



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

“Expresión en *Escherichia coli* de las Peptidil-Prolil Isomerasas recombinantes de *Trypanosoma cruzi* (TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC) fusionadas a un módulo de unión a carbohidratos tipo 2 (CBM2)”

T E S I S

Que presenta:

IBQ. ESDRAS ENOC PACINDO CABRALES

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

DIRECTORES:

Dr. Jaime Ortega López

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Ciudad de México

Agosto, 2023

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología de proteínas (No. 23) y Biocatálisis (No. 20), del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (DBB) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección del **Dr. Jaime Ortega López** y la **Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas**, investigadores titulares del departamento de Biotecnología y Bioingeniería. así como la asesoría de la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, investigadora titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular y la **Dra. Ma. Viridiana Olin Sandoval**, investigadora titular del departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Para la realización de este proyecto de investigación se contó con el apoyo Cinvestav-IPN (FIDSC2018/268), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT, 269657, A1-S34224), así como la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (Becario CONAHCyT No. 1144009) durante el periodo septiembre 2021-agosto 2023.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, doy gracias a **Dios** por darme salud y vida, así como una gran familia y amigos que siempre me han apoyado en cada una de las etapas de mi vida. Agradezco a **mis padres, abuelos, tíos y a toda mi familia**, así como a **mis amigos** por darme siempre su apoyo incondicional.

Agradezco al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** por todo los apoyos, infraestructura y facilidades otorgadas, así como el apoyo para el proyecto (FIDSC2018/268). Además, agradezco al **CONAHCyT** por los apoyos otorgados para la realización de mis estudios de maestría (Becario CONAHCyT No. 1144009), así como el financiamiento del proyecto (269657, A1-S34224).

Quiero hacer un agradecimiento especial a mi director de tesis, el **Dr. Jaime Ortega López**, por su excepcional dedicación, paciencia, dirección y apoyo. Su guía experta y contribuciones han sido invaluable para el éxito de este proyecto. Además, agradezco sinceramente a mi codirectora, la **Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas**, así como a mis asesores, la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** y la **Dra. Ma. Viridiana Olin Sandoval**, por sus valiosas contribuciones y asesoramientos a lo largo de este proyecto.

También agradezco profundamente a la **M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta**, por todas las asesorías en técnicas moleculares y de proteínas, al **IBT. Octavio Montes Flores** por su asesoría y apoyo en técnicas de purificación de proteínas recombinantes, así como a la **Dra. Rosa Elena Cárdenas Guerra** por sus consejos y apoyos en técnicas de immunoblotting.

Por último, agradezco a **Ma. Eugenia Zúñiga Trejo** por su asistencia técnica en el laboratorio, así como a mis compañeros **Alejandro, Daniel, Verónica, Miriam, Paola y Marco** por su apoyo y asistencia a lo largo de mi proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

1. Resumen.....	1
1.1. Abstract.....	2
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes.....	3
3.1. Peptidil-Prolil Isomerasas.....	4
3.2. Vacuna terapéutica contra la enfermedad de Chagas.....	4
4. Justificación.....	7
5. Hipótesis.....	8
6. Objetivos.....	8
6.1. General.....	8
6.2. Específicos.....	8
7. Materiales y Métodos.....	9
7.1. Estrategia Experimental.....	9
7.1.1. Predicción de la solubilidad de las PPlasas.....	10
7.1.2. Síntesis de los genes.....	10
7.1.3. Subclonación en el vector de expresión pET-38b(+).....	10
7.1.4. Expresión de las PPlasas recombinantes fusionadas al CBM2.....	13
7.1.5. Purificación de las PPlasas recombinantes.....	15
7.1.6. Análisis electroforético SDS-PAGE.....	17
7.1.7. Western Blot.....	17
7.1.8. Cuantificación de proteína.....	17
7.1.9. Determinación de la actividad enzimática.....	18
8. Resultados.....	19
8.1. Determinación de los parámetros fisicoquímicos y solubilidad de las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC, a partir de su secuencia y estructura 3D.....	19

