarosa al 1% y se purificó.

El fragmento amplificado por PCR que codifica para el péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 (0.315 kb) digerido con las enzimas *Hind* III y *Pst* I, se subclonó en el vector pPICZ α B previamente digerido con las mismas enzimas, para obtener la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70. La mezcla de ligación vector-inserto se transformó en *E. coli* DH5 α y se plaquearon en LB-agar-Zeocina (25 μ g/mL). Las clonas de *E. coli* DH5 α que presentaron resistencia a Zeocina se crecieron en medio líquido LB-Zeocina (25 μ g/mL) para purificar DNA plasmídico y realizar una digestión con enzimas de restricción para corroborar la presencia del inserto de interés.

Al realizar una doble digestión del DNA plasmídico de la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70 con las enzimas *Hind* III y *Pst* I se liberó un fragmento de \sim 0.315 kb y una banda de \sim 3.257 kb, del fragmento del MAT α : Δ 57-70 y del vector pPICZB, respectivamente (**Figura 35**, carril 2).

El vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70 se secuenció con el oligonucleótido 3'AOX1. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia nucleotídica del MAT α 57-70/HRP (Lin-Cereghino et al. 2013) (**Apéndice VI**) y se comprobó la clonación del fragmento de interés en el vector pPICZB (**Apéndice VII**).

Figura 35. Análisis de restricción del DNA plasmídico de los vectores de expresión pPICZ α B y pPICZB-MAT α : Δ 57-70



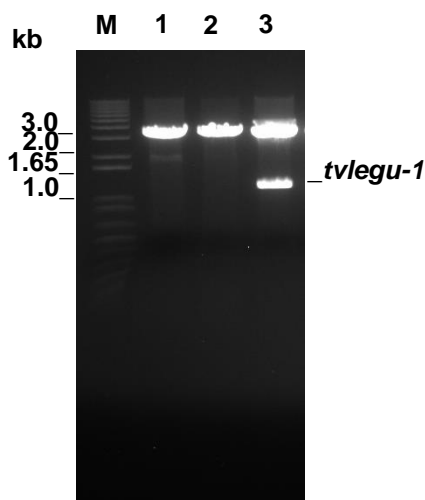
Doble digestión del DNA plasmídico de los vectores de expresión pPICZ α B y pPICZB-MAT α : Δ 57-70 con las enzimas de restricción *Hind III* y *Pst I* para liberar un fragmento de ~0.34 y ~0.315 kb, del fragmento que codifica para el α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* (**carril 1**) y del péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 (**carril 2**), respectivamente; La banda de ~3.257 kb corresponde al vector pPICZB (**carril 1** y **carril 2**). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2% en amortiguador TBE 0.5 \times y se utilizó marcadores de tamaño molecular 1kb Plus (**carril M**).

Subclonación del gen nativo *tvlegu-1* en el vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70

Para subclonar el gen nativo *tvlegu-1* en el vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70, primeramente, se digirió el vector pPICZ α B-*tvlegu-1* con las enzimas de restricción *Pst* I y *Not* I, el fragmento de DNA liberado (1.2 kb) que codifica para la TvLEGU-1, se cortó de un gel de agarosa al 1% y se purificó para su posterior clonación en el vector de expresión pPICZB-MAT α : Δ 57-70 previamente digerido con las enzimas *Pst*I y *Not*I, para obtener la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1*. La mezcla de ligación vector-inserto se transformó en células de *E. coli* DH5 α y se crecieron en placas de LB-agar-Zeocina (25 μ g/mL). Las clonas de *E. coli* DH5 α que presentaron resistencia a Zeocina se crecieron en medio líquido LB-Zeocina (25 μ g/mL), se purificó el DNA plasmídico y se realizó una digestión con enzimas de restricción *Pst* I y *Not* I para corroborar la presencia del inserto de interés.

En la **Figura 36** se observa el análisis de restricción con las enzimas *Pst* I y *Not* I del DNA plasmídico de la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1* de las clonas que presentaron la liberación un fragmento de ~1.2 kb y una banda de ~3.6 kb, del precursor de la TvLEGU-1 y del vector pPICZ α B, respectivamente (carril 3).

Figura 36. Análisis de restricción del DNA plasmídico de la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70 -*tvlegu-1*



Una de las clonas obtenidas se creció en medio líquido LB, se le extrajo el DNA plasmídico y se sometió a una doble digestión con las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I para liberar un fragmento de 1.2 kb que corresponde al ORF del gen *tvlegu-1* (**carril 3**). En el **carril 2** se muestra la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70 -*tvlegu-1* sin digerir. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.0% en amortiguador TBE 0.5 \times y se utilizaron marcadores de tamaño molecular 1kb Plus (**carril M**).

Expresión de la TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 en *P. pastoris*

La biomasa obtenida del crecimiento de una colonia de *P. pastoris* X-33 transformada con la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1* en el medio BMGY se resuspendió en el medio BMMY en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se incubó a 30 °C y 250 rpm. La inducción de la expresión se llevó a cabo con metanol a una concentración final de 0.5% (v/v) cada 24 h durante 48 h. Así mismo, una colonia de la cepa nativa *P. pastoris* X-33 se creció e indujo bajo las mismas condiciones (control negativo de expresión de la TvLEGU-1).

Del cultivo de la cepa transformante *P. pastoris* X-33-pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1* inducida con metanol durante 48 h se tomó una alícuota del sobrenadante libre de células y se analizó por SDS-PAGE la presencia de la TvLEGU-1 (42 kDa). Por SDS-PAGE (**Figura 37A**) no se logró observar ningún péptido del tamaño esperado (42 kDa), que pudiera corresponder a la sobre-expresión de TvLEGU-1 en la muestra del sobrenadante de la clona transformante *P. pastoris* X-33 pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1*; sin embargo se observó la presencia de un péptido de aproximadamente 75 kDa (**Figura 37A**, carril 6) que podría corresponder a la TVLEGU-1 con algún tipo de modificación y/o procesamiento, por lo que se realizó un ensayo de WB para confirmar que si esta proteína de alto peso estaba relacionada con la TvLEGU-1.

Ensayo de “Western blot” para confirmar la presencia de la TvLEGU-1 en el sobrenadante de *P. pastoris* X-33 pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1*

Para determinar que el péptido de 75 kDa del sobrenadante del cultivo de la cepa transformante *P. pastoris* X-33 pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1* inducida con metanol esta relacionado a la TvLEGU-1, se realizó un ensayo de WB utilizando el anticuerpo monoclonale anti-His(C-term)-HRP. En la **Figura 37A** se muestra el patrón proteico de las muestras transferidas a una membrana de nitrocelulosa para el ensayo de WB. La **Figura 37B** muestra que el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP no reaccionó con el péptido de 75 kDa observado en el sobrenadante (carril 6). Estos resultados indican que dicho péptido podría corresponder a alguna proteína de la levadura que se secreta en las condiciones de expresión utilizadas. En su lugar, se observó el reconocimiento de una banda de 50 kDa (TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70), así como otras bandas de menor tamaño que podían corresponder a productos del posible procesamiento y/o degradación, en la muestra de la fracción insoluble de la cepa recombinante *P. pastoris* X-33-pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1* (carril 8). De igual manera, por WB también se observó un reconocimiento débil de un péptido de ~50 kDa en la fracción soluble (carril 7). Estos resultados sugieren que aunque la TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 (50 kDa) se transloca del citosol al retículo endoplásmico (ER), al igual

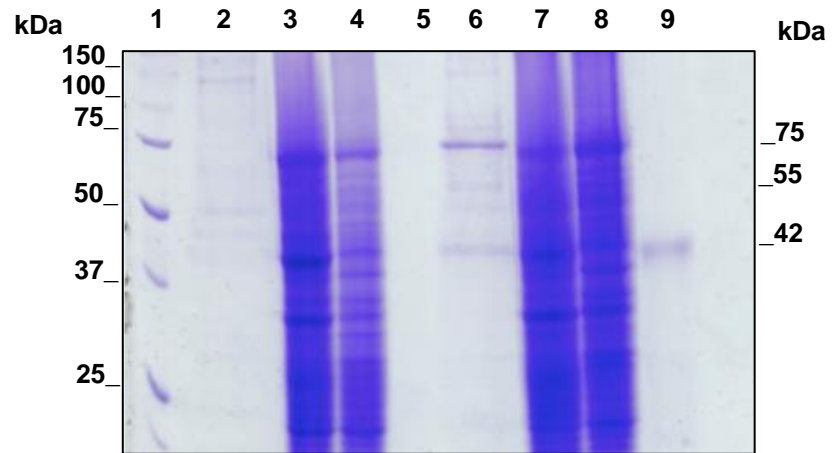
que la TvLEGU-1 fusionada al α -MF (55 kDa), no se procesa correctamente y posiblemente sea la causa de su retención dentro de la levadura (**Figura 37B**, carril 8).

Figura 37. Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 en *P. pastoris*

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida de la expresión de la TvLEGU-1 fusionada al péptido señal modificado MAT α : Δ 57-70 en *P. pastoris*. En el gel (SDS-PAGE al 10%): Patrón de proteínas secretadas (sobrenadante) durante el cultivo de la cepa nativa X-33 de *P. pastoris* (**carril 2**) utilizando metanol al 0.5% como fuente de carbono; así como la fracción soluble (**carril 3**) e insoluble (**carril 4**) de la biomasa de esta cepa. Patrón de proteínas secretadas al medio de cultivo después de la inducción con metanol de la cepa *P. pastoris* X-33-pPICZB-MAT α : Δ 57-70-*tvlegu-1* (**carril 6**); fracción soluble (**carril 7**) e insoluble (**carril 8**) de la biomasa de esta cepa recombinante. Marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Estandar (**carril 1**). Control positivo de TvLEGU-1 (42 kDa) expresada como cuerpos de inclusión en *E. coli* (**carril 9**).

B) Ensayo de Western Blot de un duplicado de (A) utilizando el anticuerpo monoclonal anti-anti-His(C-term)-HRP.

A



B



Optimización del gen *tvleglu-1* de *T. vaginalis* de acuerdo con el uso de codones preferenciales de *P. pastoris*

Con el objetivo de mejorar la expresión heteróloga de genes, se han desarrollado muchas estrategias que incluyen el aumentar el número de copias de los genes heterólogos, utilizar un péptido señal adecuado en el vector de expresión, así como la optimización de las condiciones de cultivo (Ramon et al. 2007). Sin embargo, estas estrategias de optimización no siempre resultan en una alta producción de proteína recombinante como se pudiera esperar. Se ha demostrado que la diferencia en el uso de codones entre la levadura y la secuencia nativa del gen heterólogo tiene un impacto significativo en la expresión de la proteína recombinante. En algunos casos, las proteínas recombinantes se logran expresar después de la optimización de codones para *P. pastoris*. En algunos otros, los rendimientos de producción de la proteína recombinante aumentan un par de veces gracias a la optimización de codones (Teng et al. 2007; Xiong et al. 2006). Por lo tanto, con el objetivo de explorar condiciones que permitan expresar y secretar correctamente la TvLEGU-1 en *P. pastoris*, en esta parte del trabajo se optimizó el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* en la secuencia del gen nativo *tvlegu-1* que codifica para la CP de tipo legumaína TvLEGU-1 de *T. vaginalis*.

La secuencia del gen nativo (*tvlegu-1*, No. acceso del GenBank: AY326446; TVAG_426660) (Leon-Felix et al. 2004) de 1167 pb codifica para una proteína de 388 aminoácidos (aa). De acuerdo con el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), la secuencia del gen nativo *tvlegu-1* de *T. vaginalis* contiene algunos codones que raramente son utilizados por la levadura, por ejemplo, GGC (Gly), CTC/TTA (Leu), AGG/CGT (Arg), AGC (Ser), GTA (Val), de los cuales algunos se utilizan en menos del 15% (**Apéndice VIII**). Además, estos codones podrían encontrarse formando grupos de codones consecutivos que podría resultar en un bajo nivel de expresión en *P. pastoris* (**Apéndice IX**).

Para resolver este problema, el ORF del gen que codifica para la TvLEGU-1 se optimizó de acuerdo con el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* y se ordenó el gen sintético a la compañía GenScript (Piscataway, NJ, USA) sin ninguna secuencia señal adicional y con los sitios de restricción *Kpn* I (GGTACC) y *Not* I (GCGGCCGC) que

flanquean la secuencia del gen optimizado. Además, se eliminaron otros sitios de restricción presentes en el gen que comúnmente se utilizan en el proceso de clonación del gen y que están contenidos en los diversos vectores de expresión comerciales (para la secuencia ver, **Apéndice X**).

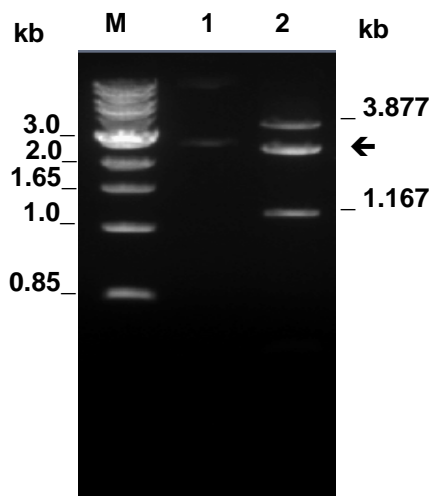
Al mismo tiempo, GenScript (Optimum Gene™ Optimization) ajustó el contenido G+C de un 49 a 41.58%; éste último se considera el más cercano en comparación al contenido de G+C reportado para el genoma de *P. pastoris* de 41.1% (De Schutter et al. 2009). De los 1167 nucleótidos que codifican para la TvLEGU-1, 253 nucleótidos (4.6%) se remplazaron en la secuencia del gen nativo, por lo que la secuencia de nucleótidos del gen optimizado (*tvlegu-1 opt*) comparte un 78.4% de identidad de nucleótidos con la secuencia del gen nativo (*tvlegu-1 wt*). El índice de adaptabilidad de codones (CAI, por sus siglas en inglés) en *P. pastoris* se incrementó de 0.73 a 0.83 para el gen de la *tvlegu-1*. Un CAI de 1.0 se considera perfecto en el organismo de expresión deseado y un CAI>0.8 es considerado como bueno, en términos de altos niveles de expresión.

Recuperación del vector pUC57-*tvlegu-1-opt*

El gen sintético *tvlegu-1-opt* optimizado con el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* que codifica para la TvLEGU-1, se clonó en los sitios EcoRV del vector pUC57 (vector de clonación en *E. coli*) por GenScript (Piscataway, NJ, USA) (**Apéndice XI**).

El DNA plasmídico (DNAp) de la construcción pUC57-*tvlegu-1-opt* se envió en papel filtro por la compañía GenScript en condiciones estériles para su protección contra cualquier contaminación. El DNAp se recuperó del papel filtro con la adición de agua grado biología molecular. Posteriormente, la construcción se transformó en células competentes *E. coli* DH5 α , las clonas seleccionadas se congelaron para su preservación en glicerol y se obtuvo DNAp para los experimentos subsecuentes. En la **Figura 38** se muestra el análisis de restricción de la construcción pUC57-*tvlegu-1-opt* con las enzimas *Kpn* I y *Not* I, para confirmar la presencia del gen *tvlegu-1-opt* de 1.167 kb.

Figura 38. Análisis de restricción de la construcción pUC57-*tvlegu-1-opt* para confirmar la presencia del gen *tvlegu-1-opt*



El gel de agarosa al 1% del DNA plasmídico pUC57-*tvlegu-1-opt* sin digerir (**carril 1**) y el DNA plasmídico pUC57-*tvlegu-1-opt* digerido con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Not* I (**carril 2**), para liberar el inserto de 1.167 kb del gen *tvlegu-1-opt*. El fragmento de 3.877 kb del DNA plasmídico pUC57-*tvlegu-1-opt* linearizado únicamente y el DNA plasmídico pUC57-*tvlegu-1-opt* sin digerir (←). Marcadores de peso molecular 1kb plus DNA ladder (**M**).

Clonación del gen *tvlegu-1-opt* que codifica para la TvLEGU-1 para su expresión de manera intracelular en *P. pastoris*

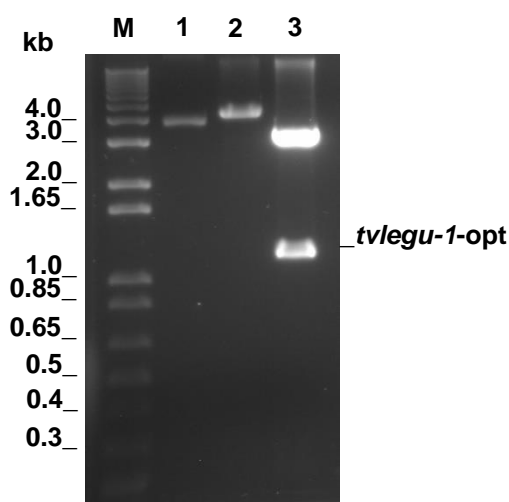
Aunque se ha reportado que la TvLEGU-1 está presente tanto en el citoplasma, organelos, así como en la superficie de *T. vaginalis*, a la fecha no se conoce su vía de secreción (Rendón-Gandarilla et al. 2013) y mediante el uso del servidor SignalP 4.0 no se identificó la existencia de algún péptido señal canónico en su secuencia, por lo que una alternativa para obtener la TvLEGU-1 en su conformación nativa utilizando el sistema de *P. pastoris* era expresándola en forma intracelular. En esta parte del trabajo se diseñaron los

oligonucleótidos necesarios para amplificar el gen *tvlegu-1-opt* y permitir su clonación en el vector pPICZB (Invitrogen) para su expresión de manera intracelular.

Para lograr este objetivo, se diseñaron oligonucleótidos que contienen la secuencia del gen que codifica para la TvLEGU-1, flanqueado en el extremo 5'→3' tanto por la secuencia consenso Kozak tomada del gen *AOX1* (GAAACGATGNN) que permitiría el reconocimiento del inicio de la traducción del gen *tvlegu-1-opt* en *P. pastoris* (Primer ATG), así como las secuencias del sitio de restricción *EcoR* I y en su extremo 3'→5' el sitio de restricción *Not* I (**Tabla 4**).

El gen *tvlegu-1-opt* para la expresión intracelular de la TvLEGU-1 se clonó en los sitios *EcoR* I-*Not* I del vector pPICBZ (Invitrogen) y se obtuvo la construcción pPICZB-*tvlegu-1* (opt) (**Figura 39**).

Figura 39. Análisis de restricción de la construcción pPICZB-*tvlegu-1-opt* para confirmar la presencia del gen *tvlegu-1-opt*



Gel de agarosa al 1% con el DNA plasmídico pPICZB-*tvlegu-1-opt* sin digerir (**carril 1**), digerido con las enzimas de restricción *Bgl* II (linearizado, 4.455 kb) (**carril 2**) y la digestión simultánea con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Not* I para liberar el inserto del gen *tvlegu-1-opt* (**carril 3**). Marcadores de peso molecular 1kb plus DNA ladder (**carril 1**).

Transformación de *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZB-*tvlegu-1-opt*

La construcción pPICZB-*tvlegu-1-opt* (cassettes de expresión) se linearizó con la enzima *Sac* I para transformar esferoplastos de la cepa X-33 de *P. pastoris* y por medio de eventos de recombinación homóloga con la región 5'AOX del genoma de la levadura se integró el cassette de expresión. La integración confirió a las clonas transformantes resistencia al ser crecidas en YPD-Agar-Zeocina (100 µg/mL), permitiendo seleccionar las que clonas que crecieron en presencia del antibiótico.

Análisis de la expresión intracelular de la TvLEGU-1 en el sistema de *P. pastoris*

Para verificar la expresión intracelular de TvLEGU-1 en *P. pastoris*, el paquete celular de un cultivo inducido con metanol de una transformante que contienen el cassette de expresión pPICZB-*tvlegu-1-opt* se resuspendió en amortiguador de ruptura (50 mM Fosfato de sodio pH 7.4, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 % de glicerol) y se pasó tres veces a través de la prensa francesa ejerciendo una presión de 1500 psig para la ruptura celular.

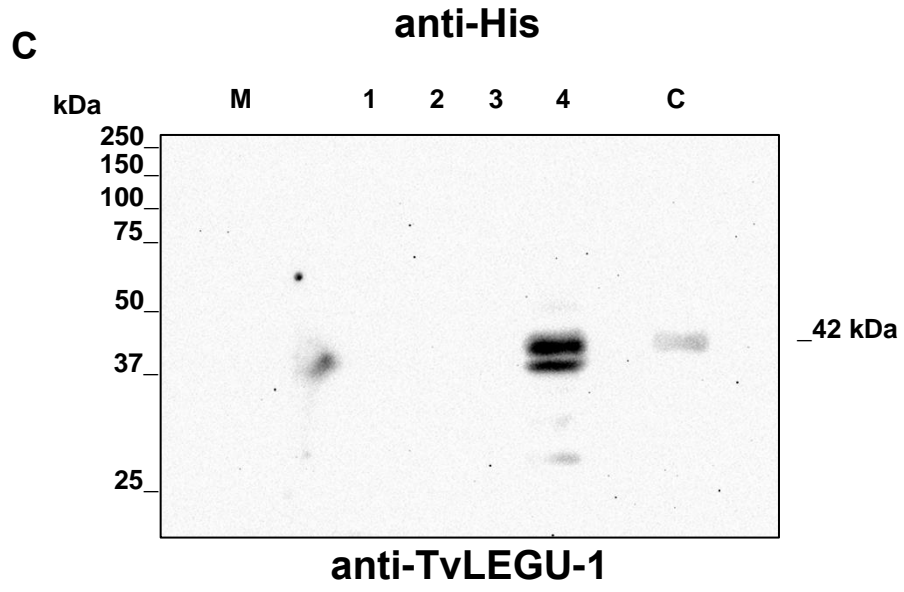
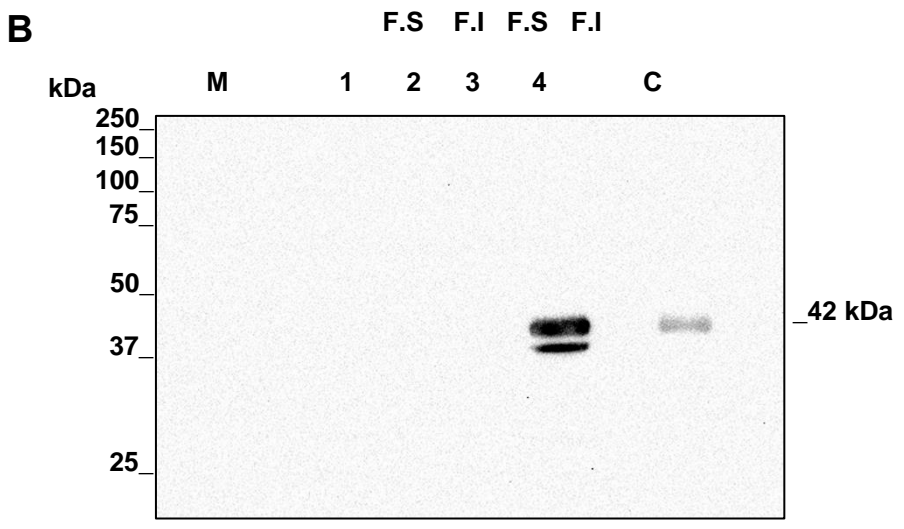
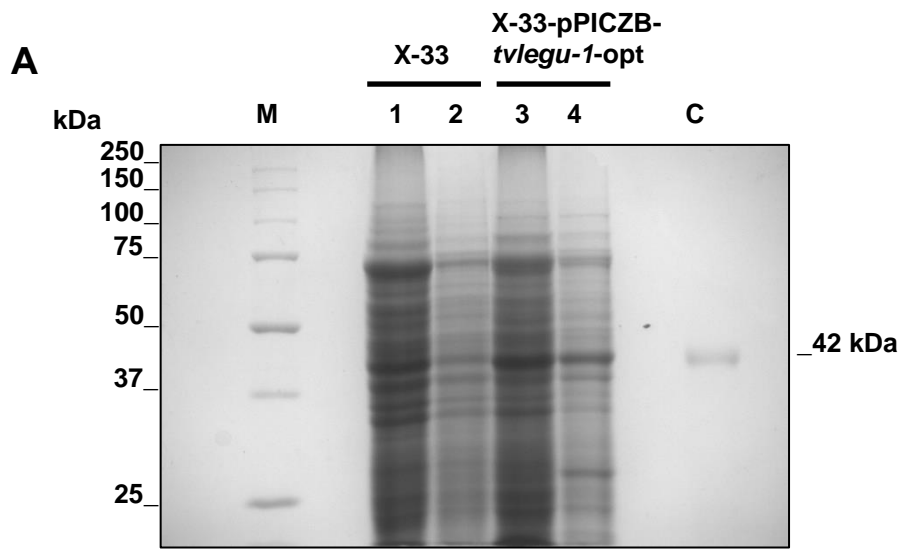
Una muestra de la fracción soluble y de la insoluble, resultantes del fraccionamiento de la biomasa de la clona *P. pastoris* X-33-pPICZB-*tvlegu-1-opt*, se analizaron en un gel de SDS-PAGE (**Figura 40A**) que posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Por un ensayo de WB con el anticuerpo monoclonal Anti-His (C-term)-HRP (Invitrogen) (**Figura 40B**) y con el anticuerpo monoclonal anti-TvLEGU-1 (**Figura 40C**) (obtenidos por el personal del laboratorio a cargo de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui) se observó el reconocimiento de un péptido de ~45 kDa únicamente en la fracción insoluble de la clona recombinante *P.pastoris* X-33-pPICZB-*tvlegu-1-opt* en comparación las muestras de la lisis (soluble e insoluble) de la cepa nativa de *P. pastoris* X-33.

Figura 40. Análisis de la expresión intracelular de la TvLEGU-1 en el sistema de *P. pastoris*

A) Análisis por SDS-PAGE en geles al 10% del perfil proteico de la fracción soluble (**carril 1**) e insoluble (**carril 2**) de la biomasa de la cepa nativa X-33 de *P. pastoris*; fracción soluble (**carril 3**) e insoluble (**carril 5**) de la biomasa de la cepa recombinante *P. pastoris* X-33- pPICZB-*tvlegu-1-opt*. Control, TvLEGU-1 expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión (**carril C**) (←, 45 kDa). Precision Plus Protein Estandar (**carril M**).

B) Análisis por WB utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-His (C-term)-HRP (Invitrogen) de un gel duplicado de (A) para la inmunodetección de la TvLEGU-1 expresada intracelularmente en *P. pastoris*

C) Análisis por WB utilizando el anticuerpo monoclonal anti-TvLEGU-1 de un duplicado de (A) para la inmunodetección de la TvLEGU-1 expresada intracelularmente en *P. pastoris* 1.



Diseño de Oligonucleótidos que codifican para distintos péptidos señal

Aunque la optimización de codones se ha evaluado como una estrategia para incrementar los rendimientos de producción de proteínas recombinantes en el sistema de expresión de *P. pastoris*, se ha demostrado que los bajos rendimientos también están asociados a la baja secreción de proteínas heterólogas en la levadura (Macauley-Patrick et al. 2005). La secreción es mediada usualmente por un péptido señal posicionado en el extremo N-terminal. Aunque existen diferentes secuencias señal, incluyendo la secuencia señal que pudiera estar presente en la proteína heteróloga, éstas pueden diferir ampliamente en su eficiencia para secretar proteínas recombinantes, por razones aun no entendidas, *P. pastoris* a menudo no puede secretar algunas proteínas incluso si poseen algún péptido señal, por lo que es necesario identificar de entre los múltiples péptidos señal disponibles la secuencia de secreción óptima para una proteína recombinante en específico (Liang et al. 2013; Lin-Cereghino et al. 2013). Se han utilizado muchos péptidos señal en el sistema de expresión de *P. pastoris*, incluyendo al péptido señal α -factor de *S. cerevisiae* (Brake et al. 1984; Kurjan and Herskowitz 1982), el péptido señal de la α -amilasa de *Rhizopus oryzae* (Li et al. 2011), los péptidos señal de las hidrofobinas HFBI y HFBI de *Trichoderma reesei* (Kottmeier et al. 2011), el péptido señal de la albumina humana de suero (Xiong et al. 2008), el péptido señal de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) (Raemaekers et al. 1999), el péptido señal de la pre-pro-toxina viral (Eiden-Plach et al. 2004), el péptido señal de la fosfatasa ácida (Yoshimasu et al. 2002) y recientemente el α -MAT resultado de una mutación del α -factor de *S. cerevisiae* (Lin-Cereghino et al. 2013), entre otros.

Con el objetivo de buscar las condiciones óptimas que permitan la expresión y secreción correcta de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis* en el sistema de *P. pastoris*, se utilizaron adicionalmente seis diferentes secuencias señal que se han reportado como secuencias para la secreción de proteínas heterólogas para la expresión en *P. pastoris* y en *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabla11**).

Para lograr este objetivo, se diseñaron oligonucleótidos complementarios que contienen la secuencia que codifica para los distintos péptidos señal, flanqueados en el extremo 5'→3' tanto por la secuencia consenso Kozak tomada del gen *AOX1*

(GAAACGATGNN) que permitió el reconocimiento del inicio de la traducción del gen *tvlegu-1-opt* en *P. pastoris* (Primer ATG), así como la secuencia del sitio de restricción *EcoR* I y en su extremo 3'→5' el sitio de restricción *Kpn* I (**Figura 16** y **Apéndice II**).

Los oligonucleótidos complementarios correspondientes para cada péptido señal se alinearon y se clonaron en el vector de expresión para levaduras pPICZB previamente digerido con *EcoR* I y *Kpn* I (**Apéndice X**). Actualmente se cuenta con una batería de vectores de expresión para el sistema *P. pastoris* para la expresión y secreción de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis* utilizando los distintos péptidos señal (**Tabla 12**). La presencia de la secuencia que codifica para los distintos péptidos señal se confirmó por secuenciación (**Apéndice III**).

Tabla 11. Secuencias señal comúnmente utilizadas para la expresión y secreción de las proteasas recombinantes en *P. pastoris*.