8.2. Subclonación de los ORFs <i>tccyp19</i> , <i>tccyp22</i> y <i>tccysec</i>	24
8.3. Expresión de las PPlasas recombinantes fusionadas a CBM2	37
8.4. Mejoramiento de la expresión soluble de las PPlasas recombinantes.....	39
8.5. Purificación de las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC fusionadas a CBM2.....	44
8.6. Determinación de la actividad PPlasa mediante el ensayo de la RNAsa T1.....	56
9. Discusión.....	59
10. Conclusión.....	62
11. Perspectivas	63
12. Bibliografía:	64
13. Apéndices.....	68

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Determinación de parámetros fisicoquímicos y solubilidad a partir de su secuencia y estructura 3D.....	23
Tabla 2. Determinación de actividad PPlasa.	58

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Estrategia experimental.	9
Figura 2. Mapa del vector de expresión pET-38b(+).	11
Figura 3. Estructura 3D de TcCyP19-CBM2 y TcCyP19.	20
Figura 4. Estructura 3D de TcCyP22-CBM2 y TcCyP22.	21
Figura 5. Estructura 3D de TcCySEC-CBM2 y TcCySEC.	22
Figura 6. Análisis electroforético del fragmento de DNA que codifica para la TcCyP19.	25
Figura 7. Análisis electroforético del fragmento de DNA que codifica para la TcCyP22.	26
Figura 8. Análisis electroforético del fragmento de DNA que codifica para la TcCySEC.	27
Figura 9. Análisis electroforético del pET-38b(+)-DA.	28
Figura 10. Análisis electroforético de la doble digestión del pET-38b(+)-DA	29
Figura 11. Análisis electroforético del pET-38b(+) linealizado.	30
Figura 12. Análisis electroforético de las construcciones pET-38b(+)-TcCyP19 y pET-38b(+)-TcCyP22.	32
Figura 13. Análisis electroforético de la construcción pET-38b(+)-TcCySEC. .	33
Figura 14. Análisis electroforético de la doble digestión de la construcción pET-38b(+)-TcCyP19.	34
Figura 15. Análisis electroforético de la doble digestión de la construcción pET-38b(+)-TcCyP22.	35
Figura 16. Análisis electroforético de la doble digestión de la construcción pET-38b(+)-TcCySEC.	36
Figura 17. Expresión de las PPlasas recombinantes fusionadas a CBM2.	38
Figura 18. Expresión de TcCyP19-CBM2 a diferentes condiciones de cultivo e inducción.	40
Figura 19. Expresión de TcCySEC-CBM2 a diferentes condiciones de cultivo e inducción.	41
Figura 20. Expresión de TcCyP22-CBM2 a diferentes condiciones cultivo e inducción.	42
Figura 21. Análisis por Western Blot de la expresión de TcCyP19, TcCyP22 y	

TcCySEC fusionadas a CBM2.	43
Figura 22. Expresión de TcCySEC fusionada a CBM2.	45
Figura 23. Expresión de TcCyP19 y TcCyP22 fusionadas a CBM2.	46
Figura 24. Cromatograma de la purificación de TcCySEC-CBM2 recombinante.	47
Figura 25. Purificación de TcCySEC-CBM2.	48
Figura 26. Cambio de amortiguador de TcCySEC-CBM2.	49
Figura 27. Cromatograma de la purificación de TcCyP19-CBM2 soluble	50
Figura 28. Purificación de TcCyP19-CBM2.	51
Figura 29. Cambio de amortiguador de TcCyP19-CBM2.	52
Figura 30. Purificación y replegamiento cromatográfico de TcCyP22-CBM2.	54
Figura 31. Expresión y purificación de TcCyP22-CBM2.	55
Figura 32. Cinéticas de replegamiento de RNAsa T1 asistida con PPlasas recombinantes fusionadas a CBM2.	57