	Señal de secreción	Secuencia de amino ácidos	Tamaño (aa)
1	AA – Alfa-amilasa (<i>Aspergillus niger</i>)	MVAWWSLFLYGLQVAAPALA	20
2	GA – Glucoamilasa (<i>Aspergillus awamori</i>)	MSFRSLLALSGLVCSGLA	18
3	IN – Inulinasa (<i>Kluyveromyces maxianus</i>)	MKLAYSLLLPLAGVSA	16
4	IV – Invertasa (<i>S. cerevisiae</i>)	MLLQAFLFLLAGFAAKISA	19
5	KP – Proteína Killer (<i>S. cerevisiae</i>)	MTKPTQVLVRSVSILFFITLLHLVVA	26
6	LZ – Lisozima (<i>Gallus gallus</i>)	MLGKNDPMCLVLVLLGLTALLGICQG	26
7	SA – Albumina de suero (<i>Homo sapiens</i>)	MKWVTFISLLFLFSSAYS	18

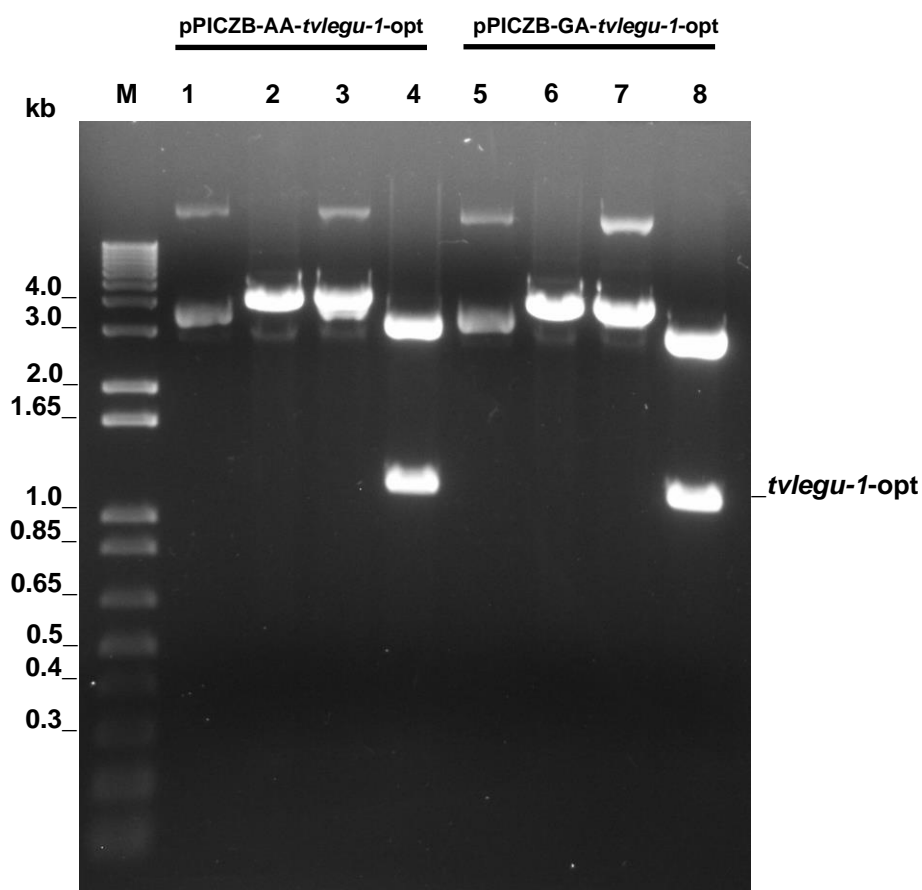
Tabla 12. Descripción breve de los vectores de expresión en *P. pastoris*, que contienen la secuencia que codifica para los distintos péptidos señal.

Vector	Secuencia Señal	Promotor	Sitios de clonación del gen de Interés
pPICZB-AA	SS- Alfa-amilasa (<i>Aspergillus niger</i>)	<i>AOX1</i>	<i>Kpn I-Not I</i>
pPICZB-GA	SS- Glucoamilasa (<i>Aspergillus awamori</i>)	<i>AOX1</i>	<i>Kpn I-Not I</i>
pPICZB-IN	SS- Inulinasa (<i>Kluyveromyces maxianus</i>)	<i>AOX1</i>	<i>Kpn I-Not I</i>
pPICZB-IV	SS- Invertasa (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>AOX1</i>	<i>Kpn I-Not I</i>
pPICZB-KP	SS- Proteína Killer (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>AOX1</i>	<i>Kpn I-Not I</i>
pPICZB-LZ	SS- Lisozima (<i>Gallus gallus</i>)	<i>AOX1</i>	<i>Kpn I-Not I</i>
pPICZB-SA	SS- Albumina de suero (<i>Homo sapiens</i>)	<i>AOX1</i>	<i>Kpn I-Not I</i>

Clonación del gen *tvlegu-1-opt* optimizado en los plásmidos de expresión que contienen una secuencia señal diferente para su expresión y secreción en *P. pastoris*

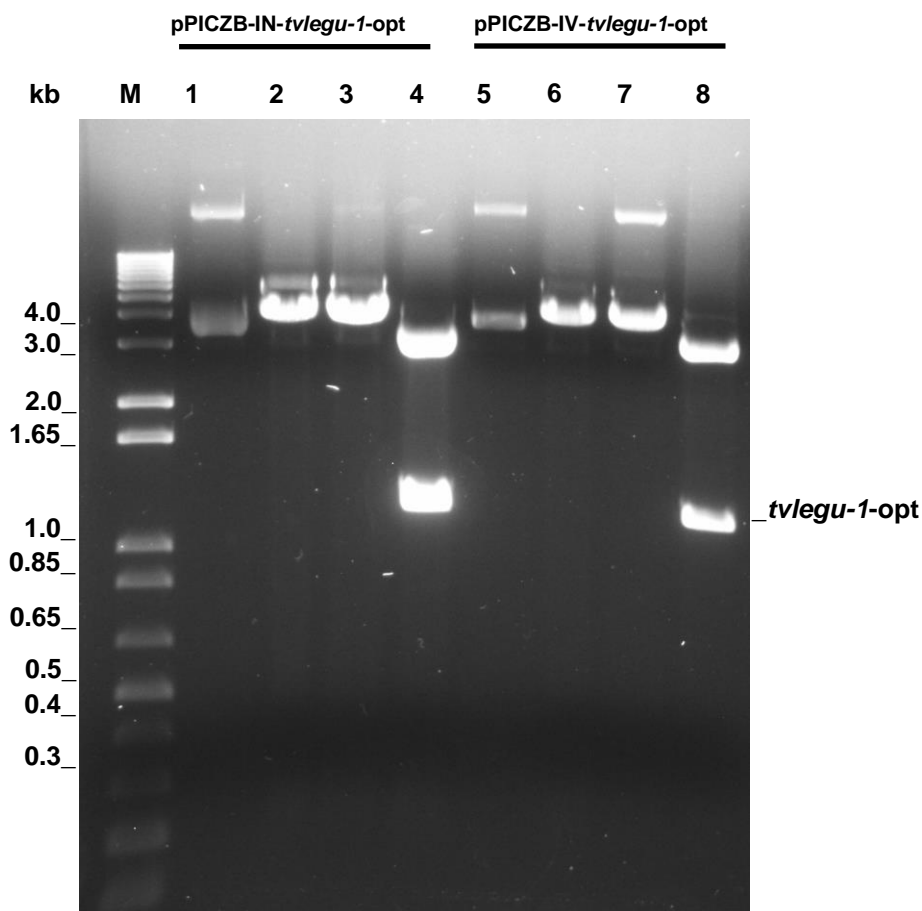
El DNA plasmídico (DNAp) de la construcción pUC57-*tvlegu-1-opt* se cortó con las enzimas *Kpn I* y *Not I* para liberar el fragmento del gen *tvlegu-1-opt*. El fragmento de 1181 pb del gen *tvlegu-1-opt* se purificó a partir de un gel de agarosa al 1% utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen y se clonó en cada uno de los plásmidos con diferente péptido señal para la expresión y secreción en *P. pastoris* (**Tabla 11**). La presencia del gen *tvlegu-1-opt* de 1181 pb se confirmó mediante la digestión del DNA plasmídico de las distintas construcciones utilizando las enzimas de restricción *Kpn I* – *Not I* (**Figuras 41** a la **43**).

Figura 41. Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* y pPICZB-GA-*tvlegu-1-opt* para confirmar la presencia del gen *tvlegu-1-opt*



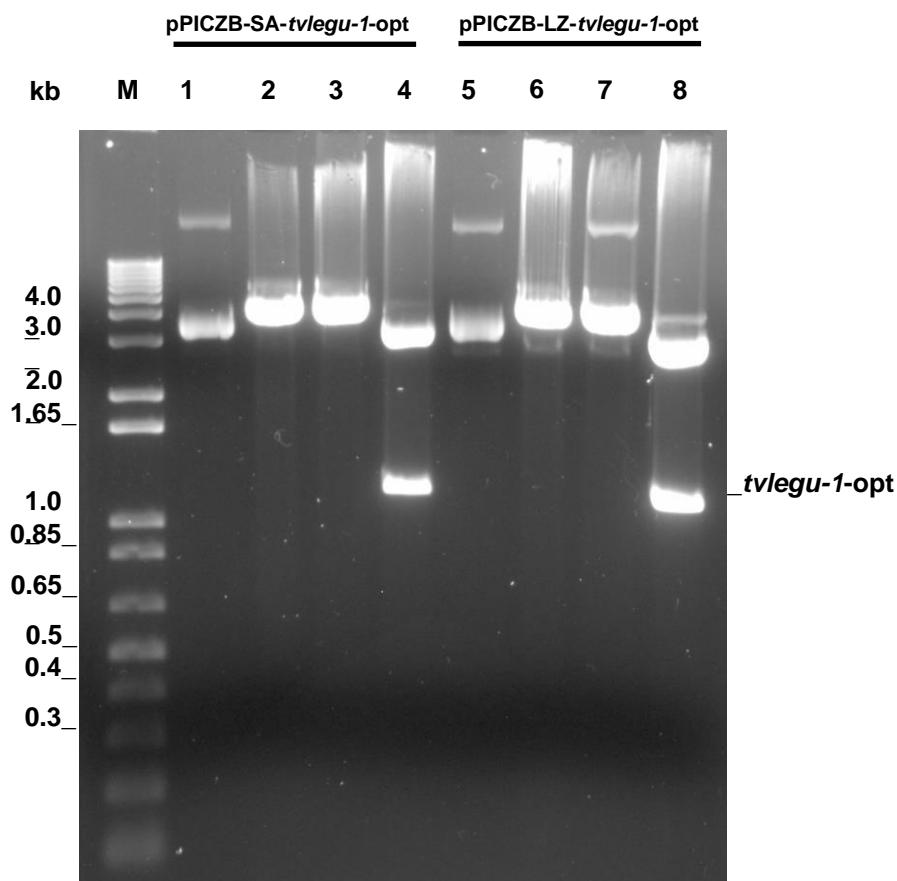
Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carriles 1-4**) y pPICZB-GA-*tvlegu-1-opt* (**carriles 5-8**) para confirmar la presencia del inserto del gen *tvlegu-1-opt*. DNA plasmídico de pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*: sin digerir en su forma enrollada (**carril 1**); digerido con la enzima *Kpn I* para linearizar (4524 pb) (**carril 2**); con la enzima *Not I* para linearizar (4524 pb) (**carril 3**); doble digestión para liberar el fragmento de 1181 pb del gen *tvlegu-1-opt* con las enzimas *Kpn I* – *Not I* (**carril 4**). DNA plasmídico de pPICZB-GA-*tvlegu-1-opt*: sin digerir en su forma enrollada (**carril 5**); digerido con la enzima *Kpn I* para linearizar (4524 pb) (**carril 6**); con la enzima *Not I* para linearizar (4524 pb) (**carril 7**); doble digestión para liberar el fragmento de 1181 pb del gen *tvlegu-1-opt* con las enzimas *Kpn I* – *Not I* (**carril 8**). Marcadores de peso molecular 1kb plus DNA ladder (**carril 1**).

Figura 42. Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-IN-*tvlegu-1-opt* y pPICZB-IV-*tvlegu-1-opt* para confirmar la presencia del gen *tvlegu-1-opt*



Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-IN-*tvlegu-1-opt* (**carriles 1-4**) y pPICZB-IV-*tvlegu-1-opt* (**carriles 5-8**) para confirmar la presencia del inserto del gen *tvlegu-1-opt*. DNA plasmídico de pPICZB-IN-*tvlegu-1-opt*: sin digerir en su forma enrollada (**carril 1**); digerido con la enzima *Kpn I* para linearizar (4524 pb) (**carril 2**); con la enzima *Not I* para linearizar (4524 pb) (**carril 3**); doble digestión para liberar el fragmento de 1181 pb del gen *tvlegu-1-opt* con las enzimas *Kpn I* – *Not I* (**carril 4**). DNA plasmídico de pPICZB-IV-*tvlegu-1-opt*: sin digerir en su forma enrollada (**carril 5**); digerido con la enzima *Kpn I* para linearizar (4524 pb) (**carril 6**); con la enzima *Not I* para linearizar (4524 pb) (**carril 7**); doble digestión para liberar el fragmento de 1181 pb del gen *tvlegu-1-opt* con las enzimas *Kpn I* – *Not I* (**carril 8**). Marcadores de peso molecular 1kb plus DNA ladder (**carril 1**).

Figura 43. Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-SA-*tvlegu-1-opt* y pPICZB-LZ-*tvlegu-1-opt* para confirmar la presencia del gen *tvlegu-1-opt*



Análisis de restricción de las construcciones pPICZB-SA-*tvlegu-1-opt* (**carriles 1-4**) y pPICZB-LZ-*tvlegu-1-opt* (**carriles 5-8**) para confirmar la presencia del inserto del gen *tvlegu-1-opt*. DNA plasmídico de pPICZB-SA-*tvlegu-1-opt*: sin digerir en su forma enrollada (**carril 1**); digerido con la enzima *Kpn I* para linearizar (4524 pb) (**carril 2**); con la enzima *Not I* para linearizar (4524 pb) (**carril 3**); doble digestión para liberar el fragmento de 1181 pb del gen *tvlegu-1-opt* con las enzimas *Kpn I* – *Not I* (**carril 4**). DNA plasmídico de pPICZB-LZ-*tvlegu-1-opt*: sin digerir en su forma enrollada (**carril 5**); digerido con la enzima *Kpn I* para linearizar (4524 pb) (**carril 6**); con la enzima *Not I* para linearizar (4524 pb) (**carril 7**); doble digestión para liberar el fragmento de 1181 pb del gen *tvlegu-1-opt* con las enzimas *Kpn I* – *Not I* (**carril 8**). Marcadores de peso molecular 1kb plus DNA ladder (**carril 1**).

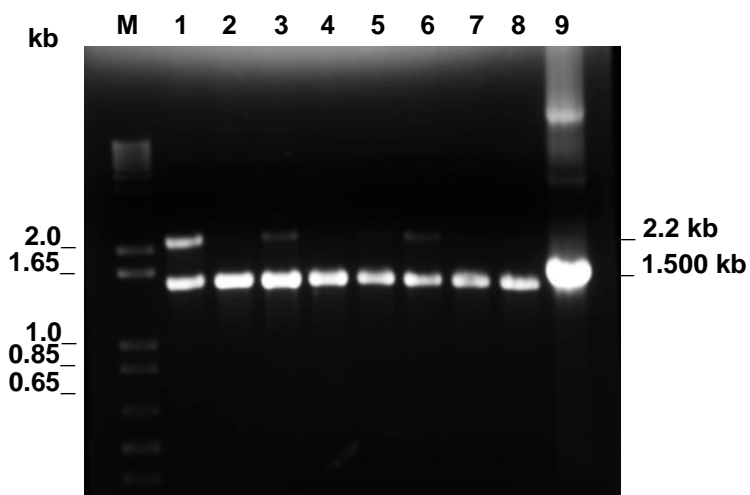
Transformación de la cepa X-33 de *P. pastoris* con las construcciones pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*, pPICZB-GA-*tvlegu-1-opt*, pPICZB-IN-*tvlegu-1-opt*, pPICZB-IV-*tvlegu-1-opt*, pPICZB-KP-*tvlegu-1-opt*, pPICZB-LZ-*tvlegu-1-opt* y pPICZB-SA-*tvlegu-1-opt*.

Las construcciones que contienen el gen *tvlegu-1-opt* en fase con las distintas secuencias señal para la expresión y secreción de la TvLEGU-1 de *T. vaginalis* se linearizaron con la enzima *Sac I* para transformar esferoplastos de la cepa X-33 de *P. pastoris* y por medio de eventos de recombinación homóloga con la región 5'AOX del genoma de la levadura se llevó a cabo la integración de estos cassettes de expresión. La integración del cassette de expresión confirió a las clonas transformantes resistencia a zeocina, que permitió seleccionar aquellas clonas resistentes al antibiótico; Las cuales muestran una estabilizada extrema, aún en ausencia de la presión selectiva.

Verificación de la integración de los distintos cassettes de expresión al DNA genómico de la levadura por ensayos de PCR

Para confirmar la presencia de los distintos cassettes de expresión en las transformantes de *P. pastoris*, a algunas de las transformantes resistentes a zeocina se les realizó un análisis de PCR utilizando los iniciadores 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). El análisis de PCR de algunas de las clonas mostró dos fragmentos de aproximadamente de 2200 y 1500 pb, que corresponden al gen *AOX1* del genoma de la levadura y al cassette de expresión que contiene el gen *tvlegu-1-opt*, respectivamente (**Figura 44**). Como control positivo se muestra el fragmento de PCR obtenido al utilizar el DNA plasmídico de la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*. Junto con la resistencia a zeocina de las transformantes, la presencia de estas bandas indica la integración exitosa de los distintos cassettes de expresión al genoma de la levadura *P. pastoris*.

Figura 44. Análisis de PCR de *P. pastoris* X-33 transformada con los distintos cassettes de expresión



Análisis de PCR de la amplificación con DNA de las clonas transformantes con el cassette de expresión que contiene el gen *tvlegu-1-opt*. Clona C1-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-*tvlegu-1* (**carril 1**), Clona C1-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril 2**), Clona C2-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-GA-*tvlegu-1-opt* (**carril 3**), Clona C4-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IN-*tvlegu-1-opt* (**carril 4**), Clona C3-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1-opt* (**carril 5**), Clona C3-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1-opt* (**carril 6**), Clona C3-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1-opt* (**carril 7**), Clona C5-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IV-*tvlegu-1-opt* (**carril 8**). 9) Control positivo PCR utilizando DNA plasmídico de la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* como DNA molde (**carril 9**). Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (**carril M**). Amplicones de ~2.2 y ~1.5 kb, que corresponden al gen *AOX1* del genoma de la levadura y

Ensayos de inducción de la expresión de la TvLEGU-1 a pequeña escala con las clonas de *P. pastoris* X-33 transformadas con los distintos cassettes de expresión

Con el fin de inducir la expresión de la TvLEGU-1, se seleccionaron al menos 5 clonas de las transformantes que contienen cada uno de los seis diferentes cassettes de expresión y se crecieron en cajas de YPD-agar. Una colonia de cada una de las transformantes sirvió para inocular 10 mL de medio BMGY en tubos cónicos de 50 mL. Se incubó a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una D.O. 600nm de 4. Posteriormente, se obtuvo el paquete celular, se resuspendió con 10 mL de medio BMMH a una D.O. 600_{nm} de 1 en tubos cónicos de 50 mL. La inducción se realizó con la adición de metanol al 0.5% cada 24 h incubando a 30 °C y 250 rpm. Después de 48 h de inducción se separó el sobrenadante del paquete celular. Con muestras del sobrenadante se efectuaron los análisis SDS-PAGE y ensayo de “Dot-blot”.

Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en sobrenadantes por un ensayo de “Dot-blot”

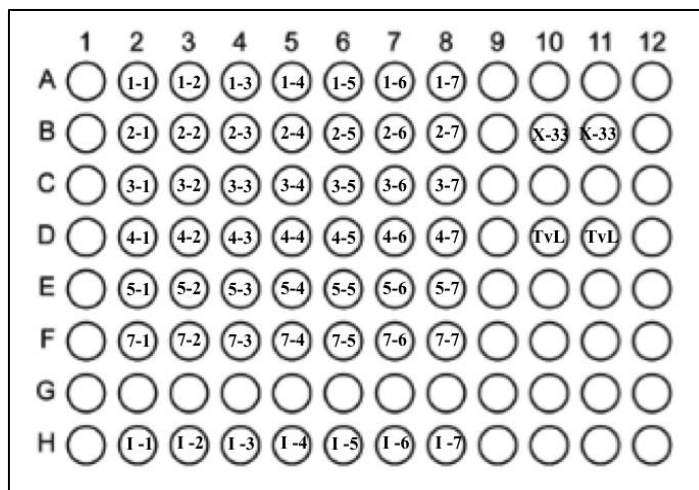
Para observar la presencia de la TvLEGU-1 en los sobrenadantes de los cultivos previamente inducidos con metanol, se realizó un ensayo de “Dot-blot” usando 100 µL del sobrenadante adsorbidos a una membrana de nitrocelulosa usando un aparato de microfiltración de 96 pozos (Bio-Dot, Bio-Rad). El ensayo de “Dot-blot” reveló la presencia de proteínas que contienen la etiqueta de seis histidinas al ser reconocidas por el anticuerpo monoclonal anti-His. Además, se observó que aparentemente los niveles de expresión de estas proteínas variaron considerablemente entre las transformantes que contienen los seis diferentes cassettes de expresión (**Figuras 45A y 45B**).

Figura 45. Ensayo Dot-blot utilizando los sobrenadantes de los cultivos inducidos con metanol

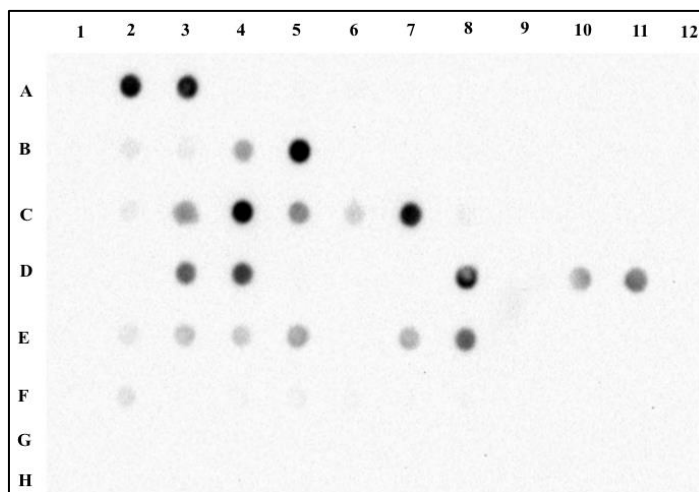
A) Nomenclatura de los pozos con respecto al sobrenadante del cultivo de cada clona analizada. **Fila A:** C1-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-tvlegu-1 (1-1), C1-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-tvlegu-1 (1-2), C1-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-tvlegu-1 (1-3), C1-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-tvlegu-1 (1-4), C1-5 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-tvlegu-1 (1-5). **Fila B:** C2-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-GA-tvlegu-1 (2-1), C2-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-GA-tvlegu-1 (2-2), C2-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-GA-tvlegu-1 (2-3), C2-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-GA-tvlegu-1 (2-4), C2-5 *P. pastoris* X-33-pPICZ-GA-tvlegu-1 (2-5). **Fila C:** C3-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-tvlegu-1 (3-1), C3-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-tvlegu-1 (3-2), C3-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-tvlegu-1 (3-3), C3-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-tvlegu-1 (3-4), C3-5 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-tvlegu-1 (3-5). **Fila D:** C4-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IN-tvlegu-1 (4-1), C4-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IN-tvlegu-1 (4-2), C4-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IN-tvlegu-1 (4-3), C4-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IN-tvlegu-1 (4-4), C4-5 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IN-tvlegu-1 (4-5). **Fila E:** C5-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IV-tvlegu-1 (5-1), C5-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IV-tvlegu-1 (5-2), C5-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IV-tvlegu-1 (5-3), C5-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IV-tvlegu-1 (5-4), C5-5 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IV-tvlegu-1 (5-5). **Fila F:** C7-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-LZ-tvlegu-1 (7-1), C7-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-LZ-tvlegu-1 (7-2), C7-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-LZ-tvlegu-1 (7-3), C7-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-LZ-tvlegu-1 (7-4), C7-5 *P. pastoris* X-33-pPICZ-LZ-tvlegu-1 (7-5). **Fila H:** Ci-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-tvlegu-1 (I-1), Ci-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-tvlegu-1 (I-2), Ci-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-tvlegu-1 (I-3), Ci-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-tvlegu-1 (I-4), Ci-5 *P. pastoris* X-33-pPICZ-tvlegu-1 (I-5). Sobrenadantes de *P. pastoris* X-33 como control negativo (**B:10, B:11**). Proteína TvLEGU-1 solubilizada de cuerpos de inclusión como control positivo (**D:10, D:11**).

B) Reconocimiento de presencia de proteínas que contienen la etiqueta de seis histidinas al ser reconocidas en el ensayo tipo Western-blot utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-His (C-term)-HRP (Invitrogen).

A



B



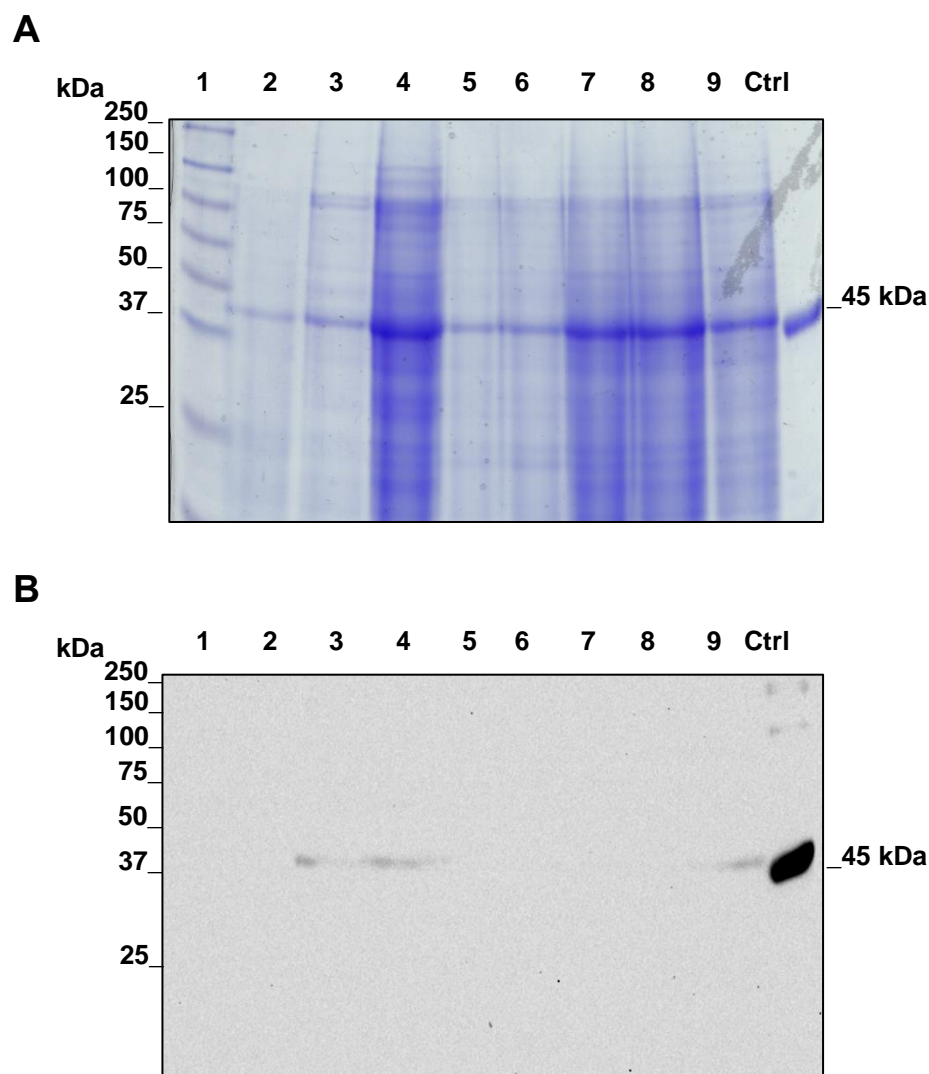
Evaluación de la expresión de la TvLEGU-1 en sobrenadantes por electroforesis (SDS-PAGE) y WB

Aunque en algunos de los sobrenadantes analizados por “Dot-blot” con el anticuerpo anti-His mostró el reconocimiento de proteínas que contenían la etiqueta de histidinas, era necesario observar la presencia e integridad de la TvLEGU-1 en los sobrenadantes de los cultivos inducidos con metanol. Además, permitiría comparar el nivel de producción entre las distintas transformantes. Por lo que se analizaron las proteínas totales de los sobrenadantes de algunas clonas recombinantes comparando con el sobrenadante de la cepa silvestre X-33 de *P. pastoris* mediante SDS-PAGE al 10% y WB con el anticuerpo anti-His.

Al comparar el patrón protéico de los distintos sobrenadantes teñido con Coomassie con el sobrenadante de la cepa nativa X-33, en algunas de las muestras se observó la presencia de un péptido de aproximadamente 45 kDa que podría corresponder a la TvLEGU-1 expresada en *P. pastoris* (**Figura 46A**), sobrenadantes de las clonas C1-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-*tvlegu-1*-opt, C3-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1*-opt, C3-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1*-opt y C3-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1*-opt. Mediante un WB se observó que únicamente en los sobrenadantes de las clonas C1-1, C1-2 y C3-3 mostraron reconocimiento de un péptido del tamaño esperado (45 kDa), tamaño similar al de la TvLEGU-1 expresada en *E. coli* y purificada a partir de cuerpos de inclusión (**Figura 46B**).

Aunque en algunos de los sobrenadantes se confirmó la presencia de péptidos del tamaño esperado (45 kDa) que contenían la etiqueta de histidinas; adicionalmente, en el gel se observó una gran cantidad de péptidos, que posiblemente sugieren un proceso de lisis de la levadura en su intento por expresar y secretar a la TvLEGU-1. Aunado a estos péptidos, se observó la presencia de sustancias semejantes a lípidos resultantes de la lisis celular; la presencia de estos lípidos impidió la purificación de la TvLEGU-1 por afinidad a níquel, ya que como se ha reportado, la presencia de estos causa problemas durante los procesos de purificación de proteínas recombinantes, además de estimular la agregación de las proteínas recombinantes, evitando así que se una a la resina de afinidad a níquel (Brady et al. 2001; Hellwig et al. 1999).