1. Resumen.

La enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida de importancia para la salud pública, no solamente de México sino de Latinoamérica y del mundo. Esta enfermedad es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y presenta dos fases, una aguda al inicio de la infección y una crónica. Los medicamentos existentes no son eficaces en la fase crónica lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas, entre las que se encuentra la vacuna terapéutica basada en las proteínas recombinantes Tc24 y TSA-1 producidas en *Escherichia coli*. Pruebas preclínicas han demostrado que estas proteínas recombinantes son buenos antígenos vacunales. Ambas proteínas se expresan con alto rendimiento en *E. coli*. Sin embargo, mientras que Tc24 se expresa en forma soluble, TSA-1 solo se expresa en forma de agregados insolubles de proteína mal plegada conocidos como cuerpos de inclusión (CI). Como TSA-1 contiene en su secuencia, un gran número de prolinas, la isomerización -cis-trans- de los enlaces que preceden a la prolina podría afectar el correcto plegamiento de ésta. Por lo que se ha sugerido que el uso de Peptidil-Protil Isomerasas (PPIasas) de *T. cruzi* pudieran mejorar el replegamiento *in vitro* de TSA-1 expresada en CI. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto fue expresar las PPIasas recombinantes TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC de *Trypanosoma cruzi* fusionadas al módulo de unión a carbohidratos tipo 2 en *E. coli*, purificarlas por métodos cromatográficos y determinar su actividad de PPIasa para su posterior uso como foldasas en el replegamiento de TSA-1 u otras proteínas de difícil expresión en *E. coli*. Los ORFs de las tres PPIasas se subclonaron en el vector de expresión pET-38b(+), se expresaron en células de *E. coli* BL21 (DE3), se purificaron por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y se determinó su actividad enzimática mediante el replegamiento de RNasa T1. Las PPIasas TcCyP19 y TcCySEC fusionadas a CBM2 se expresaron tanto en forma soluble como insoluble, mientras que la TcCyP22-CBM2 solo se expresó en forma insoluble. La PPIasa TcCyP19-CBM2 presentó mayor actividad enzimática seguida de TcCySEC-CBM2 y por último TcCyP22-CBM2.

1.1. Abstract.

Chagas disease is a neglected disease of public health importance, not only in Mexico but also in Latin America and the world. This disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* that presents two phases, an acute phase at the beginning of the infection and a chronic phase. Existing drugs are not effective in the chronic phase, which has led to the search for alternatives, among which is the therapeutic vaccine based on recombinant proteins Tc24 and TSA-1 produced in *Escherichia coli*. Preclinical tests have shown that these recombinant proteins are good vaccine antigens. Both proteins are expressed with high yield in *E. coli*. However, while Tc24 is expressed in soluble form, TSA-1 is only expressed as insoluble aggregates of misfolded protein known as inclusion bodies (IB). As TSA-1 contains many prolines in its sequence, the isomerization -cis-trans- of the bonds preceding the proline could affect the correct folding of the proline. Therefore, it has been suggested that the use of Peptidyl-Prolyl Isomerases (PPIases) from *T. cruzi* could improve the *in vitro* refolding of TSA-1 expressed in IB.

Thus, the present project aimed to express the recombinant PPIases TcCyP19, TcCyP22, and TcCySEC from *T. cruzi* fused to the type 2 carbohydrate-binding module (CBM2) in *E. coli*, purify them by chromatographic methods, and determine their PPIase activity for subsequent use as foldases in the refolding of TSA-1 or other difficult-to-express proteins in *E. coli*. The ORFs of the three PPIases were subcloned into the expression vector pET-38b(+), expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells, purified by Ni²⁺ affinity chromatography, and their enzymatic activity was determined by RNAsa T1 refolding. The PPIases TcCyP19 and TcCySEC fused to CBM2 were expressed in both soluble and insoluble forms, whereas TcCyP22-CBM2 was only expressed in insoluble form. The PPIase TcCyP19-CBM2 presented higher activity followed by TcCySEC-CBM2 and finally TcCyP22-CBM2.