Figura 46. Perfil protéico y WB de los sobrenadantes de las clonas con diferentes péptidos señal



A) SDS-PAGE al 10% de muestras de sobrenadantes. **B)** Ensayo de “Western blot” utilizando el anticuerpo Anti-His (C-term)-HRP. Marcadores de tamaño molecular (**carril M**), muestra de sobrenadantes de *P. pastoris* X-33 como control negativo (**carril 1**); de la clona C1-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril 2**); de la clona C1-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril 3**); de la clona C2-4 *P. pastoris* X-33-pPICZ-GA-*tvlegu-1-opt* (**carril 4**); de la clona C4-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-IN-*tvlegu-1-opt* (**carril 5**); de la clona C3-1 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1-opt* (**carril 6**); de la clona C3-2 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1-opt* (**carril 7**); de la clona C3-3 *P. pastoris* X-33-pPICZ-SA-*tvlegu-1-opt* (**carril 8**); Proteína TvLEGU-1 solubilizada de cuerpos de inclusión de *E. coli* como control positivo (**Ctrl**).

Dado que las condiciones de los cultivos a pequeña escala en tubos cónicos de 50 mL pudieron no haber sido las óptimas, causando estrés y/o lisis celular, se escaló la inducción de la expresión a un volumen de 100 mL en matraces Erlenmeyer bafleados para intentar mejorar la expresión y permitir reproducibilidad de las condiciones de expresión que permitieran de una manera clara identificar la TvLEGU-1 en los sobrenadantes mediante electroforesis (SDS-PAGE) y WB. Pero debido a la dificultad de comparar todas las clonas recombinantes obtenidas, a partir de esta etapa se trabajó con las clonas transformadas con la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (clonas *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*), con el péptido señal de la α -amilasa de *Aspergillus niger*; un péptido pequeño (20 aminoácidos) que se ha reportado su uso de manera exitosa en la expresión y secreción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* (Paifer et al. 1994).

Análisis de PCR, evaluación de la resistencia a Zeocina y determinación del número de copias del gen *tvlegu-1-opt* de las clonas transformantes de *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZ-AA-*tvlegu-1-opt*.

Cinco clonas de la cepa recombinante de *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1* (C1, C2, C3, C4 y C5) que presentaron resistencia a Zeocina se seleccionaron para realizar los siguientes análisis:

- **Análisis de PCR**

Con el objetivo de confirmar la presencia del cassette de expresión de la TvLEGU-1 en las clonas seleccionadas (*P. pastoris* X-33-pPICZ-AA-*tvlegu-1-opt*) se les realizó un análisis de PCR utilizando los iniciadores 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3').

El análisis de los amplicones de las cinco clonas mostró dos fragmentos de ~2107 y ~1520 pb que corresponden al gen *AOX1* del genoma de la levadura y al cassette de expresión que contiene el gen *tvlegu-1-opt*, respectivamente (**Figura 47A**). Como control positivo se muestra el fragmento de PCR obtenido al utilizar el DNA plasmídico de la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*. Estos resultados indican que las clonas seleccionadas (C1, C2, C3, C4 y C5) contiene el cassette de expresión pPICZ-AA-*tvlegu-1*.

- **Evaluación de la resistencia a Zeocina**

Como el vector pPICZB confiere resistencia a Zeocina a las clonas transformantes, se determinó el nivel de resistencia a este antibiótico de las cinco clonas seleccionadas (C1, C2, C3, C4 y C5). Para llevar a cabo el ensayo, una colonia de cada clona se creció por estría en placas de YPD-agar que contenían diferentes concentraciones de Zeocina (100, 250, 500, y 1000 $\mu\text{g/mL}$). Las colonias de las clonas C1 y C4 presentaron resistencia hasta 250 $\mu\text{g/mL}$ de Zeocina. En contraste, colonias de las clonas C2, C3 y C5 presentaron resistencia hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Zeocina (**Figura 47B**). Se esperaba que las clonas que presentaran la mayor resistencia a Zeocina fueran aquellas que contengan múltiples copias de gen *tvlegu-1-opt*.

- **PCR digital de gota (ddPCR, droplet digital PCR)**

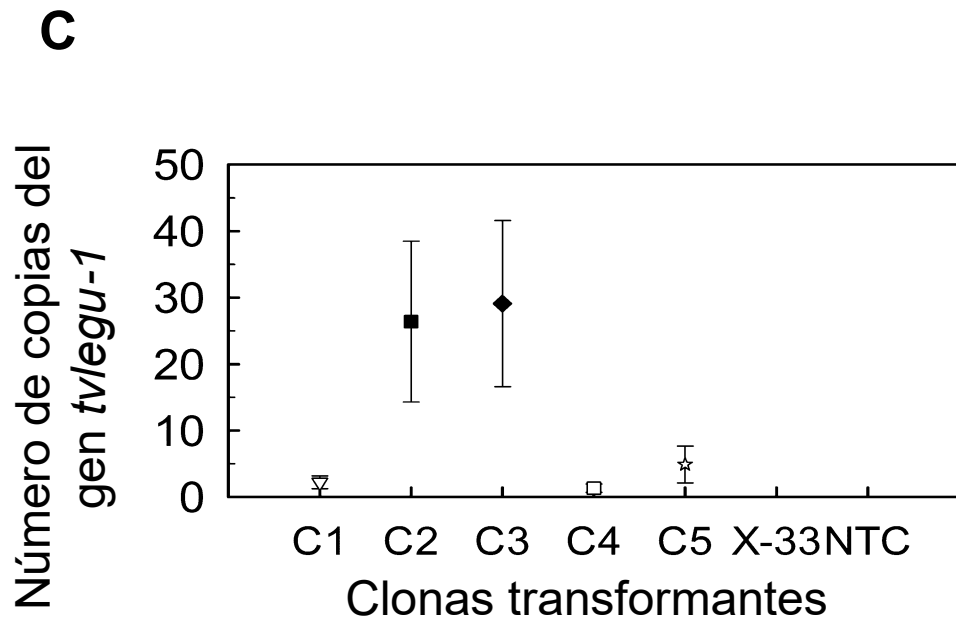
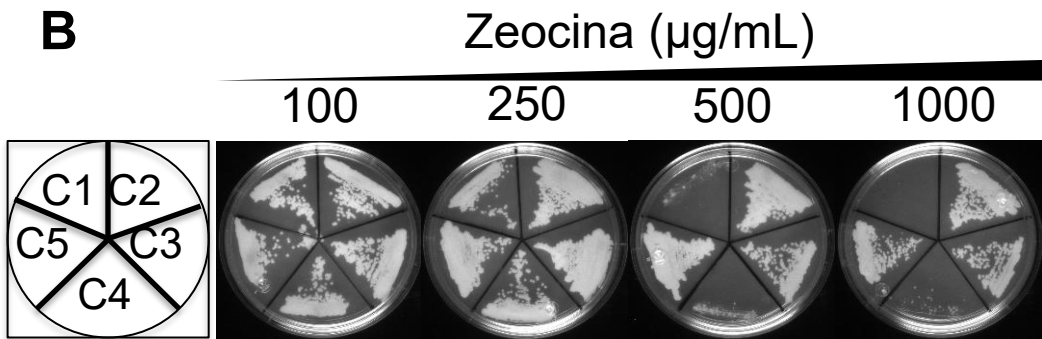
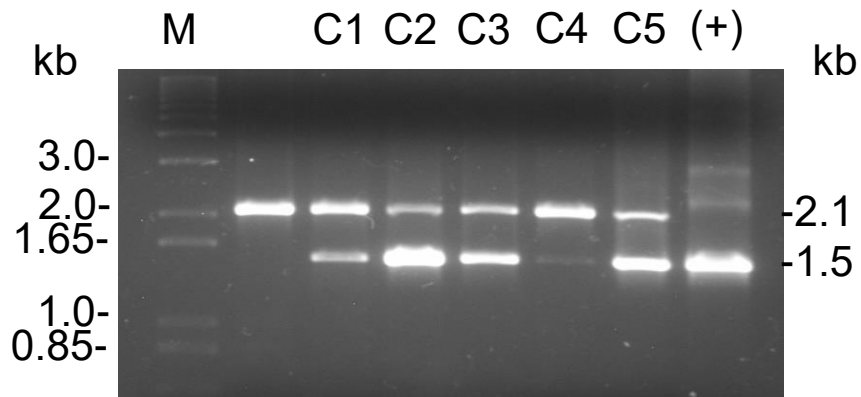
Mediante el ensayo de PCR convencional y la evaluación de resistencia a Zeocina no fue posible establecer el número de copias del gen *tvlegu-1* contenidas en las cinco clonas recombinantes. Por lo tanto, para determinar el número de copias del gen *tvlegu-1*, las cinco clonas positivas (C1, C2, C3, C4 y C5) se analizaron por ddPCR. Los datos de ddPCR mostraron que el incremento en el número de integraciones del cassette de expresión pPIZB-AA-*tvlegu-1-opt* en las clonas recombinantes está asociado con el incremento de la resistencia a la Zeocina (**Figura 47C**). Las clonas que crecieron en 250 $\mu\text{g/mL}$ de Zeocina contienen 1 y 2 copias del cassette de expresión insertadas en su DNA genómico (Clonas C4 y C1, respectivamente), mientras que las clonas que presentaron resistencia a la mayor concentración de antibiótico (1000 $\mu\text{g/mL}$ de Zeocina) contienen 5, 26 y 29 copias del cassette de expresión (clonas C5, C2 y C3, respectivamente).

Figura 47. Análisis de PCR, resistencia a Zeocina y determinación del número de copias de las clonas seleccionadas de *P. pastoris* X-33 transformadas con la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*

A) Análisis de los amplicones de las clonas C1, C2, C3, C4, y C5 de *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* utilizando los oligonucleótidos 5'-AOX1 y 3'-AOX1. Marcadores de tamaño molecular 1kb plus DNA ladder (**carril M**), Productos de PCR de: Cepa X-33 de *P. pastoris* (2.2 kb, control negativo) (**carril 1**), clonas transformantes de *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril C1- carril C5**), DNA plasmidico de la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (control positivo) (**carril +**).

B) Determinación del nivel de resistencia a Zeocina de las cinco clonas seleccionas *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**clona C1- clona C5**).

C) Número de copias del gen *tvlegu-1-opt* de las cinco clonas seleccionadas *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**clona C1- clona C5**), X-33: cepa nativa X-33 de *P. pastoris* usada como control negativo, NTC (No templete control, por sus siglas en inglés): usado como control negativo.



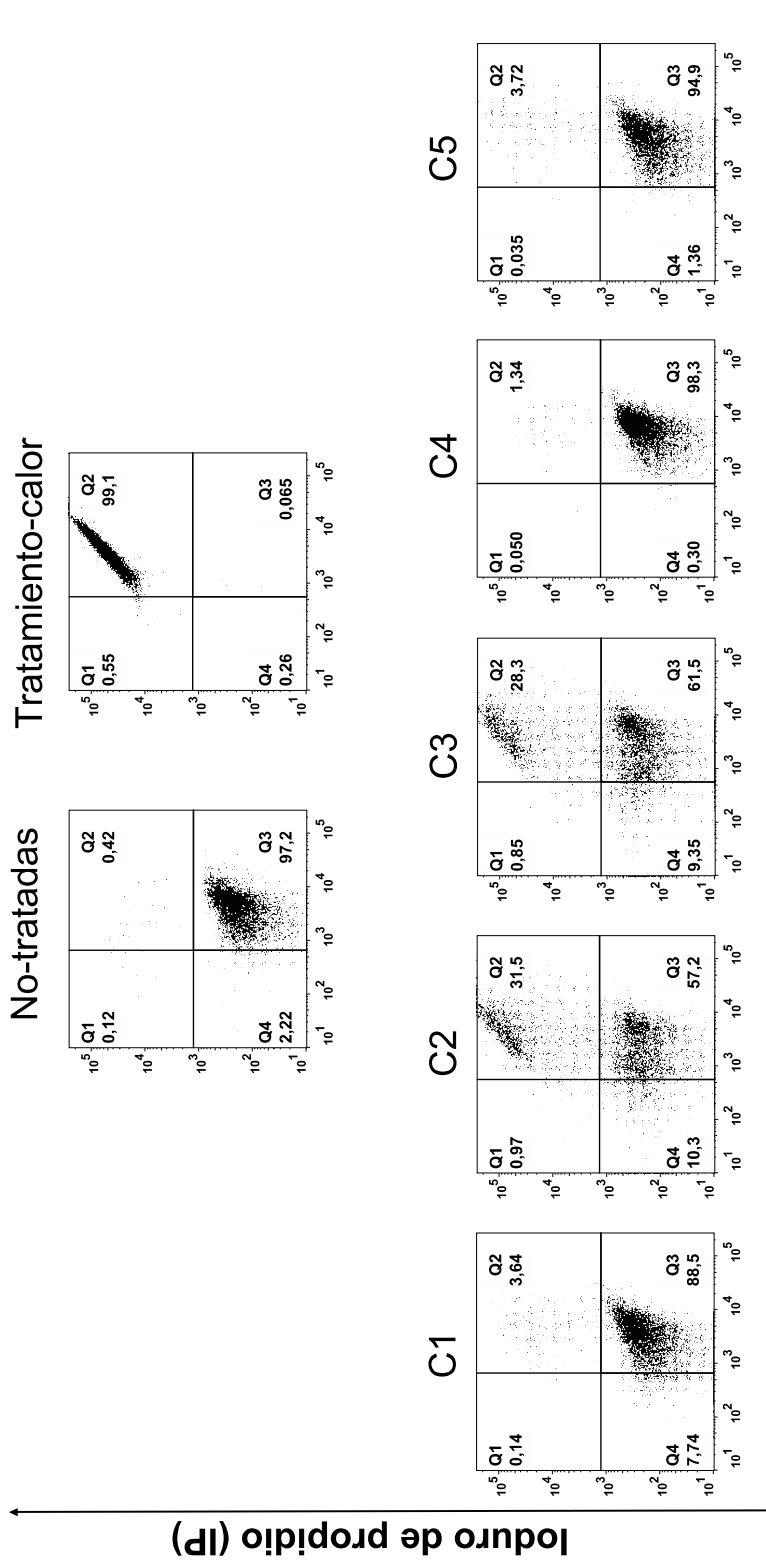
Evaluación de la viabilidad de *P. pastoris*

Se sabe que las células de los cultivos de *P. pastoris* están expuestas a muerte celular durante la adaptación al metanol como fuente de carbono, así como en la etapa de inducción de la expresión de la proteína recombinante (Hohenblum et al. 2003; Jahic et al. 2003). Por lo tanto, se evaluó la viabilidad y se determinó la fracción de células que morían en los cultivos de las transformantes de *P. pastoris* durante la etapa de inducción con metanol usando el kit LIVE/DEAD Yeast Viability. El método fue validado usando muestras de células del cultivo de la cepa nativa X-33 de *P. pastoris* después de las primeras 24 horas de inducción con metanol a 30 °C, con y sin tratamiento a 75 °C, como controles positivo y negativo para lisis celular, respectivamente (**Figura 48**). Mediante este ensayo se demostró, tal y como se esperaba, que en las células muertas ocurre un desplazamiento del fluoróforo SYTO-9 por parte del ioduro de propidio (IP), mientras que el SYTO-9 tiñó a las células viables (**Figura 48**).

Figura 48. Análisis de citometría de flujo para evaluar la viabilidad de las transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* teñidas con ioduro de propidio (IP)

Se tomaron muestras después de las primeras 24 h de inducción con metanol (0.5% v/v) a 30 °C y se tiñeron con ioduro de propidio (IP, rojo) y SYTO-9 (verde). Se muestra las gráficas de puntos de los patrones de tinción de una suspensión de levaduras teñidas con ioduro de propidio (**PI, eje vertical**) y SYTO-9 (**eje horizontal**). **Q1:** levaduras no viables con membranas comprometidas, **Q2:** levaduras no viables con membranas intactas, **Q3:** levaduras viables con membranas intactas y **Q4:** levaduras viables con membranas comprometidas. Levaduras de un cultivo de *P. pastoris* X-33, sin ningún tratamiento (**No-tratadas**) y tratadas con calor (75 °C) (**Tratadas-calor**), se utilizaron para identificar las regiones que permitieran identificar las células viables de las no viables. Muestras de los cultivos de las clonas C1, C2, C3, C4, y C5 de las transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* después de las primeras 24 h de inducción con metanol a 30°C, se tiñeron con ioduro de propidio (PI) y SYTO-9 para los ensayos de viabilidad por citometría de flujo.

P. pastoris X-33



Cinéticas de crecimiento a 30° C de las clonas recombinantes de *P. pastoris* X-33 que contienen el cassette de expresión pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*

El perfil de crecimiento de las cinco clonas recombinantes de *P. pastoris* (C1, C2, C3, C4, y C5) que contienen 2, 26, 29, 1, y 5 copias del cassette de expresión para la TvLEGU-1, respectivamente, se analizó en comparación con la cepa nativa X-33 (control negativo) (**Figura 47C**). Durante el crecimiento en presencia de glicerol como fuente de carbono (etapa de producción de biomasa), todas las clonas mostraron la misma tasa de crecimiento en comparación con la cepa nativa X-33 (datos no mostrados). Sin embargo, bajo condiciones de inducción con metanol a 30 °C, las clonas con mayor número de copias (clonas C2 y C3) mostraron una clara inhibición de su crecimiento desde las primeras 24 h hasta el final de la inducción; mientras que las clonas con menor número de copias (clonas C1, C4, y C5) mostraron un crecimiento similar a presentado por la cepa control X-33 (**Figura 49A**). Es interesante notar que el efecto de la inhibición del crecimiento está relacionado con el contenido del número de copias del cassette de expresión. De hecho, la inhibición del crecimiento fue más pronunciada para las clonas C2 (26 copias) y C3 (29 copias), sugiriendo esto que la expresión de la TvLEGU-1 recombinante tiene un efecto negativo en aquellas clonas con múltiples copias del cassette de expresión.

Efecto de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en la viabilidad de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1* bajo condiciones de crecimiento estándar (30° C)

Mediante la comparación de las diferencias entre los porcentajes de las células teñidas con yoduro de propidio (IP) para las diferentes clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* analizadas por ensayos de citometría de flujo (**Figura 49B**), fue posible identificar el efecto de la TvLEGU-1 recombinante sobre la viabilidad celular durante la inducción con metanol a 30° C. La expresión de la TvLEGU-1 recombinante en las clonas con el mayor número de copias (clonas C2 y C3) tiene un gran impacto sobre la viabilidad celular, detectada con la tinción con yoduro de propidio (**Figura 49B**), resultando

en los menores rendimientos de biomasa (**Figura 49A**). La mayor muerte celular de ambos cultivos fue a las 24 h después de iniciar la inducción con metanol y se estabilizó o disminuyó, permaneciendo por encima del 20% a lo largo de la inducción (**Figura 49B**). Las otras clonas (clonas C1, C4, y C5) no experimentaron una muerte celular significativa (**Figura 49B**).

Adicionalmente, mediante el análisis del tamaño (FSC, “forward-scattered light”, por sus siglas en inglés) vs granularidad (SSC, “side-scattered light”, por sus siglas en inglés) de las células analizadas por citometría de flujo, fue posible excluir los detritos celulares e incluir las poblaciones de células con un tamaño similar para los cultivos de las clonas *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1*-opt analizadas.

Interesantemente, se observó que las células de las clonas con el mayor número de copias (clonas C2 y C3) resultaron en cambios de la morfología celular a las 24 h de iniciar la inducción con metanol de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante. Estos cambios incluyen una reducción del tamaño (FSC) y un incremento en la granularidad (SSC) en comparación con el control X-33 (**Figura 50**). Aunque se sabe que las poblaciones de levaduras comprenden un amplio rango de tamaños, particularmente durante la alimentación con metanol (Hohenblum et al. 2003), es claro que el incremento en la muerte celular de las clonas C2 y C3 también resultó en una correspondiente baja viabilidad celular (**Figura 49B**) y una mayor lisis celular (**Figura 50**) en comparación con la cepa nativa X-33 de *P. pastoris*.

Figura 49. Crecimiento y viabilidad de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* inducidas a 30 °C

A) Cinéticas de crecimiento de las diferentes transformantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* después de la inducción con metanol a 30 °C. Para facilitar el análisis comparativo, la inducción con metanol se inició con una D.O.600 nm de 1 para todas las clonas analizadas. Se adicionó metanol cada 24 h a una concentración final del 0.5%.

B) Cinética de viabilidad de los cultivos de las diferentes transformantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-IV-*tvlegu-1-opt* después de la inducción con metanol a 30 °C. Para determinar la viabilidad celular, se tomaron muestras de los cultivos inducidos con metanol a 30 °C, se tiñeron con yoduro de propio (IP) y SYTO-9 y se analizaron por citometría de flujo. *P. pastoris* X-33 (**circulo blanco**), clona C1 (**triangulo blanco**), clona C2 (**cuadrado negro**), clona C3 (**rombo negro**), clona C4 (**cuadrado blanco**), y clona C5 (**estrella blanca**).

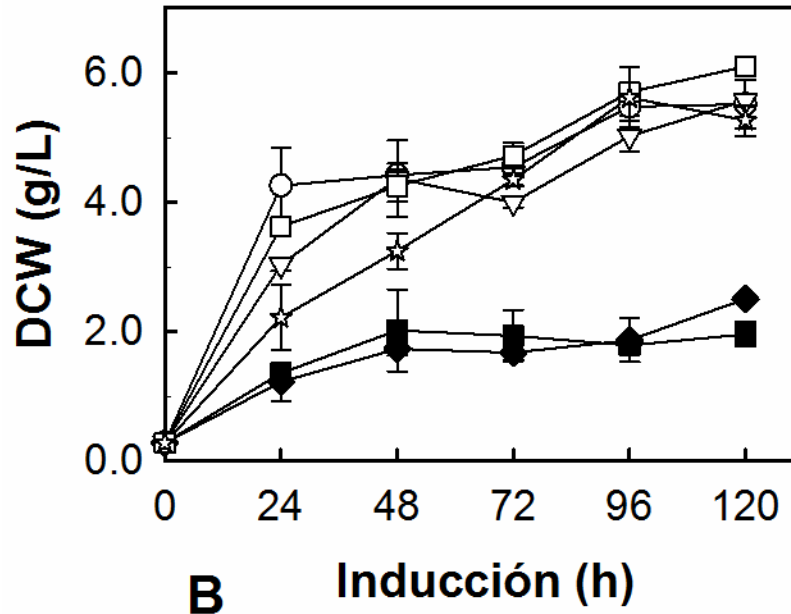
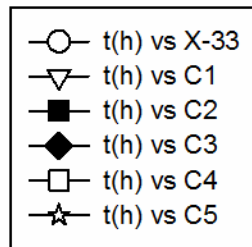
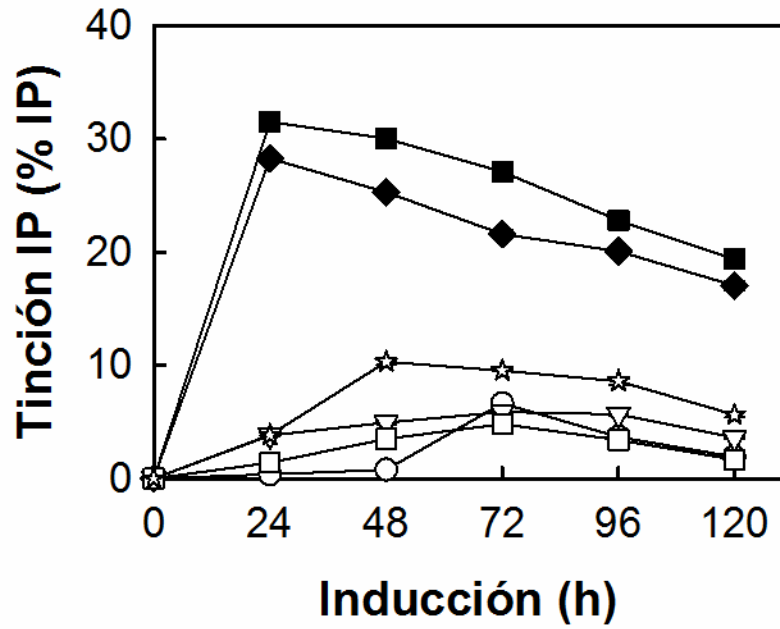
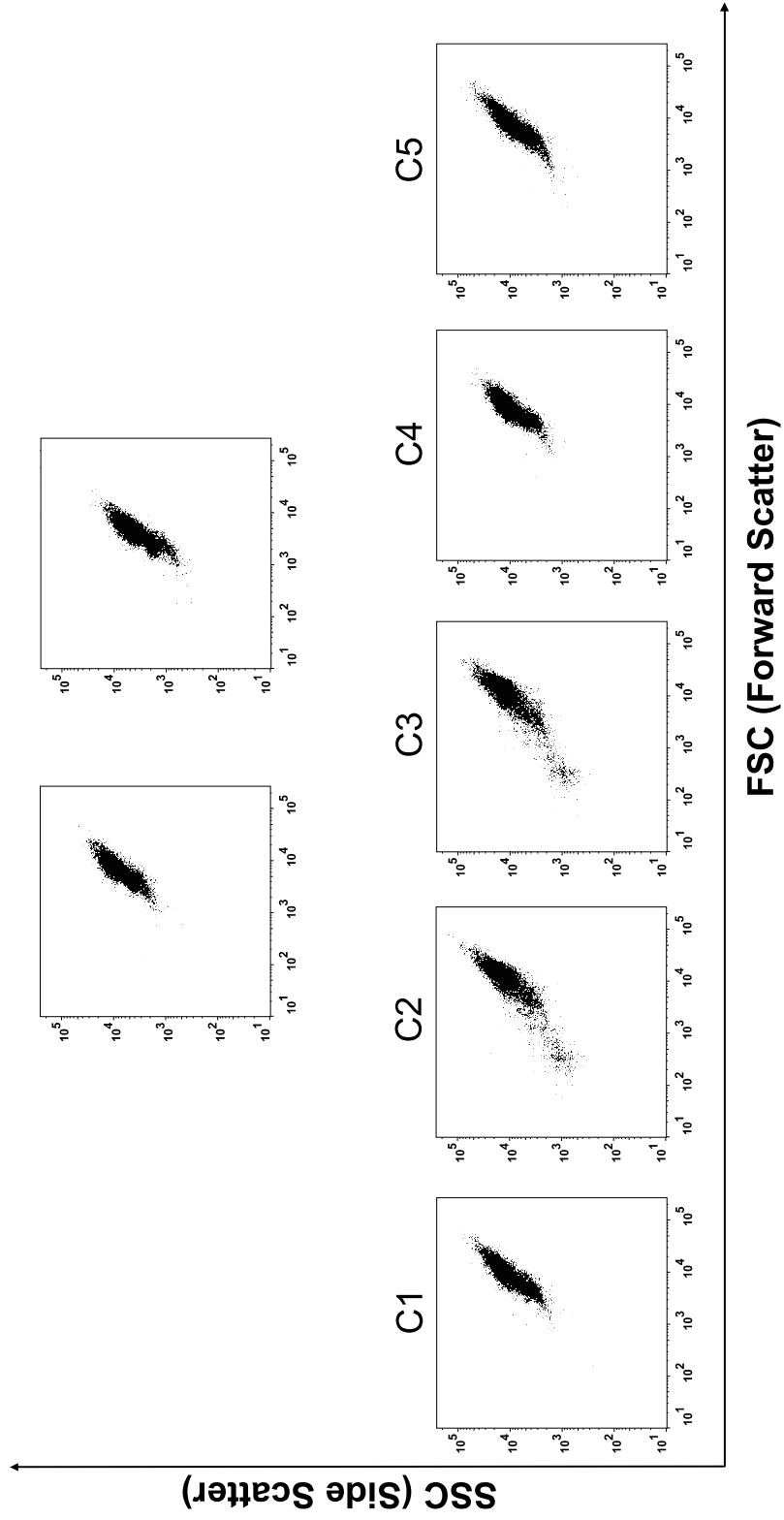
A**B**

Figura 50. Propiedades de dispersión de luz (Light scattering) de las células de los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* inducidas a 30 °C

Se muestra la gráfica de puntos del tamaño (FSC, “forward-scattered light”, por sus siglas en inglés) vs granularidad (SSC, “side-scattered light”, por sus siglas en inglés) de las células analizadas por citometría de flujo. Muestras de los cultivos de las clonas C1, C2, C3, C4, y C5 de las transformantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* después de las primeras 24 h de inducción con metanol a 30°C, se tiñeron con yoduro de propidio (IP) y SYTO-9 para los ensayos de viabilidad por citometría de flujo. Levaduras de un cultivo de *P. pastoris* X-33, sin ningún tratamiento (**No-tratadas**) y tratadas con calor (75°C) (**Tratadas-calor**), se utilizaron para identificar las regiones que permitieran identificar las células viables de las no viables.

P. pastoris X-33

No-tratadas Tratamiento-calor



Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante a 30° C como función del número de copias del gen *tvlegu-1*

Para monitorear la expresión de la TvLEGU-1 después de 120 h de inducción con metanol a 30° C, muestras de los sobrenadantes de los cultivos de las cinco clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1*-opt (C1, C2, C3, C4 y C5) que contienen diferentes copias del cassette de expresión de la TvLEGU-1, se analizaron por SDS-PAGE al 12%. Aunque por electroforesis (SDS-PAGE) en geles teñidos con azul de Coomassie no se observó la presencia de algún péptido que correspondiera a la sobre-expresión de la TvLEGU-1 (45 kDa) (datos no mostrados), mediante un ensayo de WB se reconoció un péptido de 45 kDa únicamente en las muestras de los sobrenadantes del cultivo de las clonas C2 y C3 que corresponden a las clonas con el mayor número de copias (**Figura 51B**). Adicionalmente, por electroforesis (SDS-PAGE) en geles teñidos con plata, también se observó un gran número de péptidos adicionales en los sobrenadantes de las clonas con mayor número de copias. Esto pudo deberse al daño celular y liberación de proteínas causado por la actividad proteolítica de la TvLEGU-1 (**Figura 51A**). Además, la presencia de estos péptidos liberados en estas clonas indican que la integridad celular de la levadura estaba dañada.