2. Introducción.

El mercado de productos biofarmacéuticos en 2021 se ha valuado en 345 mil millones de dólares y se estima que alcance los 974 mil millones de dólares en 2030 (Research and Markets, 2022). Dentro de estos productos se encuentran vacunas, proteínas terapéuticas e insumos para terapias génicas, los cuales han venido a revolucionar el campo de la medicina. Estos se producen en bacterias, levaduras, células de insecto, de mamífero e incluso en células vegetales o plantas.

El sistema de expresión más utilizado es *Escherichia coli*, debido a su rápido crecimiento, su fácil manipulación y su rentabilidad, sin embargo, es utilizado cuando no son requeridas modificaciones postraduccionales (Rosano *et al.*, 2019; Ferrer-Miralles *et al.*, 2022). La producción heteróloga en *E. coli* es compleja, depende de muchos factores relacionados al producto *per se*, una limitante de este sistema de expresión es que puede no producir un plegado correcto y funcional de algunas proteínas recombinantes, las cuales se acumulan en los denominados cuerpos de inclusión (CI).

Los CI son agregados proteicos insolubles de proteína mal plegada que se forman tanto en el citoplasma como en el periplasma de las células bacterianas cuando se sobre expresan las proteínas recombinantes. Los CI contienen hasta un 80% de la proteína de interés, lo que facilita su purificación, además de ser más resistente a la degradación por proteasas (Rosano *et al.*, 2019; Ferrer-Miralles *et al.*, 2022).

Se han utilizado diversas estrategias para mejorar el rendimiento de producción de las proteínas y evitar problemas de agregación, las cuales se basan en el diseño de los genes para optimizar la tasa de transcripción, la estabilidad del mRNA y la tasa de traducción, además de la selección de cepas y plásmidos de expresión adecuados, las condiciones de cultivo, el uso de proteínas solubilizantes fusionadas a la proteína de interés, así como algunos protocolos de replegamiento “*in vitro*” (Ferrer-Miralles *et al.*, 2022).

3. Antecedentes.

Se ha encontrado que *in vivo*, el correcto plegamiento de las proteínas puede ser modulada por chaperonas y foldasas. Por ejemplo, la chaperonina GroEL-GroES que tanto *in vivo* como *in vitro*, evita las asociaciones moleculares incorrectas dentro y entre las moléculas de proteínas durante el proceso de plegado de una manera dependiente de ATP. Por su parte, se ha demostrado que el dominio apical de GroEL (AD) es capaz de asistir en el replegamiento de proteínas en ausencia de GroES y ATP (Ramón-Luing *et al*, 2006; Antonio-Pérez *et al*, 2012).

En la búsqueda de alternativas para usar el AD en el replegamiento de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* como CI, Ramón-Luing *et al.*, (2006), reportaron la fusión de AD a un módulo de unión a carbohidratos tipo 2 (CBM2) de *Cellulomonas fimi* para facilitar su purificación e inmovilización a celulosa.

Posteriormente, Antonio-Pérez *et al.*, (2012 y 2012a), fusionaron las disulfuro oxidorreductasas DsbA y DsbC de *E. coli* al CBM2 de *C. fimi* para catalizar *in vitro* la formación de enlaces disulfuro y el reordenamiento de enlaces disulfuro no nativos en proteínas con múltiples residuos de cisteína. Estas disulfuro oxidorreductasas, junto con el AD inmovilizadas en celulosa, asistieron de manera eficiente el replegamiento cromatográfico de proteínas con varios puentes disulfuro. Adicionalmente, encontraron que AD, DsbA y DsbC inmovilizados sobre celulosa tienen una alta estabilidad operativa bajo las condiciones de desnaturalización extrema utilizadas en cada lote de replegamiento cromatográfico, dado que no se modificó su capacidad catalítica durante seis lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico (Antonio-Pérez *et al.*, 2012a).

Sin embargo, en el replegamiento de proteínas con un gran número de prolina, la isomerización -cis-trans- de los enlaces precedentes a prolina podría ser un paso limitante adicional para lograr su correcto plegamiento. Es por ello que se propone el uso de las peptidil-prolil isomerasas (PPIasas) recombinantes en el replegamiento de proteínas con un alto número de prolina.

3.1. Peptidil-Prolil Isomerasas.

Las peptidil-prolil cis-trans isomerasas catalizan la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos de prolina (Xaa-Pro); además, han demostrado ser un auxiliar en el plegamiento de proteínas, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. Por lo que estas proteínas son casos de estudio interesantes en el correcto plegamiento o replegamiento de proteínas. Ya que la isomerización cis-trans se ha demostrado que es un paso necesario y limitante. Dentro de esta familia se encuentran las ciclofilinas, parvulinas y las FKBP, algunas de éstas incluso llegando a ser blancos farmacológicos (Fischer *et al.*, 1984, Page *et al.*, 1995, Galat, 2003).

3.2. Vacuna terapéutica contra la enfermedad de Chagas

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente responsable de la tripanosomiasis americana, más conocida como enfermedad de Chagas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo, principalmente en América Latina, están infectadas por este parásito (WHO, 2023). La infección se transmite principalmente a través de insectos vectores hematófagos (Triatominos) portadores de *T. cruzi*. Este modo de infección representa del 80-90% de todas las transmisiones. Otras formas de transmisión son a través de transfusiones sanguíneas o transmisión congénita el 0,5-8% y el porcentaje restante debido a otras formas menos comunes de infección, como alimentos o trasplantes de órganos infectados (Castro *et al.*, 2006).

La enfermedad de Chagas tiene dos fases establecidas (aguda y crónica). Mientras que la enfermedad aguda es principalmente asintomática, los casos a menudo pasan a la fase crónica y se manifiestan clínicamente décadas después de la infección como cardiomiopatía y posterior insuficiencia cardiaca congestiva (Lee *et al.*, 2010).

Existen dos fármacos aprobados para tratamiento de esta enfermedad, Benznidazol y Nifortumox, eficaces en la fase aguda, pero ineficientes en la fase crónica (WHO, 2023) Por lo que el enfoque hacia la búsqueda de alternativas de tratamiento conlleva a trabajar en estrategias alternativas como una vacuna terapéutica basada en los

antígenos recombinantes TSA-1 y Tc24 producidos en *E. coli*. En 2018, Villanueva-Lizama *et al.*, reportaron en pruebas preclínicas que son buenos antígenos vacunales contra la enfermedad de Chagas. Ambas proteínas se expresan con alto rendimiento en *E. coli*; sin embargo, Tc24 se expresa en forma soluble, mientras que, TSA-1 solo se expresa en forma de agregados insolubles (Seid *et al.*, 2017; de la Cruz *et al.*, 2019).

TSA-1 es una proteína del parásito de 85 kDa que pertenece a la familia de proteínas de superficie de las transialidasas que desempeña un papel importante en la captación de ácido siálico por parte del parásito (de la Cruz *et al.*, 2019; Dumonteil *et al.*, 2020). Ésta se expresa con altos rendimientos en *E. coli* (Martínez-Campos *et al.*, 2015); sin embargo, TSA-1 se encuentra en agregados multiméricos cuasi-estables, por lo que es importante producirlas en su conformación nativa (de la Cruz *et al.*, 2019).

TSA-1 contiene en su secuencia varias cisteínas y un gran número de prolinas que posiblemente afecten la cinética de plegamiento durante su expresión heteróloga. Por lo que se propone el uso de PPlasas recombinantes del propio microorganismo para mejorar el replegamiento de proteínas como TSA-1, las cuales contienen un gran número de prolinas y además se expresan en *E. coli* como CI.