La sobre-expresión de la TvLEGU-1 tampoco se visualizó por SDS-PAGE en muestras de las fracciones citoplasmática e insoluble de las cinco clonas (**Figura 51C** y **Figura 51E**). En lugar de ello, por WB usando el anticuerpo monoclonal anti-His se observó el reconocimiento de la TvLEGU-1 recombinante (45 kDa) en las muestras de la fracción insoluble de todas las clonas (**Figura 51F**), pero en diferentes cantidades, que podría estar relacionado con el número de copias contenidas del gen *tvlegu-1*-opt. Estos resultados indican que la TvLEGU-1 se translocó del citoplasma al retículo endoplasmático (RE) cuando se utiliza la secuencia señal de la α -amilasa de *A. niger*. Sin embargo, esto también podría sugerir que TvLEGU-1 está asociada a la fracción insoluble, en lugar de ser secretada al medio, lo cual podría estar afectando negativamente el crecimiento de las clonas recombinantes de *P. pastoris*, en particular para las clonas con el mayor contenido de copias del gen *tvlegu-1* (clonas C2 y C3).

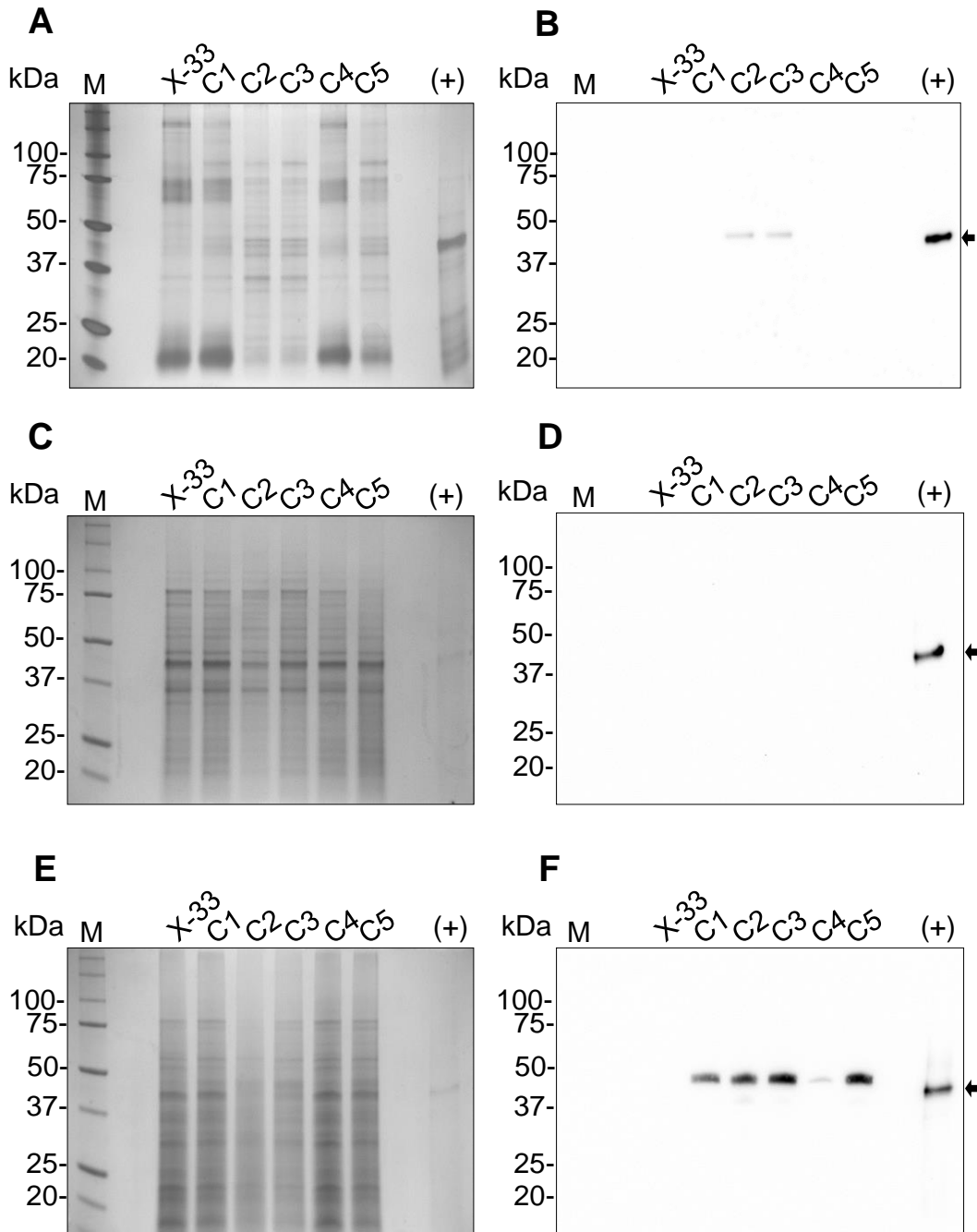
Figura 51. Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* inducidas a 30 °C

Después de 120 horas de inducción con metanol a 30 °C, se tomaron muestras para analizar la expresión de la TvLEGU-1 por SDS-PAGE (12%) y WB.

A) Gel (SDS-PAGE) teñido con plata y **B)** WB de muestras del medio de cultivo. Marcadores de peso molecular (**carril M**), sobrenadante del cultivo de la cepa X-33 de *P. pastoris* (**carril X-33**), muestras del sobrenadante de las clonas transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril C1- carril C5**), TvLEGU-1 recombinante expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión (← 45 kDa, control positivo) (**carril +**).

C) Gel (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie y **D)** WB de muestras de la fracción soluble de la levadura obtenida por lisis celular con perlas de vidrio. Marcadores de peso molecular (**carril M**), *P. pastoris* X-33 (**carril X-33**), muestras de las clonas transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril C1- carril C5**), TvLEGU-1 recombinante expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión (← 45 kDa, control positivo) (**carril +**).

E) Gel (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie y **C)** WB de muestras de la fracción insoluble de la levadura obtenida por lisis celular con perlas de vidrio. Marcadores de peso molecular (**carril M**), *P. pastoris* X-33 (**carril X-33**), muestras de las clonas transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril C1- carril C5**), TvLEGU-1 recombinante expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión (← 45 kDa, control positivo) (**carril +**).



Efecto de baja temperatura (16 °C) en el crecimiento y viabilidad en las clonas recombinantes de *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-tvlegu-1-opt durante la expresión de la TvLEGU-1 recombinante

Comúnmente la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* se lleva a cabo a 30 °C, observándose un crecimiento óptimo y/o acumulación de biomasa (condiciones estándar), pero en algunos estudios se ha reportado que la disminución de la temperatura durante la etapa de inducción a 20 °C o menos puede mejorar los rendimientos de expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*; ya que se mejoran los procesos de plegamiento dentro del retículo endoplasmático (RE) y/o disminuyendo la actividad proteolítica en los sobrenadantes, observándose adicionalmente un aumento de la viabilidad celular (Dragosits et al. 2009; Gasser et al. 2007; Li et al. 2001).

Por lo que, para probar el efecto de la disminución de la temperatura en el crecimiento celular, viabilidad y expresión de la TvLEGU-1 la inducción de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante se realizó a 16 °C utilizando las mismas cinco clonas recombinantes. Bajo estas condiciones se observó una fase de adaptación (fase lag o de adaptación) en el crecimiento de todas las clonas. El crecimiento de las levaduras se retardó notablemente, prolongándose hasta las primeras 48 h de haber iniciado la etapa de inducción con metanol (**Figura 52A**). También es claro que la tasa de crecimiento de los cultivos de las clonas con mayor número de copias (clonas C2 y C3) fue menor que los cultivos de las clonas con el menor número de copias (clonas C1, C4, y C5) (**Figura 52A**).

Para investigar si la inhibición del crecimiento de las clonas C2 y C3 (**Figura 52A**) fue resultado de la muerte celular de la levadura, se determinó la viabilidad celular a 16 °C mediante la comparación de las diferencias entre los porcentajes de las células teñidas con IP (**Figura 52B** y **Figura 53**).

Se observó que las células experimentaron una disminución de la viabilidad celular después de las 48 h de iniciar la inducción con metanol y permaneció por debajo del 10% durante el resto del cultivo (**Figura 52B**). Estos resultados confirman las observaciones previas, de que las clonas con mayor número de copias que expresan la TvLEGU-1, experimentan una variación marcada en su fisiología, particularmente en la fase de inducción, aun cuando se disminuyó la temperatura. No fue evidente la lisis celular en los

cultivos de las transformantes con el menor número de copias del gen *tvlegu-1* (**Figura 52B, Figura 53 y Figura 54**).

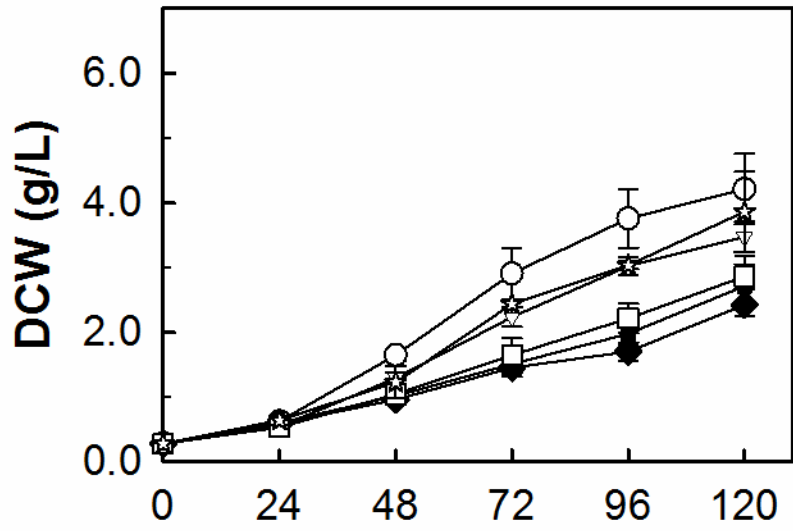
Además, las muestras de los sobrenadantes analizados por SDS-PAGE en geles teñidos con plata y por ensayos WB no se observó la presencia de la TvLEGU-1 recombinante (**Figura 55A y Figura 55B**). Sin embargo, mediante ensayos de WB de muestras del fraccionamiento de los lisados celulares (**Figura 55D y Figura 55F**) nuevamente revelaron que la TvLEGU-1 se acumula en la biomasa de la levadura, cuando un péptido intacto de 45 kDa se reconoció por los anticuerpos anti-Histidinas únicamente en la fracción insoluble (**Figura 55E y Figura 55F**), particularmente en las clonas con mayor número de copias (clonas C2 y C3) en comparación con la ausencia de reconocimiento por el anticuerpo de la clona con menor número de copias (clona C4).

Figura 52. Crecimiento y viabilidad de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* inducidas a 16 °C

A) Cinéticas de crecimiento de las diferentes transformantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* después de la inducción con metanol a 16° C. Para facilitar el análisis comparativo, la inducción con metanol se inició con una D.O.600nm de 1 para todos los clonas analizadas. Se adicionó metanol cada 24 horas a una concentración final del 0.5%.

B) Cinética de viabilidad de los cultivos de las diferentes transformantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* después de la inducción con metanol a 16° C. Para la determinar la viabilidad celular, se tomaron muestras de los cultivos inducidos con metanol a 16° C, se tiñeron con yoduro de propio (IP) y SYTO-9, y se analizaron por citometría de flujo. *P. pastoris* X-33 (**circulo blanco**), clona C1 (**triangulo blanco**), clona C2 (**cuadrado negro**), clona C3 (**rombo negro**), clona C4 (**cuadrado blanco**), y clona C5 (**estrella blanca**).

A



B Inducción (h)

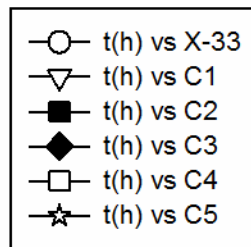
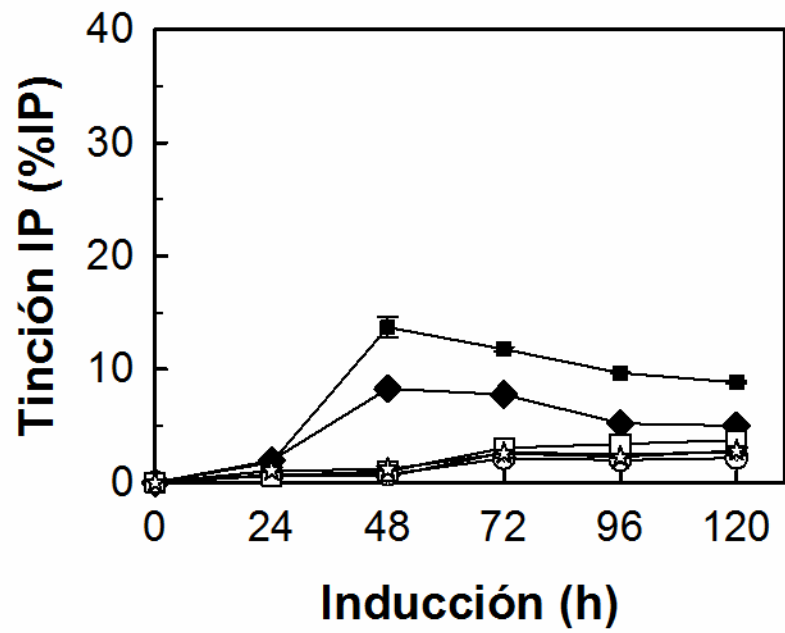
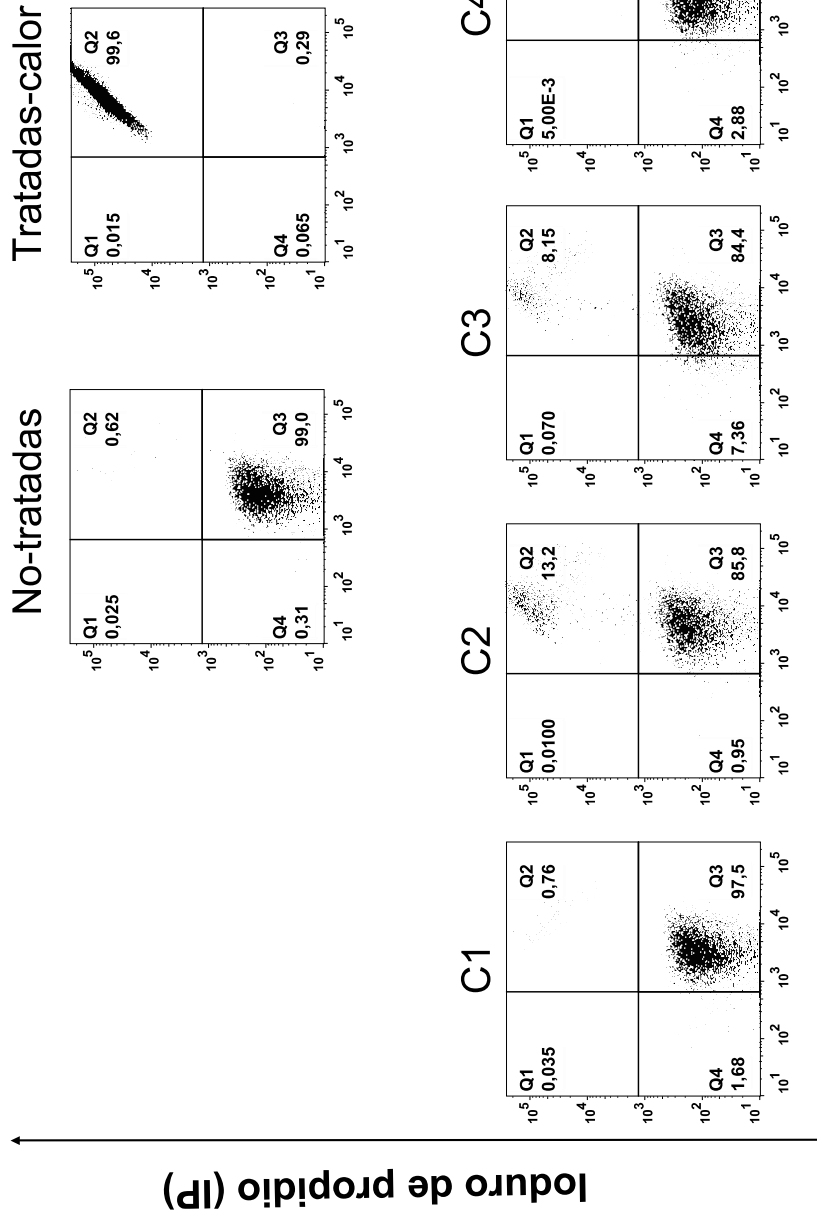


Figura 53. Análisis de citometría de flujo para evaluar la viabilidad de las transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* teñidas con yoduro de propidio

Se tomaron muestras después de las primeras 48 h de inducción con metanol a 16 °C y se tiñeron con IP y SYTO-9. La primera columna muestra las gráficas de puntos de los patrones de tinción de una suspensión de levaduras teñidas con yoduro de propidio (**PI, eje vertical**) y SYTO-9 (**eje horizontal**). **Q1:** levaduras no viables con membranas comprometidas, **Q2:** levaduras no viables con membranas intactas, **Q3:** levaduras viables con membranas intactas, y **Q4:** levaduras viables con membranas comprometidas. Levaduras de un cultivo de *P. pastoris* X-33, sin ningún tratamiento (**No-tratadas**) y tratadas con calor (75 °C) (**Tratadas-calor**), se utilizaron para identificar las regiones que permitieran identificar las células viables de las no viables. Muestras de los cultivos de las clonas C1, C2, C3, C4 y C5 de las transformantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* después de las primeras 48 horas de inducción con metanol a 16 °C, se tiñeron con yoduro de propidio y SYTO-9 para los ensayos de viabilidad por citometría de flujo.

P. pastoris X-33



SYTO-9

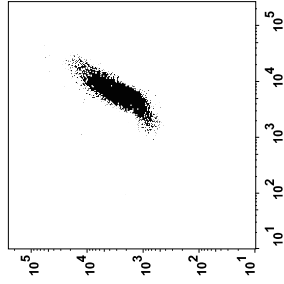
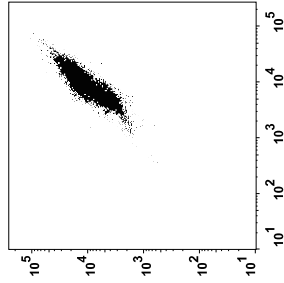
Figura 54. Propiedades de dispersión de luz (Light scattering) de las células de los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* inducidas a 16 °C

Se muestra la gráfica de puntos del tamaño (FSC, “forward-scattered light”, por sus siglas en inglés) vs granularidad (SSC, “side-scattered light”, por sus siglas en inglés) de las células analizadas por citometría de flujo. Muestras de los cultivos de las clonas C1, C2, C3, C4 y C5 de las transformantes *P. pastoris* X-33- pPICZB-AA-*tvlegu-1* después de las primeras 48 h de inducción con metanol a 16 °C, se tiñeron con yoduro de propidio y SYTO-9 para los ensayos de viabilidad por citometría de flujo. Levaduras de un cultivo de *P. pastoris* X-33, sin ningún tratamiento (**No-tratadas**) y tratadas con calor (75°C) (**Tratadas-calor**), se utilizaron para identificar las regiones que permitieran identificar las células viables de las no viables.

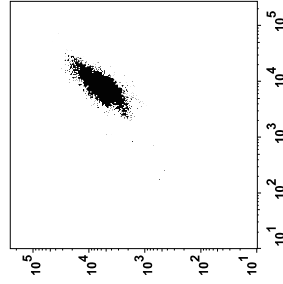
P. pastoris X-33

No-tratadas

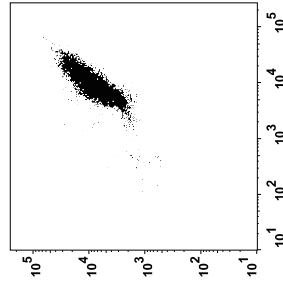
Tratadas-calor



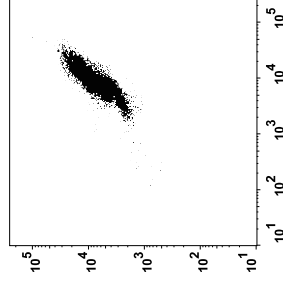
C1



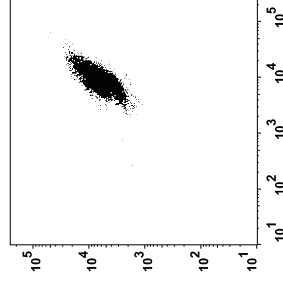
C2



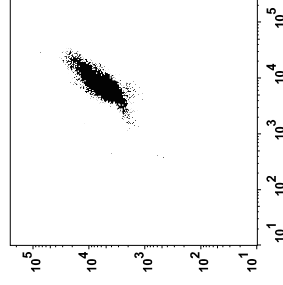
C3



C4



C5



SSC (Side Scatter)

FSC (Forward Scatter)

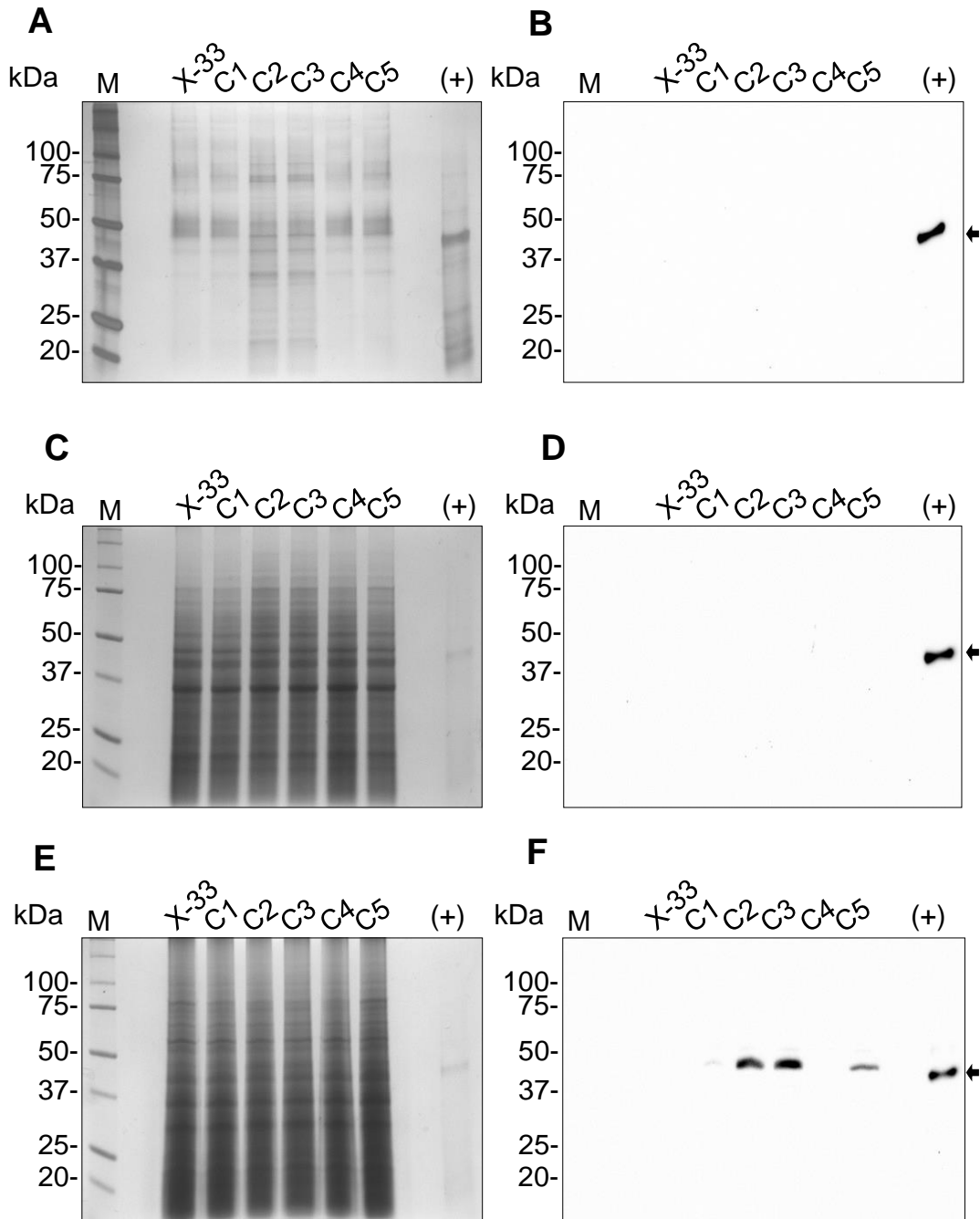
Figura 55. Análisis de la expresión de la TvLEGU-1 recombinante en los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* inducidas a 16 °C

Después de 120 h de inducción con metanol a 16° C, se tomaron muestras para analizar la expresión de la TvLEGU-1 por SDS-PAGE (12%) y WB.

A) Gel (SDS-PAGE) teñido con plata y **B)** WB de muestras del medio de cultivo. Marcadores de peso molecular (**carril M**), sobrenadante del cultivo de la cepa X-33 de *P. pastoris* (**carril X-33**), muestras del sobrenadante de las clonas transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril C1- carril C5**), TvLEGU-1 recombinante expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión (← 45 kDa, control positivo) (**carril +**).

C) Gel (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie y **D)** WB de muestras de la fracción soluble de la levadura obtenida por lisis celular con perlas de vidrio. Marcadores de peso molecular (**carril M**), *P. pastoris* X-33 (**carril X-33**), muestras de las clonas transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril C1- carril C5**), TvLEGU-1 recombinante expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión (← 45 kDa, control positivo) (**carril +**).

E) Gel (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie y **F)** WB de muestras de la fracción insoluble de la levadura obtenida por lisis celular con perlas de vidrio. Marcador de peso molecular (**carril M**), *P. pastoris* X-33 (**carril X-33**), muestras de las clonas transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**carril C1- carril C5**), TvLEGU-1 recombinante expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión (45 kDa, control positivo) (**carril +**).



Actividad de legumaína en los sobrenadantes de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*

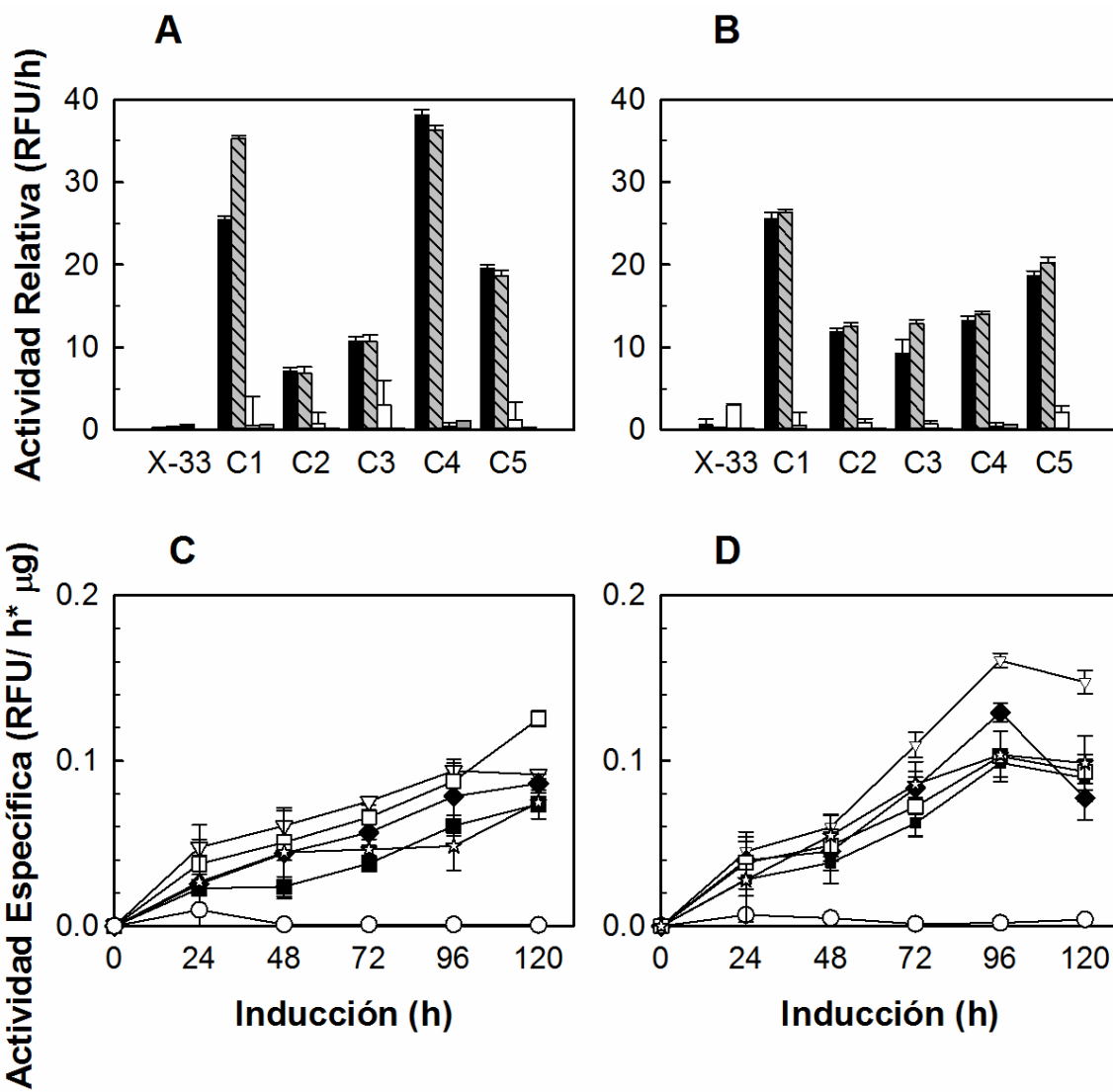
Aunque se esperaba que el precursor de la TvLEGU-1 se encontrara en el sobrenadante de los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* durante la inducción con metanol, se midió la actividad proteolítica (actividad de legumaína) como una manera de analizar la secreción de la TvLEGU-1. Se ha reportado que las CPs del tipo legumaína tienen una actividad proteolítica restringida al sustrato fluorogénico Z-Ala-Ala-Asn-AMC (Johansen et al. 1999). Después de 120 h de inducción con metanol a 30° C, la actividad de legumaína detectada en los sobrenadantes fue inversamente proporcional al número de copias del gen *tvlegu-1-opt* (**Figura 56A**) y se confirmó con el uso de los inhibidores TLCK y E-64. Cuando se utilizó E-64 (inhibidor de CPs de tipo papaína) no se observó disminución de la actividad de legumaína; sin embargo, cuando se utilizó TLCK (inhibidor de CPs de tipo legumaína) se observó una reducción de la actividad proteolítica (~95%) sobre el sustrato fluorogénico (**Figura 56A**). El efecto de los inhibidores muestra que parte de la TvLEGU-1 secretada al medio de cultivo se encontraba en su forma madura (activa). Especulamos que la activación probablemente ocurrió después de que la legumaína se secretó al medio de cultivo durante etapa de inducción con metanol al 0.5% a un pH de 6, y esto se podría confirmar por la ausencia de actividad de legumaína en la fracción intracelular de la levadura (**Figura 56A**). Aunque esto puede apelar a especular que la actividad de legumaína pudo conducir a la toxicidad celular, como se sospechaba para las clonas C2, C3 y C5 que expresan la TvLEGU-1, no podemos concluir directamente esto, ya que la actividad de legumaína para estas clonas fue la más baja. Con la disminución de la temperatura a 16° C durante la etapa de inducción, se observaron resultados similares para la actividad de legumaína detectada en los sobrenadantes de los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**Figura 56B**).