En el genoma de *T. cruzi* se han identificado 24 PPlasas (15 ciclofilinas, 6 FKBP y 3 parvulinas) (Amos *et al.*, 2021). Por lo que para probar si una PPlasa propia del microorganismo asiste de mejor manera la isomerización cis-trans de los enlaces precedentes a prolina durante el replegamiento de la TSA-1, se seleccionaron las siguientes PPlasas debido a que son de las más reportadas y caracterizadas en *T. cruzi*; TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC/TcMIP [Macrophage infectivity potentiator] (Moro *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 2006; Potenza *et al.*, 2006; Rego *et al.*, 2015; Jiménez-Guerra, 2022).

Cada una de las PPlasas seleccionadas es diferente respecto a la otra, ya sea en su localización, función (además de PPlasa) y/o dominio (Ciclofilina: TcCyP19 y TcCyP22; FKBP: TcCySEC). TcCySEC tiene un peso molecular aproximado de 22 kDa, sin embargo, cuenta con un péptido señal que al momento de escindirise, la proteína pasa a tener un peso molecular aproximado de 19kDa. Se ha encontrado

que está implicada en el proceso de entrada de *T. cruzi* en la célula huésped. La expresión de esta proteína se ha observado principalmente en la forma invasora, posiblemente interactúe con alguna(s) proteína(s) de la membrana de la célula huésped, contribuyendo, de forma aún no determinada, a que la célula huésped sea más susceptible a la penetración (Moro *et al.*, 1995)

En el caso particular de TcCyP19, es una ciclofilina que es secretada. Ésta es una proteína de aproximadamente 19kDa, clasificada como un ortólogo de la CyPA humana. Estudios recientes sugieren que TcCyP19, además de ser una enzima con actividad PPIasa, tiene otras funciones dentro del organismo que son críticas para la infectividad, por lo que podría ser un candidato a blanco farmacológico (Jha *et al.*, 2023). Ha sido reportado que actúa como neutralizante de compuestos antiparasitarios, lo que aumenta la supervivencia del parásito, asimismo, se ha encontrado que apoya la producción bioenergética mitocondrial de ATP y una mayor infectividad (Kulkarni *et al.*, 2013). Por otro lado, Dos Santos *et al.*, (2020), reportaron que la ciclofilina secretada en el citosol de la célula huésped media el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), necesario para impulsar la proliferación del parásito en huéspedes mamíferos.

Finalmente, TcCyP22 tiene un peso molecular de aproximadamente 22kDa. En 2017, Bustos *et al.*, reportaron la localización en las mitocondrias en las tres etapas del ciclo de vida del parásito. Además, se encontró que estaba implicada en la muerte celular regulada por *T. cruzi*. Sin embargo, esta PPIasa nunca ha sido expresada soluble, no hay reportes de ensayos de actividad ni de inhibición, aunado a esto, podría ser catalíticamente más activa y, por lo tanto, ser la mejor candidata para utilizarse en el replegamiento cromatográfico de TSA-1.

Aun así, otra gran candidata sería TcCySEC, debido a que ambas se encuentran en superficie y por lo tanto comparten condiciones, por lo que sería un interesante caso de estudio la posible interacción de éstas. Sin embargo, se ha reportado que la actividad PPIasa de TcCyP19 es mayor que la de TcCySEC y aunque en el parásito se encuentren en localizaciones y condiciones diferentes, al utilizarse en replegamiento cromatográfico podría brindar muy buenos resultados.

4. Justificación.

La plataforma de expresión de proteínas recombinantes preferida cuando no se requieren modificaciones postraduccionales es *E. coli*, debido a que es un microorganismo fácilmente manipulable, ampliamente estudiado, cuenta con amplia variedad de cepas y vectores, su crecimiento es rápido, tiene un bajo costo de mantenimiento y de medios de cultivo, además de un mejoramiento continuo de su capacidad de expresión. Sin embargo, en muchos casos, al sobre expresar las proteínas recombinantes tienden a ser insolubles, debido a diversos factores, como diferencias en la maquinaria celular de plegamiento o que ésta es insuficiente para la síntesis de la cadena polipeptídica, lo que ocasiona una acumulación o agregación de estas proteínas mal plegadas en CI.

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública a nivel mundial, y aunque existen medicamentos contra la enfermedad, estos no son eficientes en la fase crónica, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas, como la vacuna terapéutica basada en las proteínas recombinantes, Tc24 y TSA-1 producidas en *E. coli*. Se ha demostrado en pruebas preclínicas que estas proteínas recombinantes son buenos antígenos vacunales. Ambas proteínas se expresan con alto rendimientos; sin embargo, TSA-1 solo se expresa en forma de agregados insolubles de proteína mal plegada (CI). Esta proteína contiene un gran número de prolina, lo que evidencia científica sugiere que la isomerización -cis-trans- de los enlaces que preceden a prolina podrían afectar en el correcto plegamiento de ésta. Por lo que para mejorar el replegamiento cromatográfico del antígeno TSA-1, se ha sugerido la inmovilización en celulosa de al menos una de las PPlasas de *T. cruzi*. De ahí que en este proyecto las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC de *T. cruzi* se fusionaron CBM2 de *C. fimi*, se expresaron, purificaron y se determinó su actividad enzimática.

5. Hipótesis.

Es factible expresar catalíticamente activas las peptidil-prolil-isomerasas (PPlasa) TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC de *Trypanosoma cruzi* fusionadas a un módulo de unión a carbohidratos tipo 2 (CBM2), en la plataforma de expresión de *Escherichia coli*.

6. Objetivos.

6.1. General

- Expresar y purificar las PPlasas recombinantes TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC de *T. cruzi* en *E. coli* fusionadas al CBM2 y determinar su actividad enzimática de peptidil-prolil-isomerasa.

6.2. Específicos

- Subclonar los ORF que codifican para TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC en el vector de expresión pET-38b(+), a partir de las secuencias previamente optimizadas para el uso de codones en *E. coli* y clonadas en el vector pUC57.
- Expresar a las PPlasas recombinantes TcCyP19-CBM2, TcCyP22-CBM2 y TcCySEC-CBM2.
- Purificar a las PPlasas TcCyP19-CBM2, TcCyP22-CBM2 y TcCySEC-CBM2 por métodos cromatográficos.
- Determinar la actividad enzimática de las PPlasas recombinantes TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC fusionadas al CBM2, para su uso posterior en el replegamiento cromatográfico de proteínas recombinantes que se expresan en *E. coli* como CI y que contienen en su secuencia un gran número de prolinas como la TSA-1.