Comparación de los niveles de actividad específica de legumaína de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* a 30 °C y 16 °C

Para comparar la actividad específica en los sobrenadantes de los cultivos de las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* durante la inducción con metanol, se midieron los niveles de actividad relativa de legumaína y se normalizaron con respecto a los niveles de biomasa cada 24 h. Durante la inducción con metanol a 30° C, se observó actividad específica de legumaína para los sobrenadantes libres de células de los cultivos de las clonas *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (**Figura 56C**). Aunque la inducción a 16° C no resultó en una evidente secreción de la TvLEGU-1 recombinante, se incrementó la actividad de legumaína para el cultivo de la clona C1 que contiene dos copias del cassette de expresión. La actividad específica registrada para la clona C1 incrementó constantemente a lo largo de la inducción, alcanzando un máximo de actividad en el cultivo a las 96 h de inducción, 0.1606 RFU/ μ g h, mientras que para la actividad de las otras clonas no se observó el mismo comportamiento (**Figura 56D**). No se detectó actividad específica de legumaína para el sobrenadante del cultivo de la cepa no transformada X-33 de *P. pastoris* (datos no mostrados).

Figura 56. Análisis de la actividad de legumaina de los cultivos de las clonas transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* durante la inducción con metanol

La actividad relativa (RFU h⁻¹) de las muestras de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de las transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* se determinó después de la inducción con metanol a 30 °C (**A**) y 16 °C (**B**), en ausencia de inhibidores (no-inhibidor) (barras negras) o presencia de 0.18 mM de E-64 (inhibidor específico de CPs tipo papaína) (barras con rayas), 1 mM de TLCK (inhibidor de CPs tipo legumaina) (barras grises). Adicionalmente, se determinó la actividad relativa de la fracción intracelular de las transformantes de *P. pastoris* inducidas con metanol a 30 °C (**A**) y 16 °C (**B**) en la ausencia de inhibidores (barras blancas). También se determinó cada 24 h la actividad específica de legumaina (RFU μg⁻¹ h⁻¹) de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de las transformantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* inducidos con metanol a 30 °C (**C**) y 16 °C (**D**). *P. pastoris* X-33 (**circulo blanco**), clona C1 (**triangulo blanco**), clona C2 (**cuadrado negro**), clona C3 (**rombo negro**), clona C4 (**cuadrado blanco**) y clona C5 (**estrella blanca**).



DISCUSIÓN

Desde la identificación y caracterización funcional de la TvLEGU-1 (Leon-Felix et al. 2004; Rendón-Gandarilla et al. 2013), fue evidente la necesidad de una plataforma de expresión de proteínas recombinantes confiable para producir cantidades suficientes de esta proteína, en su conformación correctamente plegada para estudios posteriores. De esta manera, el objetivo del presente trabajo fue explorar las condiciones adecuadas para producir la TvLEGU-1 recombinante sin pasos adicionales como la desnaturalización y replegamiento necesarios durante la producción de esta proteína cuando se obtiene como cuerpos de inclusión en el sistema de expresión de la bacteria *E. coli*. Para lograr este propósito, se utilizó la plataforma de expresión de *P. pastoris*.

El sistema de expresión de la levadura metilótrofa *P. pastoris* ha recibido gran atención para la expresión de proteínas de origen eucarionte, ya que se ha convertido cada vez más popular por su potencial de secretar proteínas heterólogas, especialmente para obtener proteínas en forma funcionalmente activa con el plegamiento y modificaciones postraduccionales correctas (Cereghino et al. 2002; Damasceno et al. 2012). La expresión heteróloga en *P. pastoris* puede ser de forma intracelular o extracelular. El Kit de Expresión *Pichia* EasySelect (Invitrogen) recomienda que i) si la proteína es citosólica, para llevar a cabo la expresión intracelular se puede utilizar uno de los vectores pPICZ (Invitrogen) y ii) si la proteína es normalmente secretada se puede obtener mediante el uso de algún vector que contenga la secuencia que codifique para algún péptido señal.

En un primer intento de expresar y secretar la TvLEGU-1 utilizando el sistema de expresión de *P. pastoris*, se optó por usar el vector de expresión pPICZ α B y la cepa nativa X-33 de *P. pastoris* tal como Götz y col., reportó en el 2008 (Götz et al. 2008). El vector de expresión pPICZ α B tiene la secuencia señal del factor α de apareamiento de *S. cerevisiae* (α -MF), que permite la translocación de la proteína recombinantes a través de la membrana del retículo endoplasmático (Ng et al. 1996; Plath et al. 1998; Waters et al. 1988). Este péptido señal contiene una pre-secuencia de 19 aminoácidos seguida de una pro-región de 67 aminoácidos que contiene tres sitios para N-glicosilación y un sitio de procesamiento de la endopeptidasa Kex2 (Kurjan and Herskowitz 1982).

Götz y colaboradores (Götz et al. 2008) reportaron que la TvLEGU-1 se expresó funcionalmente en *P. pastoris* cuando se usó el péptido señal α -MF. Sin embargo, de

nuestros resultados, es evidente por el análisis de WB que la rTvLEGU-1 no se secretó al medio de cultivo. Esto pudo deberse a que la rTvLEGU-1 se retuvo dentro de la levadura (**Figura 34**). El mayor tamaño del péptido observado (~ 55 kDa) en comparación con el peso molecular esperado (45 kDa) sugiere que la pre-región del α -MF fue suficiente para la translocación del precursor de pre-pro- α -MF-TvLEGU-1 en el ER, pero también es un indicio que el pro- α -MF no fue procesado, lo cual pudo causar su retención dentro de la levadura. Podemos especular que durante el plegamiento del precursor pro- α -MF-TvLEGU-1 el sitio Kex2 quedó inaccesible, porque, aunque se sabe que la pro-secuencia ayuda durante el correcto plegamiento de la proteína antes y después de la translocación en el ER (Chaudhuri et al. 1992), el plegamiento de la TvLEGU-1 pudo afectar en la eficiencia de secreción. Por lo tanto, la tasa de plegamiento y la disponibilidad de sitio Kex2 pueden ser factores limitantes en esta vía de secreción durante el correcto procesamiento del α -MF.

Aunque se ha reportado que la TvLEGU-1 está presente en el citoplasma y en la superficie del parásito, a la fecha su vía de secreción no se conoce (Leon-Felix et al. 2004; Rendón-Gandarilla et al. 2013). Adicionalmente, no se identificó la existencia de un péptido señal canónico en la secuencia de la TvLEGU-1 con el servidor SignalP 4.0. Por lo tanto, se decidió usar el gen sintético *tvlegu-1* optimizado con el uso de codones preferenciales para *P. pastoris* para la expresión intracelular de la rTvLEGU-1 en la levadura. La expresión intracelular del gen *tvlegu-1-opt* bajo el control del promotor *AOX1*, inducible por metanol en el sistema de *P. pastoris*, resultó en la obtención de una proteína asociada con la fracción insoluble de la levadura (**Figura 40**). Junto con los resultados obtenidos durante su expresión en *E. coli* (**Tabla IX**), esto sugiere que es una propiedad intrínseca de la TvLEGU-1 cuando se expresa en el ambiente reductor del citoplasma, más que un artificio de un sistema de expresión y/o vector de expresión dado.

Basándose en los resultados descritos para la expresión intracelular de la rTvLEGU-1 en el sistema de *P. pastoris*, es claro que los requerimientos de plegamiento y estabilidad para esta proteína podrían únicamente ser suplidos por el ambiente oxidativo del retículo endoplásmico, cuando la proteína es dirigida al medio de cultivo por algún péptido señal. Sin embargo, el uso de un péptido señal largo como el α -MF o el MAT α : Δ 57-70, causó problemas. Encontrándose que ambos péptidos señal permitieron la translocación de la rTvLEGU-1 del citoplasma al retículo endoplásmico, pero de alguna manera su secreción

se vio obstaculizada. Debido a que los péptidos señal pueden variar ampliamente en su capacidad de secretar proteínas recombinantes, es de suma importancia tener varios péptidos señal de secreción entre los que se pueda elegir para encontrar el óptimo para una determinada proteína (Liang et al. 2013). En muchos casos, simplemente se puede tomar ventaja de algunos vectores comerciales disponibles para la expresión y secreción de proteínas recombinantes. En este sentido, con el fin de probar si el péptido señal largo pre-pro- α -MF no era conveniente para la secreción de la rTvLEGU-1, clonamos algunos péptidos señal cortos, que se ha reportado se utilizan durante la expresión y secreción de proteínas en la plataforma de *P. pastoris* (**Tabla XI**). Se ha reportado, en algunos casos, que el uso de un péptido señal corto puede ser suficiente para la secreción de proteínas recombinantes (Heiss et al. 2015). El uso de péptidos señal cortos fue ventajoso, ya que se pudieron fusionar directamente al vector de expresión comercial pPICZB, y luego el gen *tvlegu-1-opt* se clonó bajo el control del promotor *AOX1* y en marco con la etiqueta de 6x His para facilitar la detección y purificación. La capacidad de secreción de estos péptidos señal cortos en comparación con el péptido señal α -MF sobre esta proteína de difícil expresión (rTvLEGU-1) no se habían probado hasta ahora.

Dado que nuestro objetivo principal fue evaluar la factibilidad de utilizar diferentes péptidos señal para la expresión de la rTvLEGU-1 en *P. pastoris*, fue necesario un método sencillo y directo para la selección de clonas que expresaran la rTvLEGU-1. Por lo que el inmuno ensayo de tipo “dot blot” permitió que esta meta se pudiera lograr y fue una manera altamente eficiente para llevar a cabo la selección de un gran número de clonas cultivadas a pequeña escala (en tubos cónicos de 50 mL). Los resultados revelaron que aparentemente algunas de las clonas seleccionadas permitieron la expresión y secreción de la TvLEGU-1 (**Figura 45**), demostrando que las secuencias de los péptidos señal clonadas río arriba del gen *tvlegu-1-opt* dirigieron la proteína recombinante a la vía de secreción. Sin embargo, este método permitió llevar a cabo un análisis cualitativo, ya que los anticuerpos reconocieron únicamente la etiqueta de histidinas, independientemente de la integridad de las proteínas y no permitió diferenciar entre las forma procesada y no procesada de la rTvLEGU-1. Las señales de reconocimiento contra la etiqueta de histidinas observada durante el ensayo “Dot blot”, fueron variables. Estas diferencias podrían explicarse por la concomitante secreción de la rTvLEGU-1 en aquellas clonas que presentan mayor

reconocimiento. Sin embargo, fue necesario escalar la expresión a matraces de tipo Erlenmeyer bafleados de 100 mL para mejorar los niveles de expresión, incrementar la reproducibilidad de las condiciones de cultivo e identificar claramente la expresión de la proteína en su tamaño esperado mediante electroforesis (SDS-PAGE) y WB de muestras de los sobrenadantes y seleccionar aquellas clonas que presentaran la mejor expresión de la TvLEGU-1. Pero debido a la dificultad para comparar la expresión de la rTvLEGU-1 en los sobrenadantes de todos los cultivos a una mayor escala (matraces de tipo Erlenmeyer bafleados de 100 mL), y dado que se ha reportado que el péptido señal corto de la alfa-amilasa (20 aminoácidos) de *Aspergillus niger* se ha utilizado con éxito en la expresión y secreción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* (Paifer et al. 1994), decidimos trabajar con las clonas transformadas con la construcción pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* (clonas *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt*) que contienen la secuencia que codifica para el péptido señal de la alfa-amilasa (AA).

Uno de los problemas comúnmente encontrado en *P. pastoris* cuando se usa Zeocina como antibiótico de selección, es la presencia de falsos positivos, en particular en aquellas clonas capaces de crecer en altas concentraciones del antibiótico y que no contienen múltiples copias del vector de expresión (Cereghino and Cregg 2000). También se observaron falsos positivos en este estudio, ya que por el ensayo de “ddPCR” la clona C5 seleccionada en los dos niveles de Zeocina más altos (500 mg / mL y 1000 mg / mL), se observó contiene inesperadamente un bajo número de copias del gen *tvlegu-1-opt* (cinco copias) en comparación con las clonas C2 y C3, seleccionadas también en los más altos niveles de Zeocina, que contienen 26 y 29 copias, respectivamente (**Figura 47**). Posiblemente hubo una degradación del antibiótico durante el tiempo de incubación o la resistencia al antibiótico fue por alguna otra razón no conocida, no relacionada con el número de copias del gen, como se ha reportado previamente (Sunga et al. 2008). Los resultados de la selección de la clona C5 enfatizan la importancia de evaluar los resultados no solo a nivel de resistencia a Zeocina y por PCR convencional, sino también a nivel del contenido del gen heterólogo, para asegurar que las transformantes de *P. pastoris* fueron correctamente seleccionadas. El número de copias del gen heterólogo, ha probado ser un parámetro crítico para comparar clonas que expresan proteínas recombinantes difíciles de expresar (Hohenblum et al. 2004a), tales como la rTvLEGU-1. El uso de la técnica de

“droplet digital PCR” (ddPCR) (Camara et al. 2016) nos permitió clasificar las transformantes de *P. pastoris* de acuerdo al contenido del gen *tvlegu-1-opt*, facilitando su posterior caracterización y así evitar falsas interpretaciones de nuestros resultados (**Figura 47**).

En contraste con muchos otros estudios en los que se ha reportado una correlación lineal entre el número de copias y la expresión de la proteína, de hasta un total de entre 8 y 19 copias por célula (Clare et al. 1991; Hohenblum et al. 2004a; McGrew et al. 1997; Vassileva et al. 2001; Zhu et al. 2009), en este trabajo proporcionamos las evidencias que confirman que la expresión de la TvLEGU-1 a una temperatura estándar (30 °C) en *P. pastoris*, conducen a su acumulación intracelular independientemente del número de copias contenido por las cepas recombinantes (**Figura 51**). Es remarcable que la producción de la TvLEGU-1 incrementa con el contenido del número de copias del gen heterólogo. Sin embargo, parece que el sistema de secreción de la levadura fue incapaz de procesar y secretar correctamente la proteína, conduciendo a una inhibición del crecimiento (**Figura 49A**) y una subsecuente muerte celular, tal como se muestra para aquellas clonas (clona C2 y C3) que contienen el mayor número de copias (**Figura 49B**). Sin embargo, mediante la disminución de la temperatura a 16 °C, se observó una correlación positiva entre el número de copias y la actividad específica de legumaína, tal como se muestra para la clona C1 que contiene dos copias del gen *tvlegu-1-opt* (0.0987 RFU.µg/h a 30° C, **Figura 56C**, y 0.1606 RFU.µg/h a 16° C, **Figura 56D**), existiendo una correlación negativamente arriba de cinco copias, acompañada por una significativa acumulación de la rTvLEGU-1 dentro de la levadura (**Figura 55F**).

El incremento en la actividad de legumaína durante la inducción a 16° C se podría atribuir a un aumento de la viabilidad celular (Hong et al. 2002; Jahic et al. 2003; Li et al. 2001). Cuando se analizó la viabilidad de las clonas recombinantes de *P. pastoris* durante la inducción de la expresión de la rTvLEGU-1 con metanol, los resultados mostraron una mayor muerte celular a 30 °C en comparación con las muestras de los cultivos inducidos a 16 °C (**Figura 49B** y **Figura 52B**). Sin embargo, a baja temperatura (16 °C), la muerte celular de *P. pastoris* fue no mayor al 10% en las clonas C2 y C3 con el mayor número de copias. En general, la temperatura de 16 °C resultó tener un impacto significativo sobre la viabilidad celular. Esto está de acuerdo con los cambios de peso seco (DCW) registrados,

que muestran un aumento constante para todas las clonas a temperatura de 16 °C en comparación con la temperatura estándar (30 °C), donde el DCW disminuyó notablemente para las clonas C2 y C3 (Figura 49A y la Figura 52A). Estos resultados apoyan la sugerencia de que una temperatura más baja (16 °C) permitió la disminución de la muerte celular, y un aumento de la actividad específica de legumina, como se observa en la clona C1. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que el aumento en la actividad proteolítica de la rTvLEGU-1 puede estar relacionada con algún otro mecanismo, junto con la disminución de la muerte celular de la levadura.

Puede haber varios mecanismos detrás del efecto de bajar la temperatura de inducción sobre el aumento de la actividad de legumina para la clona C1. Debido a las propiedades específicas de cada proteína, la eficacia de plegamiento y procesamiento de cada proteína en el ER es diferente. La rTvLEGU-1 podría requerir un tiempo de procesamiento más largo para plegarse correctamente debido a la estructura multi-dominio que presentan las proteasas pertenecientes a este clan (Macauley-Patrick et al. 2005). Además, la secuencia de la TvLEGU-1 contiene siete residuos de cisteína, y al menos seis podrían estar involucrados en la formación de enlaces por puentes disulfuro. Por lo tanto, la reducción de la temperatura puede disminuir el estrés de plegado impuesto a la célula, lo que podría conducir al aumento en la obtención de proteína correctamente plegada (Gasser et al. 2007; Li et al. 2001).

La inducción con metanol de la clona con dos copias del gen *tvlegu-1-opt* (Clona C1) a una baja temperatura, pudo resultar en un aumento de la secreción de la rTvLEGU-1 por la disminución de la tasa de síntesis de proteínas, lo cual pudo haber generado un balance entre la proteína que entra y sale a través de vía de secreción de la levadura. Estos resultados son consistentes con reportes previos que muestran que la sobre-expresión de proteínas conduce a la disminución en el rendimiento de la secreción de proteínas (Bannister and Wittrup 2000; Inan et al. 2006; Liebman et al. 1999; Liu et al. 2003).

Junto con los requerimientos de plegamiento de la TvLEGU-1, su acumulación intracelular también podría ser debido a una alta inducción del promotor *AOX1*. Por lo tanto, las altas tasas de traducción que se imparte a la célula debidas al promotor *AOX1* pueden saturar la capacidad de plegamiento del ER, lo que resulta en la acumulación de proteínas mal plegadas. La respuesta al mal plegamiento de la proteína desplegada (UPR)

por parte de la levadura, sirve para restaurar la homeostasis en el retículo endoplasmático después de la acumulación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, si la célula no puede adaptarse con éxito a una situación de estrés, como la sobre-expresión de proteínas, podría darse lugar a la muerte celular (apoptosis) (Liu et al. 2005; Mattanovich et al. 2004; Sitia and Braakman 2003).

En otros estudios se ha demostrado que la acumulación de proteínas recombinantes en *P. pastoris* induce la UPR (Hohenblum et al. 2004b). Esto podría explicar por qué la acumulación intracelular de la TvLEGU-1, que fue notablemente elevada en las clonas con el mayor número de copias del cassette de expresión (Clonas C2 y C3), dio lugar a la inhibición del crecimiento, la lisis celular y la abundante liberación de proteínas endógenas en el sobrenadante (**Figura 49** y **Figura 52**). Estudios adicionales para determinar si la acumulación de la TvLEGU-1 induce la UPR podría proporcionar conocimientos adicionales sobre el uso de *P. pastoris* como un sistema heterólogo para la expresión de la TvLEGU-1.

Como se discutió anteriormente, una de las razones para que la TvLEGU-1 se retuviera dentro de las células de *P. pastoris* puede ser debido al plegamiento incorrecto de esta molécula, en el cual podría estar implicado la formación de enlaces por puentes disulfuro. Para resolver este problema, será interesante evaluar el efecto de la introducción de un cassette de expresión que codifica una proteína disulfuro isomerasa (PDI), enzima que ayuda a las proteínas a lograr la correcta formación de enlaces por puentes disulfuro (Inan et al. 2006).

CONCLUSIÓN

En conclusión, las condiciones exploradas en este estudio, como el uso de un péptido señal corto, el número de copias del gen heterólogo y la temperatura de inducción, nos permitió seleccionar condiciones para la expresión heteróloga de la TvLEGU-1 enzimáticamente activa en la plataforma de expresión de *P. pastoris*. Los resultados indican que el aumento del número de copias del cassette de expresión fue perjudicial para la expresión heteróloga de la rTvLEGU-1 en la levadura. Adicionalmente, la rTvLEGU-1 asociada a la membrana en la fracción insoluble de las células para cualquier número de copias contenido en las clonas, sugiere que la eficiencia de la traducción no fue el principal cuello de botella en la expresión de la proteína. En su lugar, los pasos limitantes para obtener la rTvLEGU-1 en su conformación nativa y activa podrían ser eventos co-traduccionales y postraduccionales, tales como el plegamiento de la proteína y la formación de enlaces por puentes disulfuro (Hohenblum et al. 2004b; Inan et al. 2006; Kauffman et al. 2002; Zhu et al. 2011). La estrategia utilizada en este estudio podría ser útil para la expresión recombinante de otras CPs en su conformación nativa.

Esta investigación principalmente contribuyó a explorar la expresión heteróloga de la rTvLEGU-1 en su forma soluble en el sistema de *P. pastoris* y también allana el camino para determinar las deficiencias de la proteína de fusión de acuerdo con una serie de experimentos, y ayuda a mejorar las estrategias para obtener la rTvLEGU-1 correctamente procesada, que es un biomarcador potencial para la inmunodetección de la tricomoniasis.

PERSPECTIVAS

1. Realizar ensayos de inducción de la expresión de la TvLEGU-1 con las clonas recombinantes *P. pastoris* X-33-pPICZB-AA-*tvlegu-1-opt* con menor número de copias (clonas C1 y C4) a una escala de fermentador para incrementar la cantidad de TvLEGU-1 y poder purificarla para realizar ensayos bioquímicos y estructurales
2. Estudiar el efecto de la delección y/o mutación de las cisteínas de la TvLEGU-1 durante su expresión, secreción y activación al expresarse en *P. pastoris*.
3. Estudiar el efecto de la co-expresión de la PDI (proteína disulfuro isomerasa) durante la expresión y secreción de la TvLEGU-1 en clonas con más de cinco copias del gen *tvlegu-1-opt*
4. Realizar estudios adicionales para determinar si la acumulación de la TvLEGU-1 induce la UPR.
5. Comparar la expresión y secreción de la TvLEGU-1 al utilizar los otros péptidos señal.

APÉNDICES

Apéndice I: Soluciones

METODOLOGÍAS GENERALES

Extracción de ADN plasmídico

Amortiguador de resuspensión P1

Tris- HCl pH8.0	50 mM
EDTA	10 mM

Amortiguador de lisis P2

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Amortiguador de neutralización P3

KCH ₂ COOH pH 5.5	3.0 M
------------------------------	-------

Preparación de células competentes

Amortiguador TFB1

RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
KC ₂ H ₃ O ₂	30 mM
CaCl ₂	10 mM

Amortiguador TFB2

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM

Cromatografía de afinidad a níquel

Amortiguador de Lisis (Amortiguador de unión)

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
NaCl	250 mM
PMSF	1mM
Glicerol	5%

Amortiguador de lavado

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
NaCl	250 mM
PMSF	1mM
Glicerol	5%
Imidazol	10 mM

Amortiguador de elución

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
NaCl	250 mM
PMSF	1mM
Glicerol	5%
Imidazol	500 mM

Apéndice II: Descripción de la secuencia de los distintos péptidos señal

Descripción de la secuencia de nucleótidos que codifican para los distintos péptidos señal, subrayado: secuencia Kozak, negritas: sitio de inicio de la traducción ATG, Rojo: sitio de restricción 5'-*EcoRI* y Azul: sitio de restricción 3'-*KpnI*.

AA-Alpha amilasa

Secuencia señal derivada del gen de la alpha amilasa de *Aspergillus niger*, facilita la secreción de proteínas heterólogas en levaduras (Paifer et al. 1994).

Fuente: *Aspergillus niger*, Longitud: 20 aa, MW: 2207.6 Da

Secuencia de nucleótidos:

GAATTCGAAACGATGGTCGCTTGGTGGTCTTTGTTTCTGTACGGTCTTCAGGTC
GCTGCACCTGCTTTGGCTGGTACC

GA-Glucoamilasa

Secuencia señal derivada de gen STA1 de la glucoamilasa extracelular de *Aspergillus awamori*, facilita la secreción de proteínas heterólogas en levadura (Fierobe et al. 1997).

Fuente: *Aspergillus awamori*, Longitud: 18 aa, MW: 1825.2 Da

Secuencia de nucleótidos:

GAATTCGAAACGATGTCTTTTAGATCCTTGTTGGCTTTGTCTGGTTTGGTTTGTT
CTGGTTTGGCTGGTACC

IN-Inulinasa

Secuencia señal derivada del gen INUIA de inulinasa de *Kluyveromyces maxianus*, facilita la secreción en levaduras (Kang et al. 1996).

Fuente: *Kluyveromyces maxianus*, Longitud: 16 aa, MW: 1647.0 Da

Secuencia de nucleótidos:

GAATTCGAAACGATGGAAGTTAGCATACTCCTTGTTGCTTCCATTGGCAGGAGTC
AGTGCTGGTACC

IV-Invertasa

Secuencia señal derivada del gen SUC2 de la invertasa secretada por *Saccharomyces cerevisiae*, facilita la secreción de proteínas heterólogas en levaduras (Chang et al. 1986).

Fuente: *Saccharomyces cerevisiae*, Longitud: 19 aa, MW: 2025.5 Da

Secuencia de nucleótidos:

GAATTCGAAACGATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCAG
CCAAAATATCTGCAGGTACC

KP-Proteína Killer

Secuencia derivada de la toxina killer de *Saccharomyces cerevisiae*, facilita la secreción de proteínas heterólogas en levaduras (Tokunaga et al. 1988).

Fuente: *Saccharomuces cerevisiae*, Longitud: 26 aa, MW: 2926.6 Da

Secuencia de nucleótidos:

GAATTCGAAACGATGACTAAGCCAACCCAAGTATTAGTTAGATCCGTCAGTAT
ATTATTTTTCATCACATTACTACATCTAGTCGTAGCTGGTAC

LZ-Lisozima

Secuencia señal derivada de la lisozima de pollo, facilita la secreción de proteínas heterólogas en levaduras (Jigami et al. 1986).

Fuente: *Gallus gallus*, Longitud: 26 aa, MW: 2686.4 Da

Secuencia de nucleótidos:

GAATTCGAAACGATGCTGGGTAAGAACGACCCAATGTGTCTTGTTTTGGTCTTG
TTGGGATTGACTGCTTTGTTGGGTATCTGTCAAGGTGGTACC

SA-Albumina de suero

Secuencia señal derivada de la albumina humana, facilita la secreción de proteínas heterólogas en levaduras (Cereghino et al. 2002).

Fuente: *Homo sapiens*, Longitud: 18 aa, MW: 2140.5 Da

Secuencia de nucleótidos:

GAATTCGAAACGATG AAGTGGGTTACCTTTATCTCTTTGTTGTTTCTTTTCTCTT
CTGCTTACTCTGGTACC

Apéndice III: Resultados de secuenciación de la batería de vectores que contienen los distintos péptidos señal

Vector	Secuencia Señal	Archivo de la secuencia
pPICZB-AA	SS- Alfa-amilasa (<i>Aspergillus niger</i>)	SP1-3-AOX_B01_04.ab1
pPICZB-GA	SS- Glucoamilasa (<i>Aspergillus awamori</i>)	SP2-3-AOX_C01_07.ab1
pPICZB-IN	SS- Inulinasa (<i>Kluyveromyces maxianus</i>)	SP4-3-AOX_E01_13.ab1
pPICZB-IV	SS- Invertasa (<i>S. cerevisiae</i>)	SP5-3-AOX_F01_16.ab1
pPICZB-KP	SS- Proteína Killer (<i>S. cerevisiae</i>)	Pendiente
pPICZB-LZ	SS- Lisozima (<i>Gallus gallus</i>)	SP7-3-AOX_H01_22.ab1
pPICZB-SA	SS- Albumina de suero (<i>Homo sapiens</i>)	SP3-3-AOX_D01_10.ab1

Análisis de los resultados de secuenciación de la batería de vectores que contienen los distintos péptidos señal, subrayado: secuencia Kozak, negritas: sitio de inicio de la traducción ATG, Rojo: sitio de restricción 5'-EcoRI y Azul: sitio de restricción 3'-KpnI. Además, se anexan los archivos de secuenciación en versión electrónica.

- **pPICZB-AA (SP1-3-AOX_B01_04.ab1)**

CTGGGCCCCCCCCCTTGGGACGAAGGGTTGCAATGTTGTTTTAATTTTCGGAATT
GCAACCAAGCTCCGCATTTACACCCGAACATCACTTCCAGATGAGGGCTTCTGA
GTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCCCAAATGGCCCAAACACTGACAGTTT
AAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAA
CTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAAACTTCCA
AAAGTCGGCATAACGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAAT

AATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACC
TGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTC
TCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGT
TCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAG
AAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTT
CATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACG
ACAACCTGAGAAGATCAAAAAACAACCTAATTATTCGAAACGAG

GAATTCGAAACGATGGTCGCTTGGTGGTCTTTGTTTCTGTACGGTCTTCAGGTC
GCTGCACCTGCTTTGGCTGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCAGCTTTCTAG
AACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCAT
CATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGG
CACTTACGAGAAGACCGGTTCCCTTGCATTTTTTGCCT

Traducción:

EFETMVAWWSLFLYGLQVAAPALAGTSSRGGRQLSRTKTHLRRGSE-
RRRPSSSSSL

SS- Alfa-amilasa (*Aspergillus niger*)

MVAWWSLFLYGLQVAAPALA

- **pPICZB-GA (SP2-3-AOX_C01_07.ab1)**

CTGGGTTTCTACATTCCCTTGGGCCCCCCCCTGGGCCGAGGTTTCATGTTGTTTAA
TTGCGGAATGCAAACAAGCTTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAG
GGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCCAAACCT
GACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCA
AGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGA
AACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGC
TCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCC
GGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTA
TGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATA
GCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATA
TATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTA

GCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAACGAC
TTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGAG

GAATTCAAACGATGTCTTTTAGATCCTTGTTGGCTTTGTCTGGTTTGGTTTGTTC
TGGTTTGGCT**GGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCG**CCAGCTTTCTAGAACAAAA
ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCA
TTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACG
AGAAGACCGTCTTGCTTAGGTTCCGG

Traducción:

IQT**MSFRSLLALSGLVCSGLAGTSSRGGRQLSRTKTHLRRGSE**-RRRPSSSSSL

SS- Glucoamilasa (*Aspergillus awamori*)

MSFRSLLALSGLVCSGLA

- **pPICZB-SA (SP3-3-AOX_D01_10.ab1)**

AGTCCCTGGTCTCTATTCCCTGGGGCCCCCCCCCTGGCGAGCTCATGTTGTAA
TTTCCGAATGCAAACAAGCTTCCGCATTACACCCCGAACATCACTCCCAGATGA
GGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCCAAATAGTTTTTCATGTTCCCCAAATGGCCCCAA
AACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTC
ATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAA
AAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACG
AATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGA
ACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGAT
GATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGC
TGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAG
CAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCA
TTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTT
AACGACTTTTAAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAA
CGAG

GAATTCGAAACGATGAAGTGGGTTACCTTTATCTCTTTGTTGTTTCTTTTCTCTT
CTGCTTACTCTGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCGCGCCAGCTTTCTAGAACAAAA
ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCA
TTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACG
AGAAGACCGGGTCTTGGCTTGTGGTT

Traducción:

EFETMKWVTFISLLFLFSSAYS **SGTSSRGRQLSRTKTHLRRGSE**-RRRPSSSSSL

SS- Albumina de suero (*Homo sapiens*)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

- **pPICZB-IN (SP4-3-AOX_E01_13.ab)**

CTACTAAGCCACCCCAATTGAACCTTTAAGTAGGCCATGTTTCGTCCTAGACCC
CCCCTGGTCGAGGTTTATTGTTGTTTTATTTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATT
ACACCCGGAACATCACTCCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAG
TTTCATGTTCCCCCAAATGGCCCCAAAAGTACTGACAGTTTTAAACGCTGTCTTGG
ACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTT
GAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCG
TTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTT
AGCGCAGTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAA
TGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTT
CCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAATTTA
ACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGT
CTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTT
CCAATTGACAAGCTTTTGATTTAACGACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCA
AAAAACAACCTAATTATTCGAAACGAG

GAATTCAAACGATGAAGTTAGCATACTCCTTGTTGCTTCCATTGGCAGGAGTC
AGTGCTGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCGCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTC
ATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCAT**TG**

AGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGA
AGACCGGTCCTGCCTAGGTTCCC

Traducción:

IQTMKLA~~YSLLLPLAGV~~SAGTSSRGGRQLSRTKTHLRRGSE-RRRPSSSSSL

SS- Inulinasa (*Kluyveromyces maxianus*)

MKLA~~YSLLLPLAGV~~SA

- pPICZB-IV (SP5-3-AOX_F01_16.ab1)

CATGTGTTCCCTTATCCTTGGGCTCCCCCTGGCGAGGTTTGCATGGTTGTTTATTT
CCGGAATTGCAAACAAGCTCCGCATTACACCCGGAACATCACTCCAGATGAGG
GCTTTCTGAGTGTGGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCCAAAAAC
TGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCC
AAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAG
AAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATG
CTCAAAAATAATCTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCC
CGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATT
ATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGAT
AGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAAT
ATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATT
AGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTAACG
ACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAACAACCTAATTATTCGAAACGAG

GAATTCGAAACGATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCA
GCCAAAATATCTGCAGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAA
CAAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCA
TCATCATT**GAG**TTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCA
CTTACGAGAAGACCCCGGTCCTGGCCTTGGTACG

Traducción:

EFETMLLQAFLLAGFAAKISAGTSSRGGRQLSRTKTHLRRGSE-RRRPSSSSSL

SS- Invertasa (*S. cerevisiae*)

MLLQAFLFLAGFAAKISA

- **pPICZB-LZ (SP7-3-AOX_H01_22.ab1)**

TGTGCGCATGACTTTCCATTGGTTTTGGTTATCTCCCGAAATTGCAAACAAGCT
TCGCATTACAACCCCGAACCATCACTCCCAGATTGAGGGACTTCTGAGTTGTGG
GGTCAAATAGTTTCATGTTCCCCAAAATGGCCAAAACACTGACAGTTTAAACGCT
GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTT
GGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCG
GCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCA
TTAATGCTTAGCGCAGTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCG
AAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACAT
TGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGAT
CAAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAA
GCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATT
GCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACCTT
GAGAAGATCAAAAACAACCTAATTATTCGAAACGAG

GAATTCGAACGATGCTGGGTAAGAACGACCCAATGTGTCTTGTTTTGGTCTT
GTTGGGATTGACTGCTTTGTTGGGTATCTGTCAAGGT**GGTACCT**CGAGCCGCG
GCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATA
GCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATT**GAG**TTTGTAGCCTTAGACATGACT
GTTTCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCCCGGTCCTGCCAGTTCC
GG

Traducción:

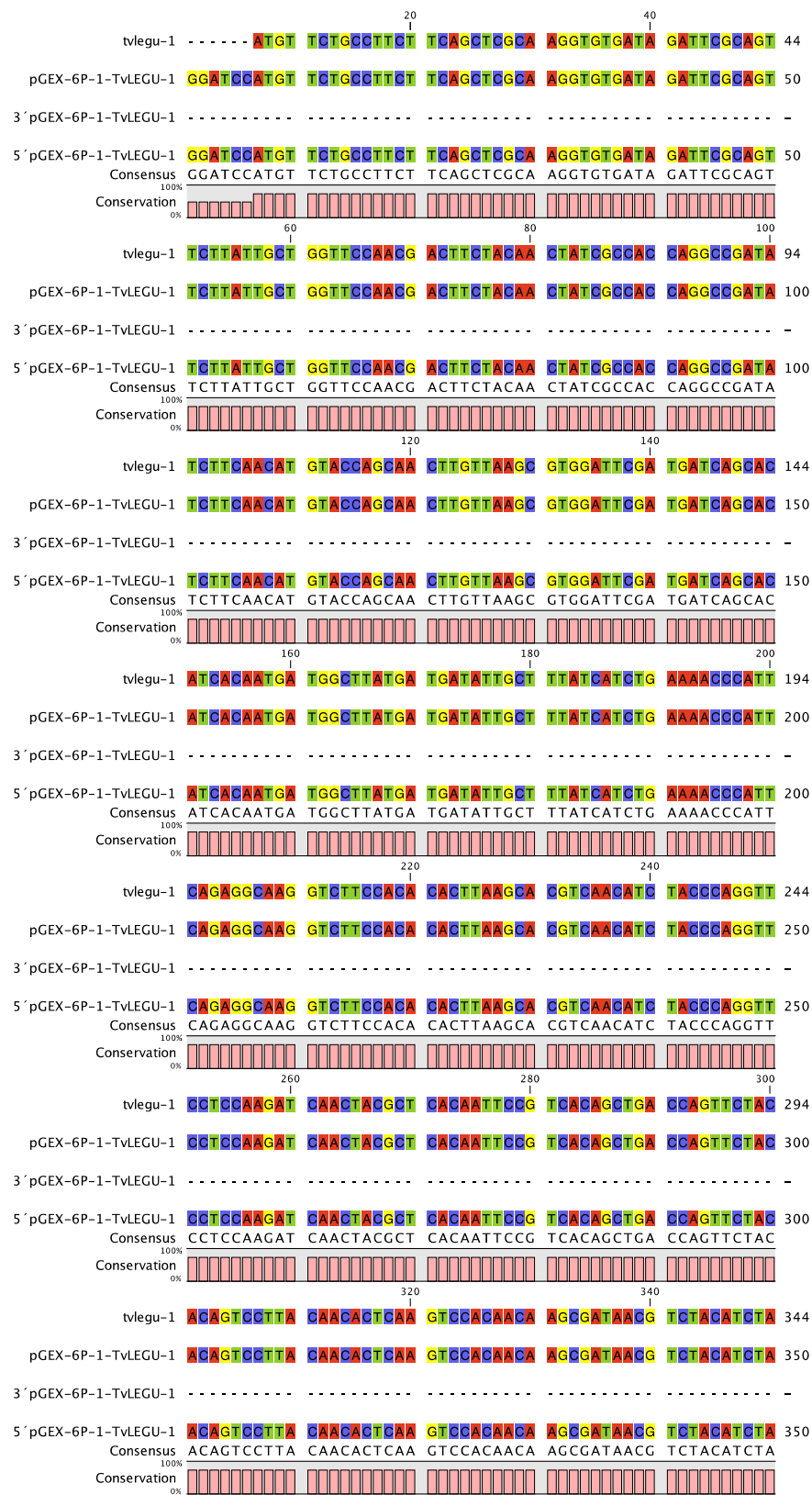
EFET**MLGKNDPMCLVLVLLGLTALLGICQGGTSSRGGRQLSRTKTHLRRGSE-**
RRRPSSS SSL

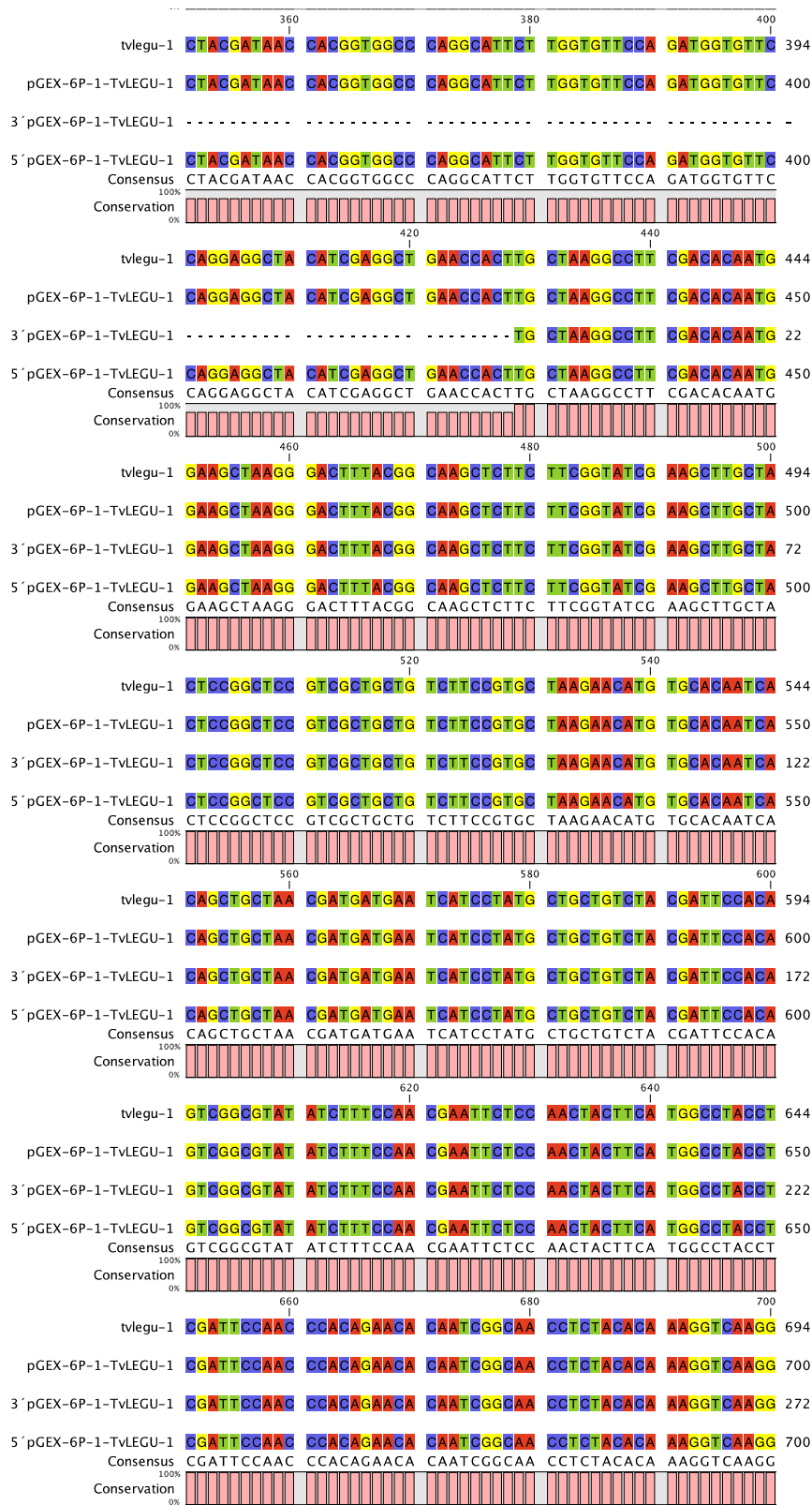
SS- Lisozima (*Gallus gallus*)

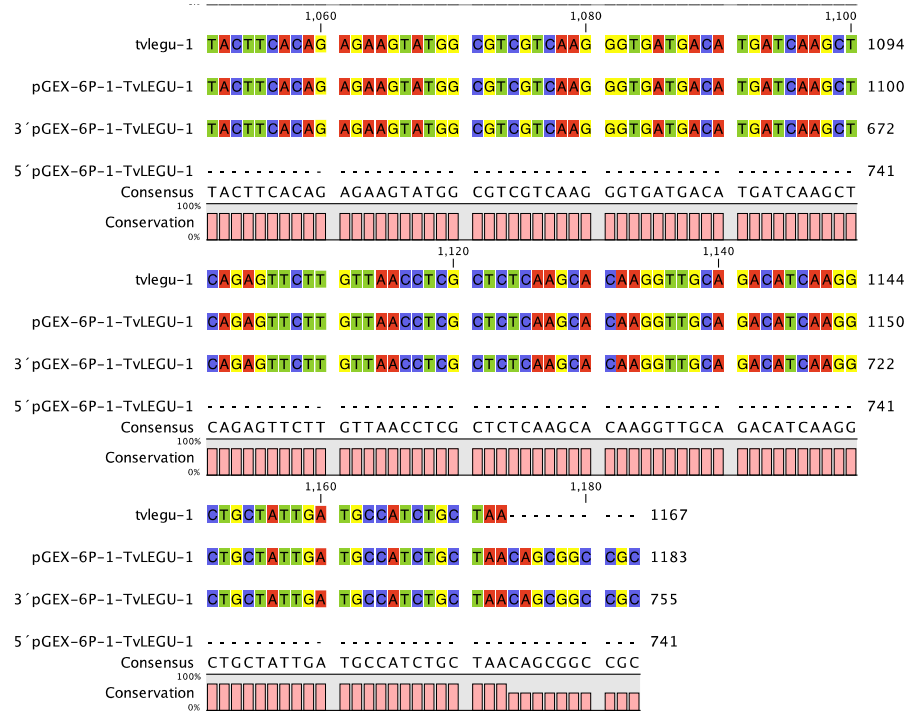
MLGKNDPMCLVLVLLGLTALLGICQG

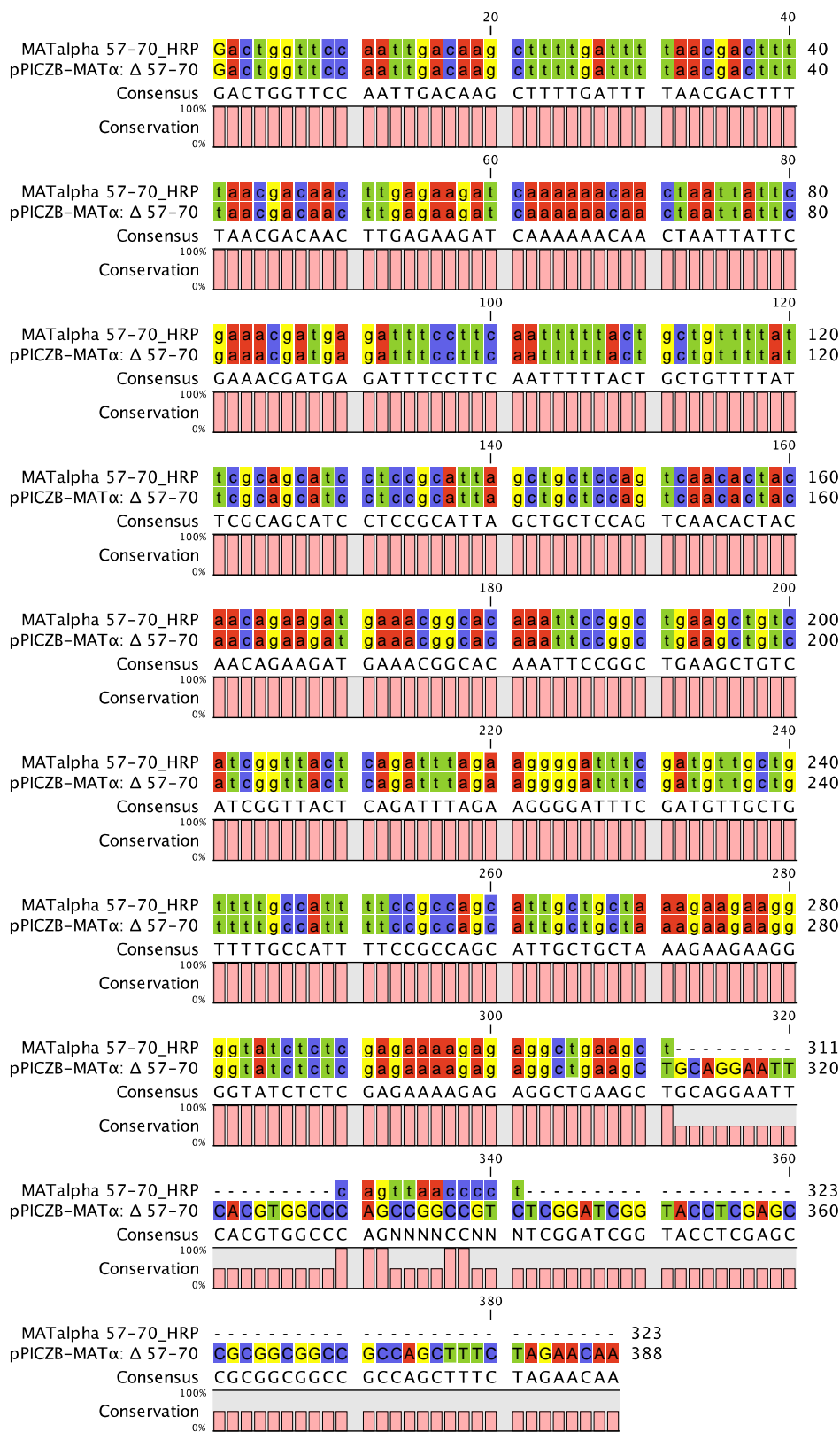
Apéndice IV: Alineamiento en bases de la secuencia del inserto de la construcción pGEX-6P-1-*tvlegu-1*

Con base en la secuencia obtenida tanto por el extremo 5' y 3' del DNA plasmídico de la construcción pGEX-6P-1-*tvlegu-1*, se realizó un alineamiento con la secuencia del gen nativo *tvlegu-1* completo que codifica para la TvLEGU-1, con el programa CLC Free Workbench. En la figura se indica la secuencia consenso de las secuencias analizadas, que corresponde al ORF del gen *tvlegu-1*.



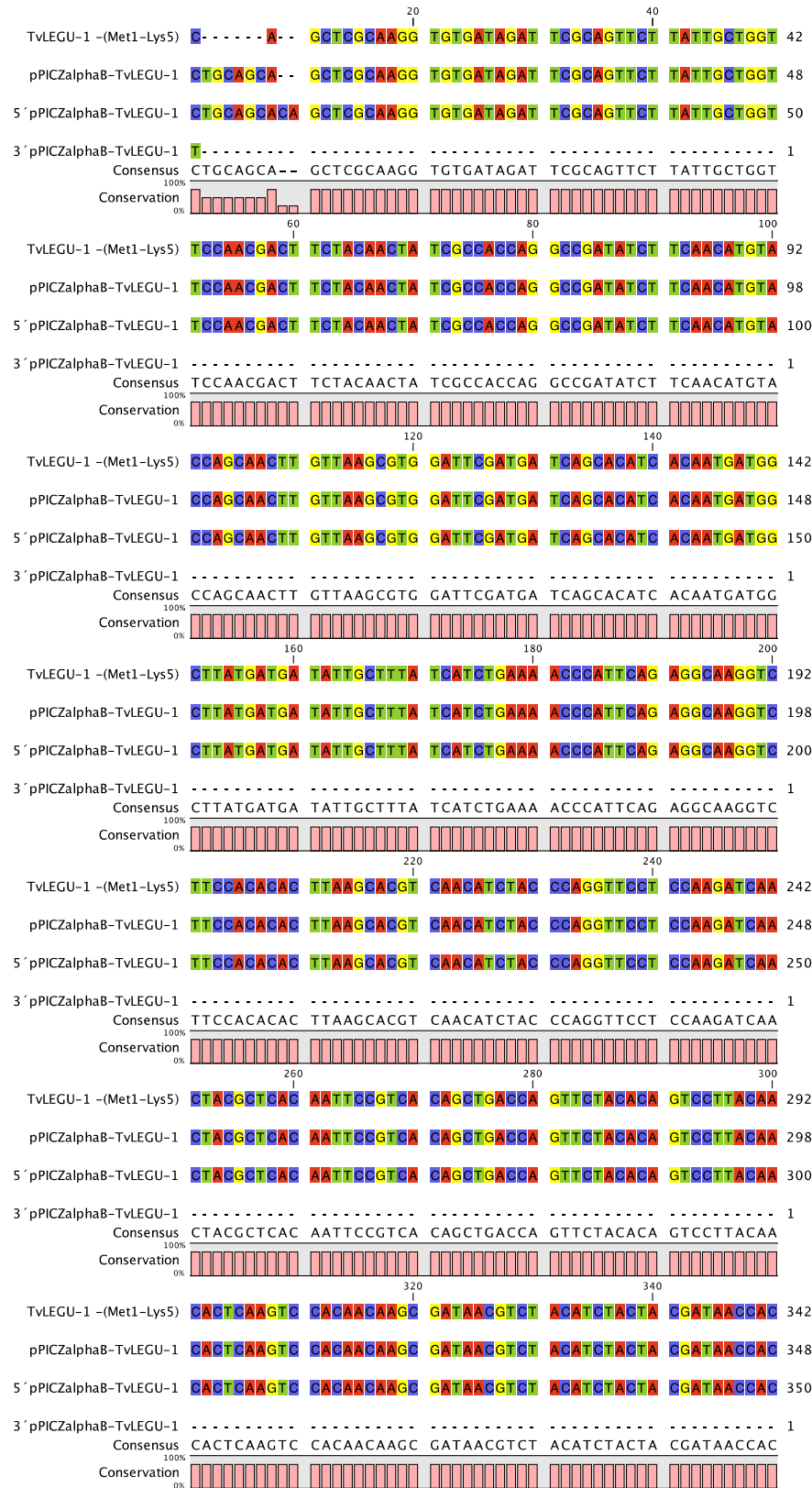


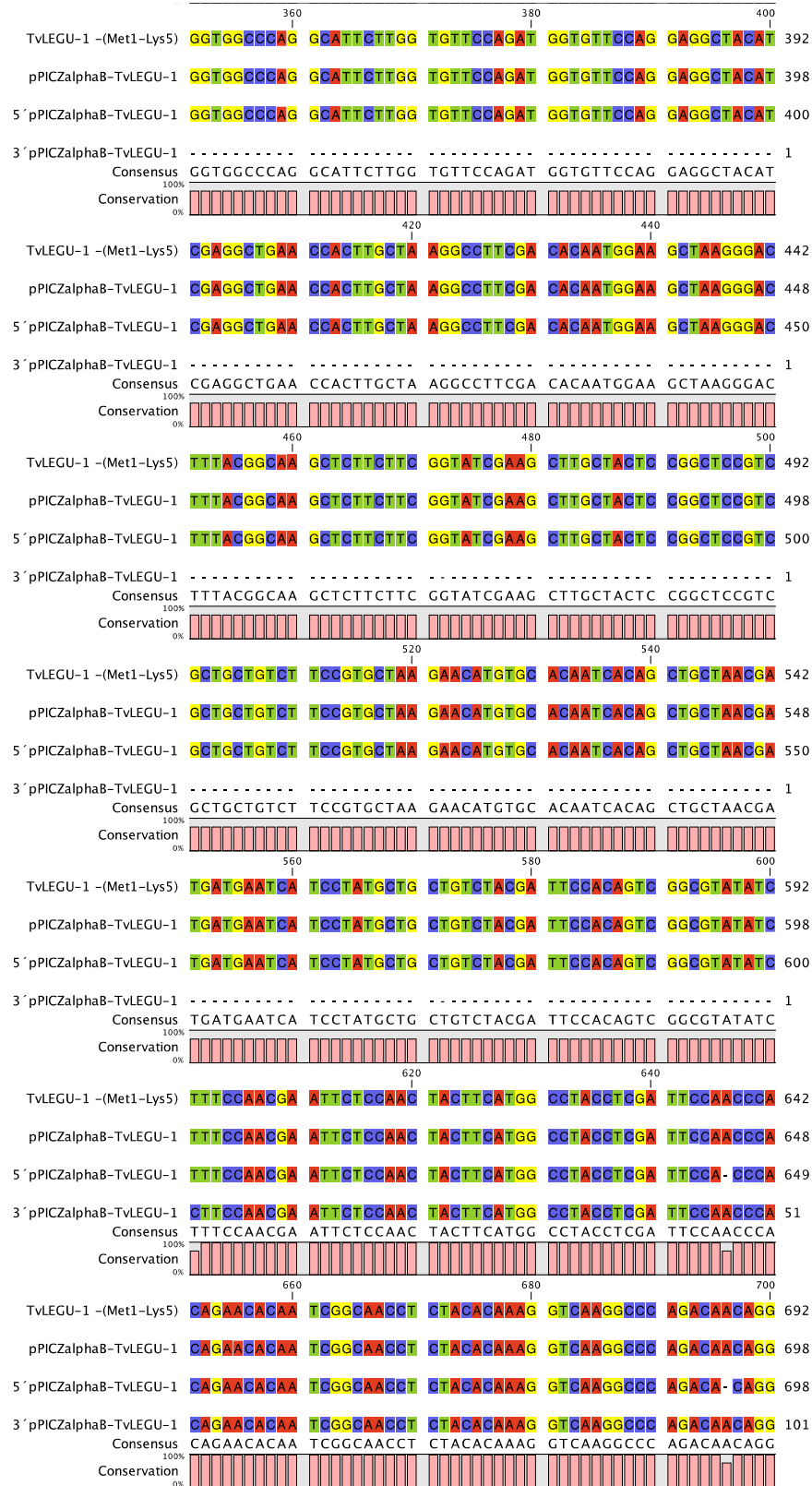


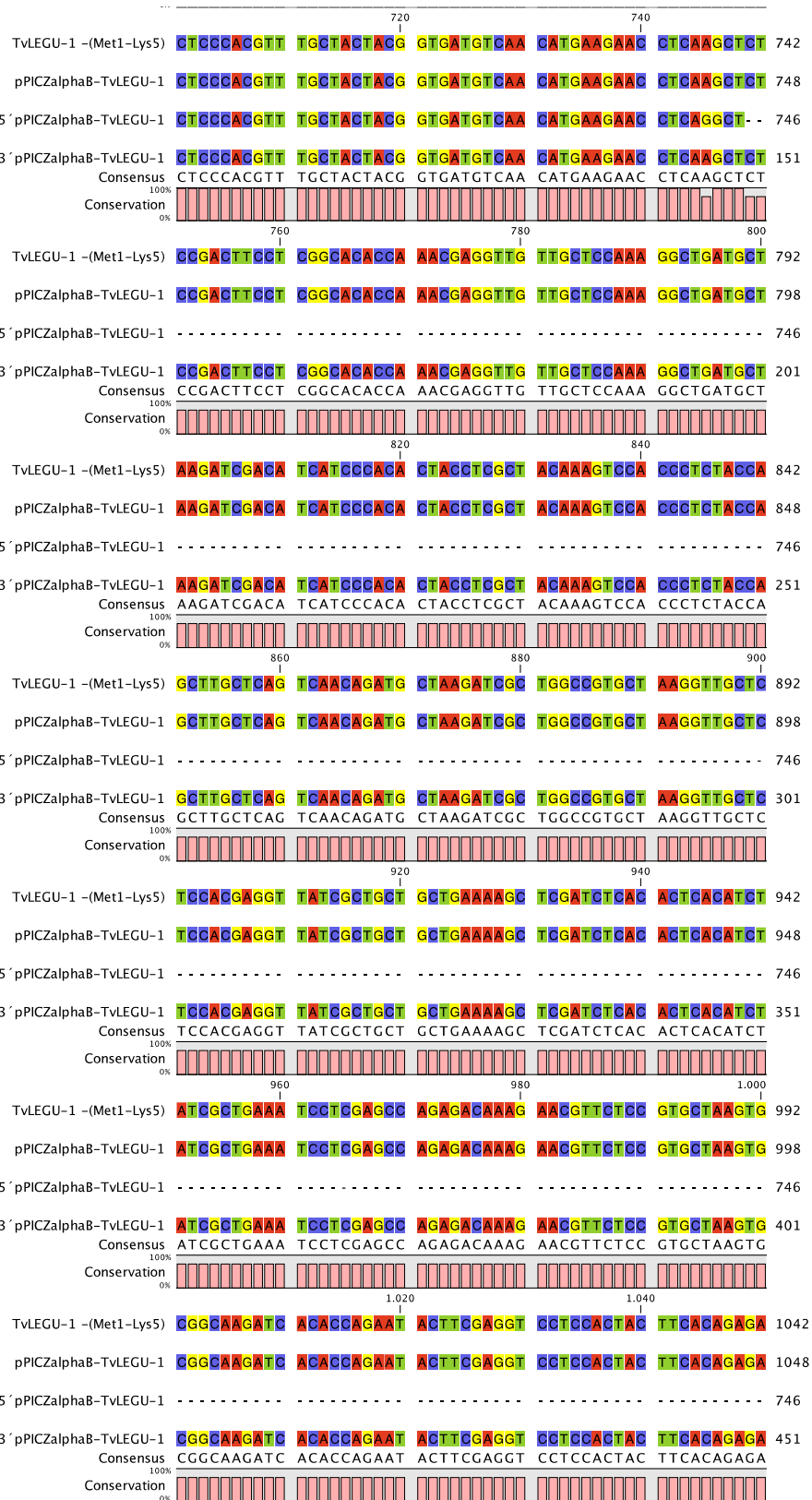


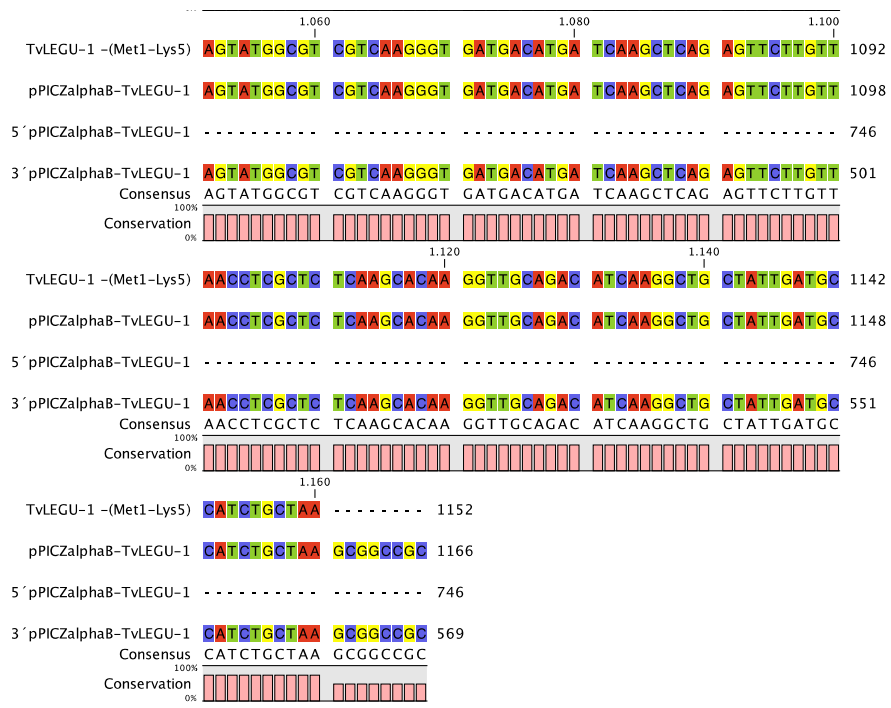
Apéndice V: Alineamiento en bases de la secuencia del inserto de la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1*

Con base en la secuencia obtenida tanto por el extremo 5' y 3' del DNA plasmídico de la construcción pPICZ α B-*tvlegu-1*, se realizó un alineamiento con la secuencia del gen nativo *tvlegu-1* sin los primeros 15 nucleótidos que codifican para los aminoácidos comprendidos entre la Met¹ y la Lys⁵ de la TvLEGU-1, con el programa CLC Free Workbench. En la figura se indica la secuencia consenso de las secuencias analizadas, que corresponde al ORF del gen nativo *tvlegu-1*.



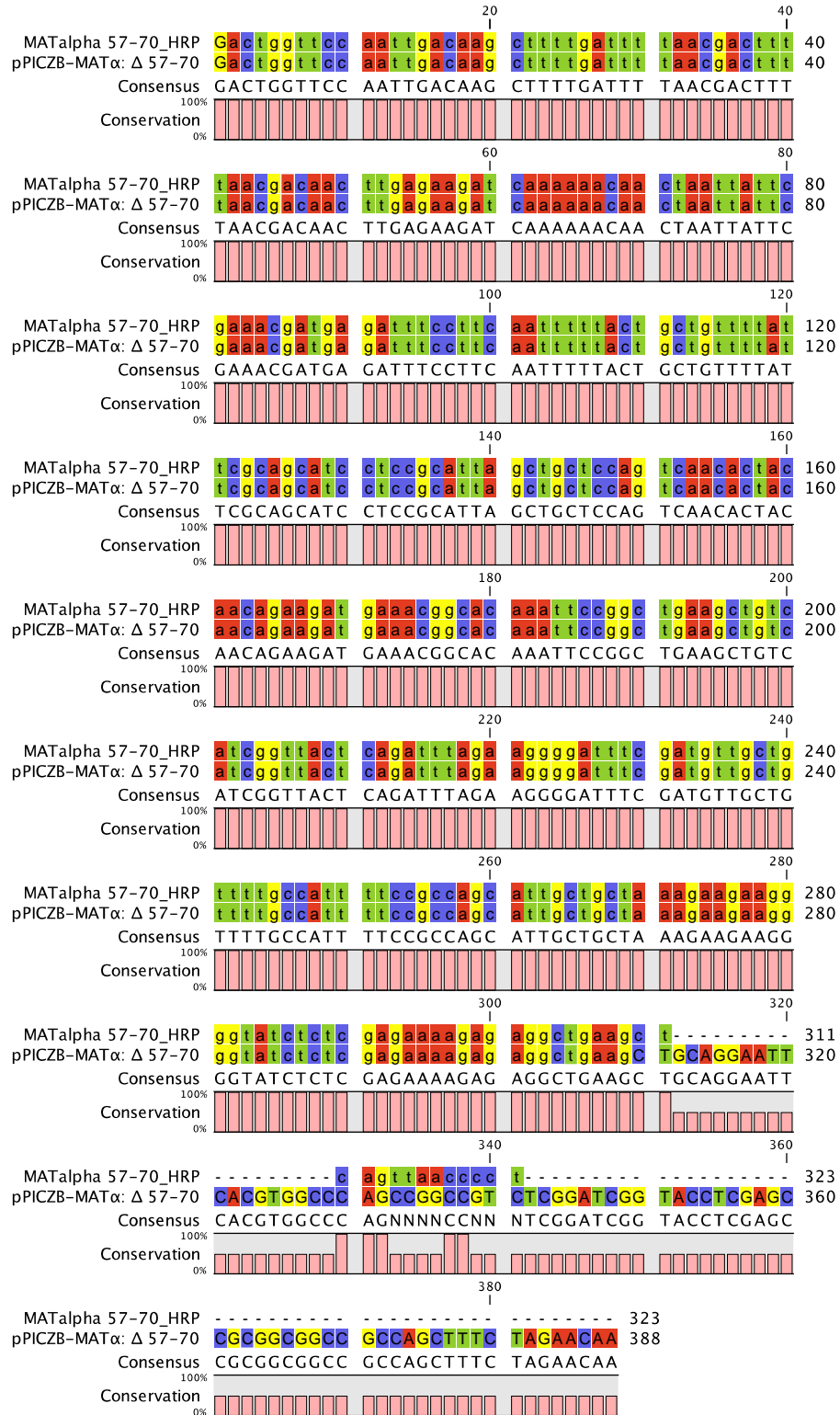






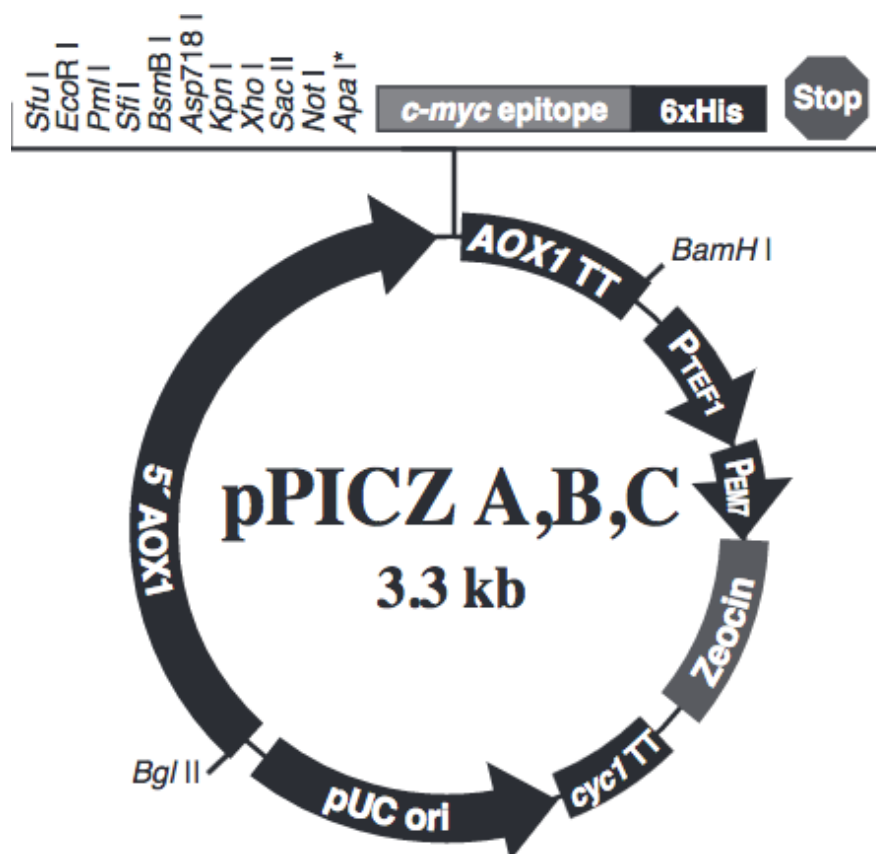
Apéndice VI: Alineamiento en bases de la secuencia del fragmento MAT α : Δ 57-70 de la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70

Con base en la secuencia obtenida tanto por el extremo 3' del DNA plasmídico de la construcción pPICZB-MAT α : Δ 57-70, se realizó un alineamiento con la secuencia del fragmento MAT α : Δ 57-70 que contiene la delección de los nucleótidos que codifican para los aminoácidos Asn⁵⁷ y la Ile⁷⁰ del α -MF de *Saccharomyces cerevisiae*. En la figura se indica la secuencia consenso de las secuencias analizadas, que corresponde al fragmento MAT α : Δ 57-70.



Apéndice VII: Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pPICZB

Panel A. Mapa del vector de expresión pPICZB (3329 pb), que muestra el sitio múltiple de clonación donde se muestran las secuencias de los sitios de restricción para las distintas enzimas, la secuencia parcial que codifica para el epítopo c-myc y la etiqueta de 6 histidinas (6x His-tag) (bases 1275-1337). Además, este vector confiere resistencia a Zeocina, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para facilitar la selección de clonas transformantes de *E. coli* y *P. pastoris*, respectivamente.



Apéndice VIII:

Comparación del gen nativo *tvlegu-1* (wt) y el gen sintético *tvlegu-1* (opt) con respecto al uso de codones de *Pichia pastoris*.

Aminoácido	Codón	Frecuencia		
		gen <i>tvlegu-1</i>		en
		wt	opt	<i>P. pastoris</i>
Alanina (Ala, A)	GCG	0	0	0.06
	GCA	3	9	0.24
	GCT	33	20	0.45
	GCC	5	12	0.24
Cisteína (Cys, C)	TGT	1	4	0.65
	TGC	6	3	0.35
Aspártico (Asp, D)	GAT	19	12	0.59
	GAC	7	14	0.41
Glutámico (Glu, E)	GAG	7	7	0.42
	GAA	9	9	0.58
Fenilalanina (Phe, F)	TTT	0	8	0.56
	TTC	17	9	0.44
Glicina (Gly, G)	GGG	0	0	0.1
	GGA	3	10	0.32
	GGT	8	14	0.43
	GGC	13	0	0.14
Histidina (His, H)	CAT	0	6	0.54
	CAC	11	5	0.46
Isoleucina (Ile, I)	ATA	0	0	0.18
	ATT	4	11	0.51
	ATC	20	13	0.31
Lisina (Lys, K)	AAG	28	13	0.53
	AAA	0	15	0.47

Leucina (Leu, L)	TTG	0	18	0.33
	TTA	1	0	0.15
	CTG	0	0	0.16
	CTA	0	0	0.12
	CTT	12	15	0.17
	CTC	20	0	0.08
Metionina (Met, M)	ATG	9	9	1

Aminoácido	Codón	<i>gen tvlegu-1</i>		Frecuencia
		wt	opt	en <i>P. pastoris</i>
Asparagina (Asn, N)	AAT	1	10	0.48
	AAC	20	11	0.52
Prolina (Pro, P)	CCG	0	0	0.1
	CCA	12	5	0.4
	CCT	0	7	0.35
	CCC	0	0	0.16
Glutamina (Gln, Q)	CAG	9	5	0.38
	CAA	1	5	0.62
Arginina (Arg, R)	AGG	1	0	0.16
	AGA	3	8	0.47
	CGG	0	0	0.05
	CGA	0	0	0.11
	CGT	4	1	0.16
	CGC	1	0	0.05
Serina (Ser, S)	AGT	0	4	0.15
	AGC	1	0	0.09
	TCG	0	0	0.09
	TCA	3	4	0.19
	TCT	2	7	0.29
	TCC	15	6	0.2
Treonina (Thr, T)	ACG	0	0	0.11
	ACA	24	7	0.25
	ACT	0	12	0.4
	ACC	1	6	0.24
Valina (Val, V)	GTG	0	0	0.2
	GTA	1	0	0.16

	GTT	13	16	0.42
	GTC	14	12	0.23
<hr/>				
Triptofano (Trp, W)	TGG	0	0	1
<hr/>				
Tirosina (Tyr, Y)	TAT	5	9	0.45
	TAC	21	17	0.55
<hr/>				
* codón de paro	TGA	0	0	0.18
	TAG	0	1	0.29
	TAA	1	0	0.53
<hr/>				

Apéndice IX:

Alineamiento de los genes *tvlegu-1* (wt) y *tvlegu-1* (opt), región optimizada en rojo.

(opt) 5' - ATGTTTTGCCTTCTTCAACTTGCTAGATGTGACAGATTGCGCGTCCTTATCGCAGGTTCC
(wt) 5' - ATGTTCTGCCTTCTTTCAGCTCGCAAGGTGTGATAGATTGCGCAGTTCTTATTGCTGGTTCC

(opt) AATGACTTTTACAACACTACAGACACCAGGCTGATATTTTTAACATGTACCAACAGTTGGTT
(wt) AACGACTTCTACAACACTATCGCCACCAGGCCGATATCTTCAACATGTACCAGCAACTTGTT

(opt) AAGAGAGGTTTTGATGACCAACATATTACTATGATGGCTTACGATGACATCGCTCTTTCT
(wt) AAGCGTGGATTTCGATGATCAGCACATCACAATGATGGCTTATGATGATATTGCTTTATCA

(opt) TCCGAAAACCCTTTTAGAGGTAAAGTTTTCCATACATTGAAACACGTCAATATCTACCCT
(wt) TCTGAAAACCCATTTCAGAGGCAAGGTCTTCCACACACTTAAGCACGTCAACATCTACCCA

(opt) GGATCAAGTAAGATCAACTATGCCATAAATTCTGTTACTGCTGATCAGTTTTACACAGTC
(wt) GGTTCCCTCCAAGATCAACTACGCTCACAATTCGTCACAGCTGACCAGTTCTACACAGTC

(opt) CTTACTACATTGAAATCTACCACTTCCGATAACGTTTTATATCTACTATGACAATCACGGT
(wt) CTTACAACACTCAAGTCCACAACAAGCGATAACGTCTACATCTACTACGATAAACCAGGT

(opt) GGACCAGGTATCCTTGGAGTTCAGATGGTGTCCCTGGTGGATACATTGAAGCAGAGCCT
(wt) GGCCCAGGCATTCTTGGTGTTCAGATGGTGTTCAGGAGGCTACATCGAGGCTGAACCA

(opt) TTGGCTAAGGCCTTTGACACTATGGAAGCTAAGGGTCTTTACGGAAAATTGTTTTTCGGT
(wt) CTTGCTAAGGCCTTCGACACAATGGAAGCTAAGGGACTTTACGGCAAGCTCTTCTTCGGT

(opt) ATTGAGGCCTGTTATTCAGGAAGTGTGCTGCCGTCTTCAGAGCTAAAAACATGTGCACT
(wt) ATCGAAGCTTGCTACTCCGGCTCCGTGCTGCTGTCTTCCGTGCTAAGAACATGTGCACA

(opt) ATCACAGCAGCTAATGATGACGAATCTTCCCTACGCCGAGTTTATGATTCCACTGTTGGT
(wt) ATCACAGCTGCTAACGATGATGAATCATCCTATGCTGCTGTCTACGATTCCACAGTCGGC

(opt) GTCTACTTGTCAAACGAGTTTTAGTAATTACTTCATGGCTTATCTTGACTCTAACCCACAA
(wt) GTATATCTTTCCAACGAATTCTCCAACACTACTTCATGGCCTACCTCGATTCCAACCCACAG

(opt) AACACCATCGGAAACTTGTACACTAAGGTTAAAGCTCAGACAACCGGTTACATGTTTGT
(wt) AACACAATCGGCAACCTCTACACAAAGGTCAAGGCCAGACAACAGGCTCCACGTTTGC

(opt) TACTATGGAGATGTCAACATGAAGAATTTGAAACTTAGTGACTTCTTGGGTACTCCAAAT
(wt) TACTACGGTGTGTCACATGAAGAACCTCAAGCTCTCCGACTTCCCTCGGCACACCAAAC

(opt) GAAGTTGTCGCTCCTAAGGCAGATGCTAAAATTGACATTATCCCTCATTACTTGGCTACA
(wt) GAGGTTGTTGCTCCAAAGGCTGATGCTAAGATCGACATCATCCACACTACCTCGCTACA

(opt) AAGTCTACCCTTTATCAATTGGCCCAGTCCACTGATGCCAAGATTGCAGGAAGAGCTAAA
(wt) AAGTCCACCCTCTACCAGCTTGCTCAGTCAACAGATGCTAAGATCGCTGGCCGTGCTAAG

(opt) GTTGCCCTTGACCGAAGTCATCGCTGCCGCAGAGAAGTTGGACCTTACCTTGACTTCTATT
(wt) GTTGCTCTCCACGAGGTTATCGCTGCTGCTGAAAAGCTCGATCTCACACTCACATCTATC

(opt) GCTGAAATCCTTGAACCAGAGACTAAAAATGTTTTGCGTGCTAAGTGCGGTAAAATCACA
(wt) GCTGAAATCCTCGAGCCAGAGACAAAGAACGTTCTCCGTGCTAAGTGCGGCAAGATCACA

(opt) CCTGAATACTTCGAGGTTTTGCACTACTTCACCGAGAAGTATGGTGTTGTCAAAGGAGAT
(wt) CCAGAATACTTCGAGGTCCCTCCACTACTTCACAGAGAAGTATGGCGTCGTCAAGGGTGAT

(opt) GACATGATCAAACCTTAGAGTTTTGGTCAATCTTGCCTTGAAGCATAAAGTCGCAGACATT
(wt) GACATGATCAAGCTCAGAGTTCTTGTTAACCTCGCTCTCAAGCACAAGGTTGCAGACATC

(opt) AAAGCAGCTATTGACGCCATTTGTTAG-3'
(wt) AAGGCTGCTATTGATGCCATCTGCTAA-3'

Apéndice X:

Secuencia optimizada (opt) del gen *tvlegu-1*: Longitud: 1181, Sitios de restricción adicionales *Kpn* I (GGTACC) y *Not*I (GCGGCCGC).

GGTACC

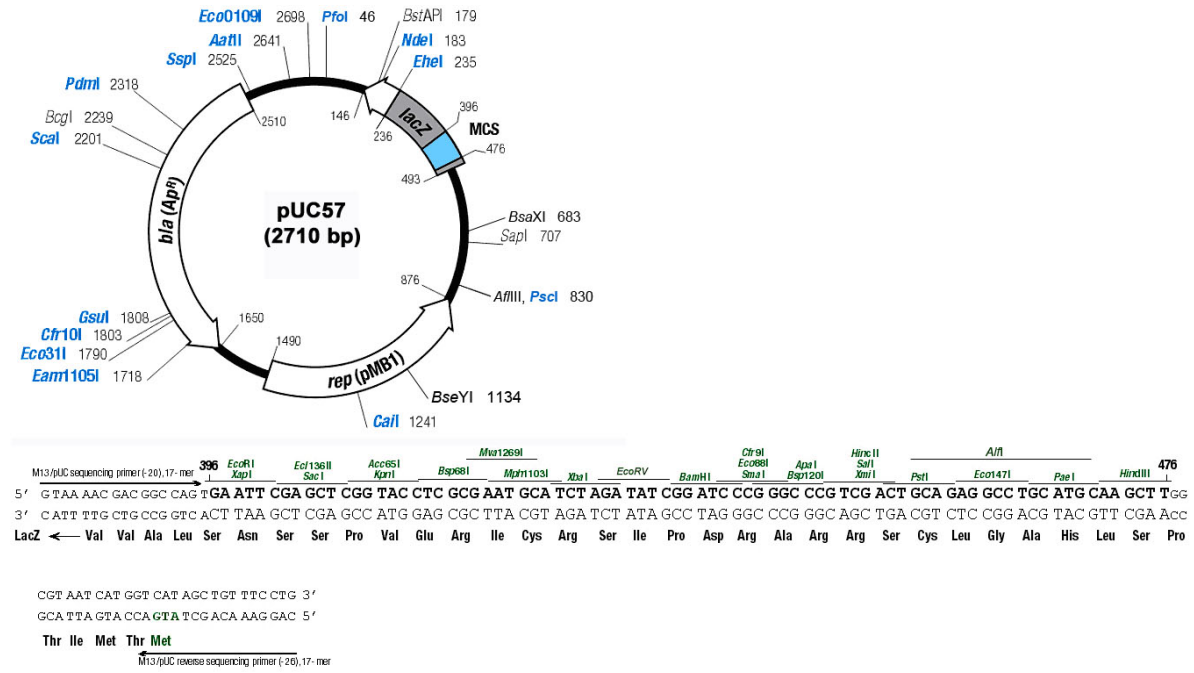
ATGTTTTGCTTCTTCAACTTGCTAGATGTGACAGATTCGCCGTCTTATCGCAGGTTCCAATGACTTTTTACA
 ACTACAGACACCAGGCTGATATTTTTAACATGTACCAACAGTTGGTTAAGAGAGGTTTTCGATGACCAACATAT
 TACTATGATGGCTTACGATGACATCGCTCTTTCTCCGAAAACCCTTTTAGAGGTAAAGTTTTCCATACATTG
 AAACACGTCAATATCTACCCTGGATCAAGTAAGATCAACTATGCCATAATTCTGTTACTGCTGATCAGTTTT
 ACACAGTCCTTACTACATTGAAATCTACCCTCCGATAACGTTTATATCTACTATGACAATCACGGTGGACC
 AGGTATCCTTGGAGTTCAGATGGTGTCCCTGGTGGATACATTGAAGCAGAGCCCTTTGGCTAAGGCCTTTGAC
 ACTATGGAAGCTAAGGGTCTTTACGGAAAATTGTTTTTCGGTATTGAGGCCCTGTTATTCAGGAAGTGTGCTG
 CCGTCTTCAGAGCTAAAAACATGTGCACTATCACAGCAGCTAATGATGACGAATCTTCCTACGCCGCAGTTTA
 TGATTCCACTGTTGGTGTCTACTTGTCAAACGAGTTTAGTAATTACTTCATGGCTTATCTTGACTCTAACCCA
 CAAAACACCATCGGAAACTTGTACACTAAGGTTAAAGCTCAGACAACCGGTTACATGTTTGTACTATGGAG
 ATGTCAACATGAAGAATTTGAAACTTAGTGACTTCTTGGGTACTCCAAATGAAGTTGTCGCTCCTAAGGCAGA
 TGCTAAAATTGACATTATCCCTCATTACTTGGCTACAAAGTCTACCCTTTATCAATTGGCCCAGTCCACTGAT
 GCCAAGATTGCAGGAAGAGCTAAAGTTGCCTTGCACGAAGTCATCGCTGCCGCAGAGAAGTTGGACCTTACCT
 TGACTTCTATTGCTGAAATCCTTGAACCAGAGACTAAAAATGTTTTGCGTGCTAAGTGCAGGTAATAACACACC
 TGAATACTTCGAGGTTTTGCACTACTTCACCGAGAAGTATGGTGTGTCAAAGGAGATGACATGATCAAACCTT
 AGAGTTTTGGTCAATCTTGCCTTGAAGCATAAAGTCGCAGACATTAAGCAGCTATTGACGCCATTTGTTAG
GCGGCCGC

Eliminación de sitios de restricción en el gen *tvlegu-1* (opt)

Enzimas de restricción	Secuencia	<i>tvlegu-1</i>	
		(opt)	(wt)
<i>Hind</i> III	(AAGCTT)	0	1 (491)
<i>Bsa</i> I	(GGTCTCN)	0	0
<i>Nde</i> I	(CATATG)	0	0
<i>Kpn</i> I	(GGTACC)	0	0
<i>Xho</i> I	(CTCGAG)	0	1(976)
<i>Sac</i> I	(GAGCTC)	0	0
<i>Eco</i> RI	(GAATTC)	0	1(622)
<i>Eco</i> RV	(GATATC)	0	1(97)
<i>Xba</i> I	(TCTAGA)	0	0
<i>Pst</i> I	(CTGCAG)	0	0

Apéndice XI:

Mapa del Vector de clonación para *E. coli* pUC57 (2710 pb).



BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Alim M, Tsuji N, Miyoshi T, Khyrul Islam M, Huang X, Motobu M, Fujisaki K (2007) Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* *Insect Biochem Mol Biol* 37:911-922 doi:10.1016/j.ibmb.2007.04.010
- Abe Y, Shirane K, Yokosawa H, Matsushita H, Mitta M, Kato I, Ishii S (1993) Asparaginyl endopeptidase of jack bean seeds. Purification, characterization, and high utility in protein sequence analysis *J Biol Chem* 268:3525-3529
- Adisakwattana P, Viyanant V, Chaicumpa W, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Sobhon P, Grams R (2007) Comparative molecular analysis of two asparaginyl endopeptidases and encoding genes from *Fasciola gigantica* *Mol Biochem Parasitol* 156:102-116 doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.006
- Alderete JF, Arroyo R, Lehker MW (1995a) Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis* *Methods Enzymol* 253:407-414
- Alderete JF, Garza GE (1985) Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces *Infect Immun* 50:701-708
- Alderete JF, O'Brien JL, Arroyo R, Engbring JA, Musatovova O, Lopez O, Lauriano C, Nguyen J (1995b) Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence *Mol Microbiol* 17:69-83
- Allison DS, Young ET (1989) Mutations in the signal sequence of prepro-alpha-factor inhibit both translocation into the endoplasmic reticulum and processing by signal peptidase in yeast cells *Mol Cell Biol* 9:4977-4985
- Alvarez-Sanchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Ortega-Lopez J, Arroyo R (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity *Microb Pathog* 28:193-202 doi:10.1006/mpat.1999.0336
- Aravind L, Koonin EV (2002) Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins *Proteins* 46:355-367
- Argos P (1987) A sensitive procedure to compare amino acid sequences *J Mol Biol* 193:385-396
- Arroyo R, Alderete JF (1989) *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells *Infect Immun* 57:2991-2997
- Arroyo R, Alderete JF (1995) Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity *Arch Med Res* 26:279-285
- Arroyo R, Cardenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O, Ortega-Lopez J (2015) *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity *Biomed Res Int* 2015:946787 doi:10.1155/2015/946787
- Arroyo R, González-Robles A, Martínez-Palomo A, Alderete J (1993) Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence *Molecular microbiology* 7:299-309

- Asgian JL, James KE, Li ZZ, Carter W, Barrett AJ, Mikolajczyk J, Salvesen GS, Powers JC (2002) Aza-peptide epoxides: a new class of inhibitors selective for clan CD cysteine proteases *J Med Chem* 45:4958-4960
- Banda CI, Joseph K, Secor EW, Jones LA, Igietseme JU, Sautter RL, Hammerschlag MR, Fajman NN, Girardet RG, Black CM (2013) Development of PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in urine specimens *Journal of clinical microbiology* 51:1298-1300
- Bannister SJ, Wittrup KD (2000) Glutathione excretion in response to heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae* *Biotechnol Bioeng* 68:389-395
- Barrett AJ (1994) Classification of peptidases *Methods Enzymol* 244:1-15
- Barrett AJ, Rawlings ND (2001) Evolutionary lines of cysteine peptidases *Biol Chem* 382:727-733 doi:10.1515/BC.2001.088
- Beard CM, Noller KL, O'Fallon WM, Kurland LT, Dockerty MB (1979) Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole *N Engl J Med* 301:519-522
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 *J Mol Biol* 340:783-795 doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028
- Biochemistry IUo, Committee MBN, Webb EC (1992) Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press,
- Bozner P, Demes P (1991) Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type *Parasitology* 102 Pt 1:113-115
- Bozner P, Gombosova A, Valent M, Demes P, Alderete JF (1992) Proteinases of *Trichomonas vaginalis*: antibody response in patients with urogenital trichomoniasis *Parasitology* 105 (Pt 3):387-391
- Brady CP, Shimp RL, Miles AP, Whitmore M, Stowers AW (2001) High-level production and purification of P30P2MSP1(19), an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris* *Protein Expr Purif* 23:468-475 doi:10.1006/prev.2001.1526
- Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, Heberlein UA, Masiarz FR, Mullenbach GT, Urdea MS, Valenzuela P, Barr PJ (1984) Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae* *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4642-4646
- Brosius J, Erfle M, Storella J (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity *J Biol Chem* 260:3539-3541
- Brugerolle G (1971) [Demonstration of the endocytosis process and lysosome structures in *Trichomonas vaginalis*] *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 272:2558-2560
- Calla-Choque JS, Figueroa-Angulo EE, Avila-Gonzalez L, Arroyo R (2014) alpha -Actinin TvACTN3 of *Trichomonas vaginalis* is an RNA-binding protein that could participate in its posttranscriptional iron regulatory mechanism *Biomed Res Int* 2014:424767 doi:10.1155/2014/424767
- Camara E, Albiol J, Ferrer P (2016) Droplet digital PCR-aided screening and characterization of *Pichia pastoris* multiple gene copy strains *Biotechnol Bioeng* 113:1542-1551 doi:10.1002/bit.25916
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG,

- Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Muller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Pertea M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM, Jr., Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis* Science 315:207-212 doi:10.1126/science.1132894
- Cavener DR, Ray SC (1991) Eukaryotic start and stop translation sites Nucleic Acids Res 19:3185-3192
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* Curr Opin Biotechnol 13:329-332
- Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* FEMS Microbiol Rev 24:45-66
- Chang CN, Matteucci M, Perry LJ, Wulf JJ, Chen CY, Hitzeman RA (1986) *Saccharomyces cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides Mol Cell Biol 6:1812-1819
- Chaudhuri B, Steube K, Stephan C (1992) The pro-region of the yeast prepro-alpha-factor is essential for membrane translocation of human insulin-like growth factor 1 in vivo Eur J Biochem 206:793-800
- Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C, Barrett AJ (1997) Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase J Biol Chem 272:8090-8098
- Chen JM, Rawlings ND, Stevens RA, Barrett AJ (1998) Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases FEBS Lett 441:361-365
- Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA (1991) Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies Gene 105:205-212
- Connor TH, Stoeckel M, Evrard J, Legator MS (1977) The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice Cancer research 37:629-633
- Cosar C, Julou L (1959) [The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections.] Ann Inst Pasteur (Paris) 96:238-241
- Csoma C, Polgar L (1984) Proteinase from germinating bean cotyledons. Evidence for involvement of a thiol group in catalysis Biochem J 222:769-776
- Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE (2004) Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* Clinical microbiology reviews 17:783-793
- Cunnington M, Kortsalioudaki C, Heath P (2013) Genitourinary pathogens and preterm birth Current opinion in infectious diseases 26:219-230

- Dailey DC, Chang TH, Alderete JF (1990) Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis *Parasitology* 101 Pt 2:171-175
- Dall E, Brandstetter H (2012) Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context- and substrate-dependent activity profile *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68:24-31 doi:10.1107/S1744309111048020
- Dall E, Brandstetter H (2013) Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10940-10945 doi:10.1073/pnas.1300686110
- Dall E, Brandstetter H (2016) Structure and function of legumain in health and disease *Biochimie* 122:126-150 doi:10.1016/j.biochi.2015.09.022
- Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production *Appl Microbiol Biotechnol* 93:31-39 doi:10.1007/s00253-011-3654-z
- Davis AH, Nanduri J, Watson DC (1987) Cloning and gene expression of *Schistosoma mansoni* protease *J Biol Chem* 262:12851-12855
- Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG (1999) New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli* *Biotechnol Bioeng* 65:382-388
- De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouze P, Van de Peer Y, Callewaert N (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris* *Nat Biotechnol* 27:561-566 doi:10.1038/nbt.1544
- Demuth HU (1990) Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases *J Enzyme Inhib* 3:249-278
- Despommier DD, Gwadz RW, Hotez PJ (1995) *Trichomonas vaginalis* (Donne 1836). In: *Parasitic Diseases*. Springer New York, New York, NY, pp 140-143. doi:10.1007/978-1-4612-2476-1_23
- Donné MA (1836) Animacules observes dans les matieres purulentes et le produit des secretions des organes genitaux de l'homme et de la femme *CR Acad Sci* 3:385-386
- Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Altmann F, Ferrer P, Mattanovich D (2009) The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris* *J Proteome Res* 8:1380-1392 doi:10.1021/pr8007623
- Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L (2004) The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3) *Protein Expr Purif* 37:203-206 doi:10.1016/j.pep.2004.04.025
- Edwards DI, Thompson EJ, Tomusange J, Shanson D (1979) Inactivation of metronidazole by aerobic organisms *J Antimicrob Chemother* 5:315-316
- Eiden-Plach A, Zagorc T, Heintel T, Carius Y, Breinig F, Schmitt MJ (2004) Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe* *Appl Environ Microbiol* 70:961-966
- EMD Biosciences I (2003) pET System Manual, 10th Edition Rev. B 0403 edn.,
- Esposito D, Chatterjee DK (2006) Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags *Curr Opin Biotechnol* 17:353-358 doi:10.1016/j.copbio.2006.06.003

- Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E (1995) The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions *Trends Biochem Sci* 20:342-344
- Fierobe HP, Mirgorodskaya E, Frandsen TP, Roepstorff P, Svensson B (1997) Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-type and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts *Protein Expr Purif* 9:159-170
doi:10.1006/prep.1996.0689
- Fouts AC, Kraus SJ (1980) *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis *J Infect Dis* 141:137-143
- Furlong J, Meighan M, Conner J, Murray J, Clements JB (1992) Methods for improved protein expression using pET vectors *Nucleic Acids Res* 20:4668
- Garber G, Proctor E, Bowie W (1986) Immunogenic proteins of *Trichomonas vaginalis* as demonstrated by the immunoblot technique *Infection and immunity* 51:250-253
- Garber GE, Sibau L, Ma R, Proctor EM, Shaw CE, Bowie WR (1987) Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis* *J Clin Microbiol* 25:1275-1279
- Gasser B, Maurer M, Rautio J, Sauer M, Bhattacharyya A, Saloheimo M, Penttila M, Mattanovich D (2007) Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions *BMC Genomics* 8:179 doi:10.1186/1471-2164-8-179
- Gotz MG, James KE, Hansell E, Dvorak J, Seshadri A, Sojka D, Kopacek P, McKerrow JH, Caffrey CR, Powers JC (2008) Aza-peptidyl Michael acceptors. A new class of potent and selective inhibitors of asparaginyl endopeptidases (legumains) from evolutionarily diverse pathogens *J Med Chem* 51:2816-2832
doi:10.1021/jm701311r
- Goulas T, Cuppari A, Garcia-Castellanos R, Snipas S, Glockshuber R, Arolas JL, Gomis-Rüth FX (2014) The pCri system: a vector collection for recombinant protein expression and purification *PloS one* 9:e112643
- Gupta R, Jung, E., and Brunak, S. (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins unpublished
- Han Q, Liu J, Wang T, Xiao H, Fang Z (2004) [Influence of the metabolite produced by *Trichomonas vaginalis* on human sperm motility in vitro] *Zhonghua Nan Ke Xue* 10:272-274
- Hartley BS (1960) Proteolytic enzymes *Annu Rev Biochem* 29:45-72
doi:10.1146/annurev.bi.29.070160.000401
- Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, Hara-Nishimura I (2015) Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death *Front Plant Sci* 6:234
doi:10.3389/fpls.2015.00234
- Heath JP (1981) Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures: a study by light and scanning electron microscopy *Br J Vener Dis* 57:106-117
- Heiss S, Puxbaum V, Gruber C, Altmann F, Mattanovich D, Gasser B (2015) Multistep processing of the secretion leader of the extracellular protein Epx1 in *Pichia pastoris* and implications for protein localization *Microbiology* 161:1356-1368
doi:10.1099/mic.0.000105

- Hellwig S, Robin F, Drossard J, Raven NP, Vaquero-Martin C, Shively JE, Fischer R (1999) Production of carcinoembryonic antigen (CEA) N-A3 domain in *Pichia pastoris* by fermentation *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 3):267-275
- Heyworth PG, Gutteridge WE, Ginger CD (1982) Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis* *FEBS Lett* 141:106-110
- Hohenblum H, Borth N, Mattanovich D (2003) Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry *J Biotechnol* 102:281-290
- Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D (2004a) Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris* *Biotechnology and Bioengineering* 85:367-375 doi:Doi 10.1002/Bit.10904
- Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D (2004b) Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris* *Biotechnol Bioeng* 85:367-375 doi:10.1002/bit.10904
- Hong F, Meinander NQ, Jonsson LJ (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris* *Biotechnol Bioeng* 79:438-449 doi:10.1002/bit.10297
- Honigberg BM, King VM (1964) Structure of *Trichomonas Vaginalis* *Donn'e J Parasitol* 50:345-364
- Hossler P (2012) Protein glycosylation control in mammalian cell culture: past precedents and contemporary prospects *Adv Biochem Eng Biotechnol* 127:187-219 doi:10.1007/10_2011_113
- Hulka BS, Hulka JF (1967) Dyskaryosis in cervical cytology and its relationship to trichomoniasis therapy. A double blind study *Am J Obstet Gynecol* 98:180-187
- Hunter S, Jones P, Mitchell A, Apweiler R, Attwood TK, Bateman A, Bernard T, Binns D, Bork P, Burge S, de Castro E, Coggill P, Corbett M, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Fraser M, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn D, Kelly E, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, McMenamin C, Mi H, Mutowo-Muellenet P, Mulder N, Natale D, Orengo C, Pesseat S, Punta M, Quinn AF, Rivoire C, Sangrador-Vegas A, Selengut JD, Sigrist CJ, Scheremetjew M, Tate J, Thimmajananathan M, Thomas PD, Wu CH, Yeats C, Yong SY (2012) InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database *Nucleic Acids Res* 40:D306-312 doi:10.1093/nar/gkr948
- Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, Meagher MM (2006) Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase *Biotechnol Bioeng* 93:771-778 doi:10.1002/bit.20762
- Ingham HR, Hall CJ, Sisson PR, Tharagonnet D, Selkon JB (1979) Inactivation of metronidazole by aerobic organisms *J Antimicrob Chemother* 5:734-735
- Invitrogen (March 2009) EasySelect *Pichia* Expression Kit User Manual; For expression of recombinant Proteins Using pPICZ in *Pichia Pastoris*
- Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors SO (2003) Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures *Microb Cell Fact* 2:6 doi:10.1186/1475-2859-2-6
- Jarecki-Black JC, Lushbaugh WB, Golosov L, Glassman AB (1988) *Trichomonas vaginalis*: preliminary characterization of a sperm motility inhibiting factor *Ann Clin Lab Sci* 18:484-489

- Jigami Y, Muraki M, Harada N, Tanaka H (1986) Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing *Gene* 43:273-279
- Jirovec O, Petru M (1968) *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis *Adv Parasitol* 6:117-188
- Johansen HT, Knight CG, Barrett AJ (1999) Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis *Anal Biochem* 273:278-283 doi:10.1006/abio.1999.4221
- Julian I, Gandullo J, Santos-Silva LK, Diaz I, Martinez M (2013) Phylogenetically distant barley legumains have a role in both seed and vegetative tissues *J Exp Bot* 64:2929-2941 doi:10.1093/jxb/ert132
- Kamphuis IG, Drenth J, Baker EN (1985) Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain *J Mol Biol* 182:317-329
- Kang HA, Nam SW, Kwon KS, Chung BH, Yu MH (1996) High-level secretion of human alpha 1-antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence *J Biotechnol* 48:15-24
- Kapust RB, Waugh DS (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused *Protein Sci* 8:1668-1674 doi:10.1110/ps.8.8.1668
- Kauffman KJ, Pridgen EM, Doyle FJ, Dhurjati PS, Robinson AS (2002) Decreased protein expression and intermittent recoveries in BiP levels result from cellular stress during heterologous protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* *Biotechnology progress* 18:942-950
- Kissinger P, Adamski A (2013) Trichomoniasis and HIV interactions: a review *Sexually transmitted infections:sextrans-2012-051005*
- Klemba M, Goldberg DE (2002) Biological roles of proteases in parasitic protozoa *Annu Rev Biochem* 71:275-305 doi:10.1146/annurev.biochem.71.090501.145453
- Klinkert MQ, Felleisen R, Link G, Ruppel A, Beck E (1989) Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases *Mol Biochem Parasitol* 33:113-122
- Knaust R, Eshaghi, S., Dian, C., Lundgren, S., Anzai, K., Nordlund, P., and Brise, D. (2000) An efficient and rapid protein purification and on-column cleavage strategy using GStrap Columns. GE life sciences,
- Kottmeier K, Ostermann K, Bley T, Rodel G (2011) Hydrophobin signal sequence mediates efficient secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris* *Appl Microbiol Biotechnol* 91:133-141 doi:10.1007/s00253-011-3246-y
- Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes *Gene* 234:187-208
- Krieger JN (1981) Urologic aspects of trichomoniasis *Invest Urol* 18:411-417
- Krieger JN, Holmes KK, Spence MR, Rein MF, McCormack WM, Tam MR (1985) Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and the indirect immunofluorescence technique *Journal of Infectious Diseases* 152:979-984
- Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A (1993) In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis* *J Eukaryot Microbiol* 40:262-269

- Kurjan J, Herskowitz I (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor *Cell* 30:933-943
- Kurth A, Whittington WL, Golden MR, Thomas KK, Holmes KK, Schwebke JR (2004) Performance of a new, rapid assay for detection of *Trichomonas vaginalis* *J Clin Microbiol* 42:2940-2943
- Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, Goeman J, Behets F, Batter V, Alary M, et al. (1993) Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study *Aids* 7:95-102
- Laha T, Sripa J, Sripa B, Pearson M, Tribolet L, Kaewkes S, Sithithaworn P, Brindley PJ, Loukas A (2008) Asparaginyl endopeptidase from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, and its potential for serodiagnosis *Int J Infect Dis* 12:e49-59 doi:10.1016/j.ijid.2008.03.033
- Leon-Felix J, Ortega-Lopez J, Orozco-Solis R, Arroyo R (2004) Two novel asparaginyl endopeptidase-like cysteine proteinases from the protist *Trichomonas vaginalis*: their evolutionary relationship within the clan CD cysteine proteinases *Gene* 335:25-35 doi:10.1016/j.gene.2004.03.002
- Leung D, Abbenante G, Fairlie DP (2000) Protease inhibitors: current status and future prospects *J Med Chem* 43:305-341
- Levene PA (1905) The cleavage products of proteoses. *Journal of Biological Chemistry* 1:45-58
- Levett PN (1980) A comparison of five methods for the detection of *Trichomonas vaginalis* in clinical specimens *Med Lab Sci* 37:85-88
- Li DN, Matthews SP, Antoniou AN, Mazzeo D, Watts C (2003) Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo *J Biol Chem* 278:38980-38990 doi:10.1074/jbc.M305930200
- Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Duzgunes N, Renugopalakrishnan V (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris* *Appl Biochem Biotechnol* 142:105-124
- Li S, Sing S, Wang Z (2011) Improved expression of *Rhizopus oryzae* alpha-amylase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* *Protein Expr Purif* 79:142-148 doi:10.1016/j.pep.2011.05.007
- Li Z, Xiong F, Lin Q, d'Anjou M, Daugulis AJ, Yang DS, Hew CL (2001) Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris* *Protein Expr Purif* 21:438-445 doi:10.1006/prep.2001.1395
- Liang S, Li C, Ye Y, Lin Y (2013) Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris* *Biotechnol Lett* 35:97-105 doi:10.1007/s10529-012-1055-8
- Liebman JM, LaSala D, Wang W, Steed PM (1999) When less is more: enhanced baculovirus production of recombinant proteins at very low multiplicities of infection *Biotechniques* 26:36-38, 40, 42
- Lin-Cereghino GP, Stark CM, Kim D, Chang J, Shaheen N, Poerwanto H, Agari K, Moua P, Low LK, Tran N, Huang AD, Nattestad M, Oshiro KT, Chang JW, Chavan A, Tsai JW, Lin-Cereghino J (2013) The effect of alpha-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris* *Gene* 519:311-317 doi:10.1016/j.gene.2013.01.062

- Linder S, Schliwa M, Kube-Granderath E (1996) Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones *Biotechniques* 20:980-982
- Liu YY, Woo JH, Neville DM (2003) Targeted introduction of a diphtheria toxin resistant mutation into the chromosomal EF-2 locus of *Pichia pastoris* and expression of immunotoxin in the EF-2 mutants *Protein Expr Purif* 30:262-274
- Liu YY, Woo JH, Neville DM, Jr. (2005) Overexpression of an anti-CD3 immunotoxin increases expression and secretion of molecular chaperone BiP/Kar2p by *Pichia pastoris* *Appl Environ Microbiol* 71:5332-5340 doi:10.1128/AEM.71.9.5332-5340.2005
- Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M (2012) SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm *Microb Cell Fact* 11:56 doi:10.1186/1475-2859-11-56
- Lossick JG, Kent HL (1991) Trichomoniasis: trends in diagnosis and management *Am J Obstet Gynecol* 165:1217-1222
- Lumsden WH, Harrison C, Robertson DH (1988a) Treatment failure in *Trichomonas vaginalis* infections in females. II. In-vitro estimation of the sensitivity of the organism to metronidazole *J Antimicrob Chemother* 21:555-564
- Lumsden WH, Robertson DH, Heyworth R, Harrison C (1988b) Treatment failure in *Trichomonas vaginalis* vaginitis *Genitourin Med* 64:217-218
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system *Yeast* 22:249-270 doi:10.1002/yea.1208
- Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT, Gaydos CA (1998) Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swab Samples *Journal of clinical microbiology* 36:3205-3210
- Magnus M, Clark R, Myers L, Farley T, Kissinger PJ (2003) *Trichomonas vaginalis* among HIV-Infected women: are immune status or protease inhibitor use associated with subsequent *T. vaginalis* positivity? *Sex Transm Dis* 30:839-843
- Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* *Microbiol Rev* 60:512-538
- Martin RD, R. H. Kaufman, and M. Burns. (1963) *Trichomonas vaginalis*: a statistical evaluation of diagnostic methods. *Am J Obstet Gynecol* 87
- Mason PR, Gregson S, Gwanzura L, Cappuccinelli P, Rapelli P, Fiori PL (2001) Enzyme immunoassay for urogenital trichomoniasis as a marker of unsafe sexual behaviour *Epidemiol Infect* 126:103-109
- Mattanovich D, Gasser B, Hohenblum H, Sauer M (2004) Stress in recombinant protein producing yeasts *J Biotechnol* 113:121-135 doi:10.1016/j.jbiotec.2004.04.035
- McCann JS (1974) Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of trichomoniasis *Br J Vener Dis* 50:450-452
- McFadzean JA, Pugh IM, Squires SL (1969) The effects of phenothiazines on the sickling phenomenon in vitro *Br J Haematol* 16:173-180
- McGrew JT, Leiske D, Dell B, Klinke R, Krasts D, Wee SF, Abbott N, Armitage R, Harrington K (1997) Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants *Gene* 187:193-200
- McKerrow JH (1989) Parasite proteases *Exp Parasitol* 68:111-115

- McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR (1999) Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections *Bioorg Med Chem* 7:639-644
- McKerrow JH, James MNG (1996) Cysteine proteases: evolution, function, and inhibitor design. ESCOM,
- McLuskey K, Mottram JC (2015) Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases *Biochem J* 466:219-232
doi:10.1042/BJ20141324
- Meites E, Gaydos CA, Hobbs MM, Kissinger P, Nyirjesy P, Schwebke JR, Secor WE, Sobel JD, Workowski KA (2015) A review of evidence-based care of symptomatic trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections *Clinical Infectious Diseases* 61:S837-S848
- Mendoza-Lopez MR, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Avila-Gonzalez L, Ruiz-Tachiquin ME, Ortega-Lopez J, Arroyo R (2000) CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence *Infect Immun* 68:4907-4912
- Moldwin RM (1992) Sexually transmitted protozoal infections. *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia lamblia* *Urol Clin North Am* 19:93-101
- Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M (2003) Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa *Trends Parasitol* 19:182-187
- Munson E, Napierala M, Basile J, Miller C, Burtch J, Hryciuk JE, Schell RF (2010) *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification-based analyte-specific reagent and alternative target testing of primary clinical vaginal saline suspensions *Diagnostic microbiology and infectious disease* 68:66-72
- Mykles DL (2001) Proteinase families and their inhibitors *Methods Cell Biol* 66:247-287
- Nagesha CN, Ananthakrishna NC, Sulochana P (1970) Clinical and laboratory studies on vaginal trichomoniasis *Am J Obstet Gynecol* 106:933-935
- Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2005) A vacuolar processing enzyme, deltaVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development *Plant Cell* 17:876-887
doi:10.1105/tpc.104.026872
- Neale KA, Alderete JF (1990) Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates *Infect Immun* 58:157-162
- Ng DT, Brown JD, Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane *J Cell Biol* 134:269-278
- Nielsen MH (1976) In vitro effect of metronidazole on the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* *Acta Pathol Microbiol Scand B* 84:93-100
- Nye MB, Schwebke JR, Body BA (2009) Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women *American journal of obstetrics and gynecology* 200:188. e181-188. e187
- Nzila N, Laga M, Thiam MA, Mayimona K, Edidi B, Van Dyck E, Behets F, Hassig S, Nelson A, Mokwa K, et al. (1991) HIV and other sexually transmitted diseases among female prostitutes in Kinshasa *Aids* 5:715-721
- Oliveira AS, Ferrão AR, Pereira FM, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A (2016) *Trichomonas vaginalis*: An Updated Overview Towards Diagnostic Improvement *Acta Parasitologica* 61:10-21

- OMS (2011) Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, syphilis and Trichomonas vaginalis: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates
- Otto HH, Schirmeister T (1997) Cysteine Proteases and Their Inhibitors Chem Rev 97:133-172
- Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado JM (1994) Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in Pichia pastoris using two different signal sequences Yeast 10:1415-1419 doi:10.1002/yea.320101104
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G (1998) Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis Clin Microbiol Rev 11:300-317
- Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA (1998) Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane Cell 94:795-807
- Provenzano D, Alderete JF (1995) Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of Trichomonas vaginalis Infect Immun 63:3388-3395
- Quon DV, d'Oliveira CE, Johnson PJ (1992) Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis Proc Natl Acad Sci U S A 89:4402-4406
- Raemaekers RJ, de Muro L, Gatehouse JA, Fordham-Skelton AP (1999) Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in Pichia pastoris correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide Eur J Biochem 265:394-403
- Ramon R, Ferrer P, Valero F (2007) Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris J Biotechnol 130:39-46 doi:10.1016/j.jbiotec.2007.02.025
- Ramon-Luing LA, Rendon-Gandarilla FJ, Cardenas-Guerra RE, Rodriguez-Cabrera NA, Ortega-Lopez J, Avila-Gonzalez L, Angel-Ortiz C, Herrera-Sanchez CN, Mendoza-Garcia M, Arroyo R (2010) Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for Trichomonas vaginalis Proteomics 10:435-444 doi:10.1002/pmic.200900479
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases Microbiol Mol Biol Rev 62:597-635
- Rawlings ND (2016) Peptidase specificity from the substrate cleavage collection in the MEROPS database and a tool to measure cleavage site conservation Biochimie 122:5-30 doi:10.1016/j.biochi.2015.10.003
- Rawlings ND, Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases Biochem J 290 (Pt 1):205-218
- Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R (2016) Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors Nucleic Acids Res 44:D343-350 doi:10.1093/nar/gkv1118
- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ (2006) MEROPS: the peptidase database Nucleic Acids Res 34:D270-272 doi:10.1093/nar/gkj089
- Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors Nucleic Acids Res 42:D503-509 doi:10.1093/nar/gkt953
- Reed JC, Doctor KS, Godzik A (2004) The domains of apoptosis: a genomics perspective Sci STKE 2004:re9 doi:10.1126/stke.2392004re9

- Rein MF, Chapel TA (1975) Trichomoniasis, candidiasis, and the minor venereal diseases Clin Obstet Gynecol 18:73-88
- Rendón-Gandarilla F (2007a) Caracterización de la Cisteín Proteínasa de tipo Legumaína TVLEGU-1 de *Trichomonas vaginalis*. CINVESTAV-IPN
- Rendón-Gandarilla FJ (2007b) Caracterización de la cisteín proteínasa de tipo Legumaína TvLEGU-1 de *Trichomonas vaginalis*. CINVESTAV-IPN
- Rendón-Gandarilla FJ, Ramon-Luing Lde L, Ortega-Lopez J, Rosa de Andrade I, Benchimol M, Arroyo R (2013) The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence Biomed Res Int 2013:561979 doi:10.1155/2013/561979
- Riley DE, Roberts MC, Takayama T, Krieger JN (1992) Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis* J Clin Microbiol 30:465-472
- Rodríguez-Cabrera N (2007a) Expresión y purificación de la Cisteín Proteínasa recombinante TVLEGU-1. CINVESTAV-IPN
- Rodríguez-Cabrera NA (2007b) Expresión y purificación de la Cisteín Proteínasa recombinante TvLEGU-1. CINVESTAV
- Rodriguez-Martinez HA, De la Luz Rosales M, Galloso de Bello L, Ruiz-Moreno JA (1973) Adequate staining of *Trichomonas vaginalis* by McManus' periodic acid-schiff stain Am J Clin Pathol 59:741-746
- Rosa FW, Baum C, Shaw M (1987) Pregnancy outcomes after first-trimester vaginitis drug therapy Obstet Gynecol 69:751-755
- Sajid M, McKerrow JH (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms Mol Biochem Parasitol 120:1-21
- Salas-Garrido C (2005a) identificación y localización de la cisteín proteínasa tipo legumaína TvLEGU-1 de *Trichomonas vaginalis*. CINVESTAV-IPN
- Salas-Garrido C (2005b) Identificación y localización de la cisteín proteínasa tipo legumaína TVLEGU-1 de *Trichomonas vaginalis*., CINVESTAV-IPN
- Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Saska I, Craik DJ (2008) Protease-catalysed protein splicing: a new post-translational modification? Trends Biochem Sci 33:363-368 doi:10.1016/j.tibs.2008.04.016
- Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MCB, Su J, Xu F, Weinstock H (2013) Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008 Sexually transmitted diseases 40:187-193
- Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain Biochem Biophys Res Commun 27:157-162
- Schwebke JR, Burgess D (2004) Trichomoniasis Clin Microbiol Rev 17:794-803, table of contents doi:10.1128/CMR.17.4.794-803.2004
- Schwebke JR, Hobbs MM, Taylor SN, Sena AC, Catania MG, Weinbaum BS, Johnson AD, Getman DK, Gaydos CA (2011) Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: results from a prospective US clinical trial Journal of clinical microbiology 49:4106-4111
- Secor WE, Meites E, Starr MC, Workowski KA (2014) Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis The American journal of tropical medicine and hygiene 90:800-804

- Secretaría de Salud SdPyPdS (2012) Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011. Versión Ejecutiva.
- Shi X, Jarvis DL (2007) Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system *Curr Drug Targets* 8:1116-1125
- Shutov AD, Do NL, Vaintraub IA (1982) [Purification and partial characterization of protease B from germinating vetch seeds] *Biokhimiia* 47:814-821
- Silver BJ, Guy RJ, Kaldor JM, Jamil MS, Rumbold AR (2014) *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis *Sexually transmitted diseases* 41:369-376
- Singh RH, Zenilman JM, Brown KM, Madden T, Gaydos C, Ghanem KG (2012) The role of physical examination in diagnosing common causes of vaginitis: a prospective study *Sexually transmitted infections:sextrans-2012-050550*
- Sitia R, Braakman I (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory *Nature* 426:891-894 doi:10.1038/nature02262
- Spence MR, Hollander DH, Smith J, McCaig L, Sewell D, Brockman M (1980) The clinical and laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection *Sex Transm Dis* 7:168-171
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures *Protein Expr Purif* 41:207-234
- Sun P, Tropea JE, Waugh DS (2011) Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner *Methods Mol Biol* 705:259-274 doi:10.1007/978-1-61737-967-3_16
- Sunga AJ, Tolstorukov I, Cregg JM (2008) Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris* *FEMS Yeast Res* 8:870-876 doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00410.x
- Tanner W, Lehle L (1987) Protein glycosylation in yeast *Biochim Biophys Acta* 906:81-99
- Teng D, Fan Y, Yang YL, Tian ZG, Luo J, Wang JH (2007) Codon optimization of *Bacillus licheniformis* beta-1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris* *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1074-1083 doi:10.1007/s00253-006-0765-z
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems *Appl Microbiol Biotechnol* 60:523-533 doi:10.1007/s00253-002-1158-6
- Tocher JH, Edwards DI (1994) Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases *Biochem Pharmacol* 48:1089-1094
- Tokunaga M, Wada N, Hishinuma F (1988) A novel yeast secretion signal isolated from 28K killer precursor protein encoded on the linear DNA plasmid pGKL1 *Nucleic Acids Res* 16:7499-7511
- Turk V (2012) *Proteases New Perspectives*. Birkhäuser Basel,
- Van Der Pol B (2007) *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention *Clin Infect Dis* 44:23-25
- Vasina JA, Baneyx F (1997) Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems *Protein Expr Purif* 9:211-218 doi:10.1006/prev.1996.0678

- Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N (2001) Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* *Protein Expr Purif* 21:71-80 doi:10.1006/pep.2000.1335
- Verma S, Dixit R, Pandey KC (2016) Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets *Front Pharmacol* 7:107 doi:10.3389/fphar.2016.00107
- Warton A, Honigberg BM (1979) Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy *J Protozool* 26:56-62
- Waters MG, Evans EA, Blobel G (1988) Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence *J Biol Chem* 263:6209-6214
- Wawrzyniak I, Texier C, Poirier P, Viscogliosi E, Tan KS, Delbac F, El Alaoui H (2012) Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite *Parasitol Int* 61:437-442 doi:10.1016/j.parint.2012.02.007
- Weber CH, Vincenz C (2001) The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci* 26:475-481
- Xiong AS, Yao QH, Peng RH, Zhang Z, Xu F, Liu JG, Han PL, Chen JM (2006) High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1039-1047 doi:10.1007/s00253-006-0384-8
- Xiong R, Chen J, Chen J (2008) Secreted expression of human lysozyme in the yeast *Pichia pastoris* under the direction of the signal peptide from human serum albumin *Biotechnol Appl Biochem* 51:129-134 doi:10.1042/BA20070205
- Yang J, Zhang Y (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions *Nucleic Acids Res* 43:W174-181 doi:10.1093/nar/gkv342
- Yoshimasu MA, Ahn JK, Tanaka T, Yada RY (2002) Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from *Pichia pastoris* *Protein Expr Purif* 25:229-236
- Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction *BMC Bioinformatics* 9:40 doi:10.1186/1471-2105-9-40
- Zhang ZF, Begg CB (1994) Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies *Int J Epidemiol* 23:682-690
- Zhao L, Hua T, Crowley C, Ru H, Ni X, Shaw N, Jiao L, Ding W, Qu L, Hung LW, Huang W, Liu L, Ye K, Ouyang S, Cheng G, Liu ZJ (2014) Structural analysis of asparaginyl endopeptidase reveals the activation mechanism and a reversible intermediate maturation stage *Cell Res* 24:344-358 doi:10.1038/cr.2014.4
- Zhu T, Guo M, Tang Z, Zhang M, Zhuang Y, Chu J, Zhang S (2009) Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris* *J Appl Microbiol* 107:954-963 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04279.x
- Zhu T, Guo M, Zhuang Y, Chu J, Zhang S (2011) Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:1127-1135 doi:10.1007/s00253-010-2944-1