7. Materiales y Métodos

7.1. Estrategia Experimental

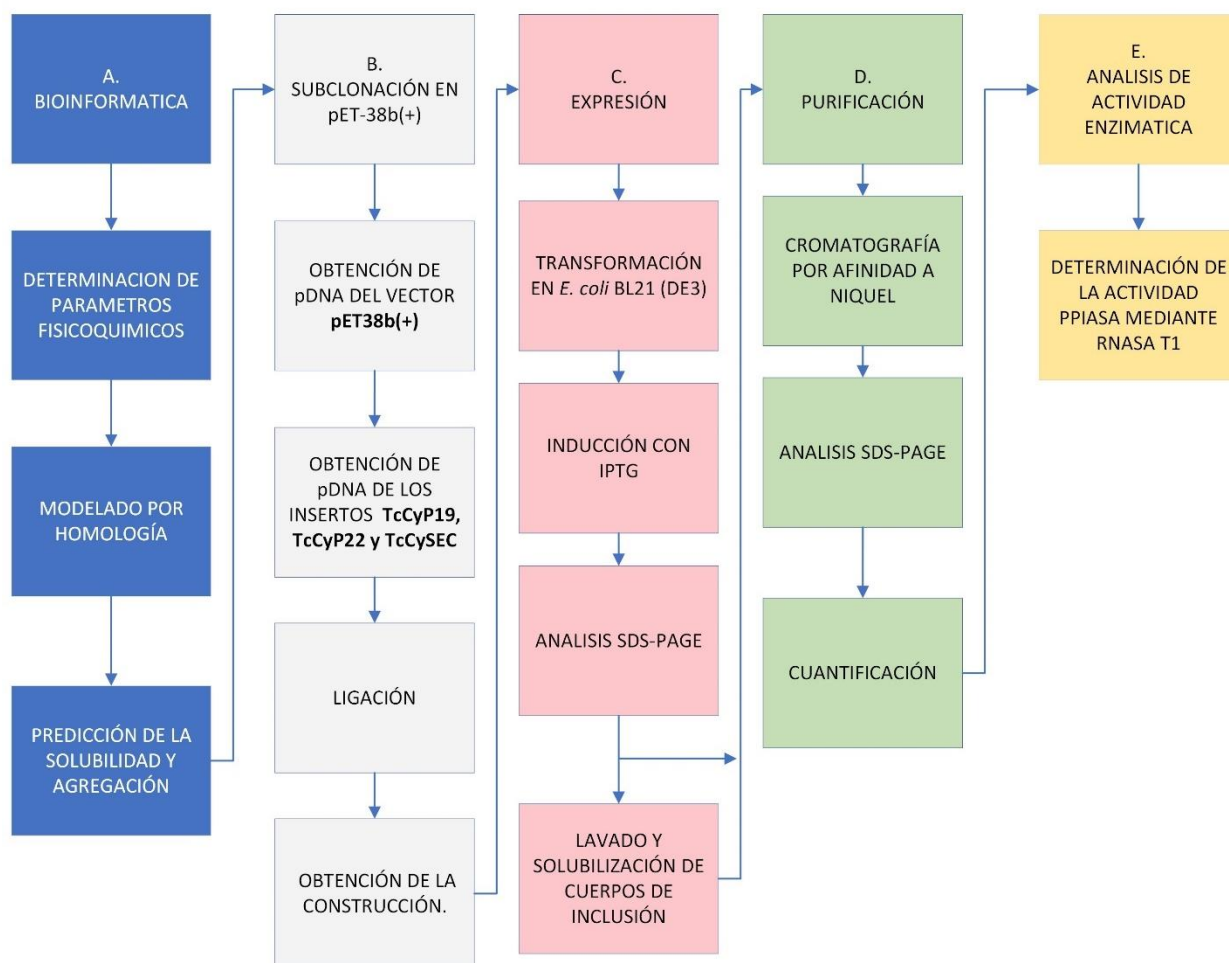


Figura 1. Estrategia experimental. Para cumplir los objetivos de este proyecto primero se determinaron *in silico* varios parámetros fisicoquímicos de las tres PPIasas fusionadas al CBM2 (A), luego las tres PPIasas se subclonaron en el vector pET-38b(+) (B), se expresaron en *E. coli* (C), se purificaron por métodos cromatográficos (D) y finalmente se determinó su actividad de PPIasa (E).

7.1.1. Predicción de la solubilidad de las PPlasas.

Las secuencias de los genes que codifican para las tres PPlasas, así como sus modelos tridimensionales, se utilizaron para la predicción de solubilidad y agregación. A partir de su secuencia, se llevó a cabo en el servidor de Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk>); mientras que el análisis a partir de su estructura tridimensional, se realizó en los servidores de CamSol (<https://www-cohsoftware.ch.cam.ac.uk/>) y Agresscan-3D (<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D2/>). Los modelos de la estructura 3D de las PPlasas fueron realizados a partir de sus secuencias en el servidor de I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) y recuperados de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

7.1.2. Síntesis de los genes.

Las secuencias de los genes que codifican para las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC, se sintetizaron por la compañía *Synbio Technologies LLC* (<https://synbio-tech.com/>). Estas secuencias fueron optimizadas para su expresión en *E. coli*, sintetizadas y clonadas en el vector pUC57 con los sitios de restricción *NcoI* (5') y *XhoI* (3') (Apéndices 1 y 2).

7.1.3. Subclonación en el vector de expresión pET-38b(+)

Los ORFs que codifican para las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC previamente, se subclonaron en el vector de expresión pET-38b(+) (Figura 2) como se describe a continuación.

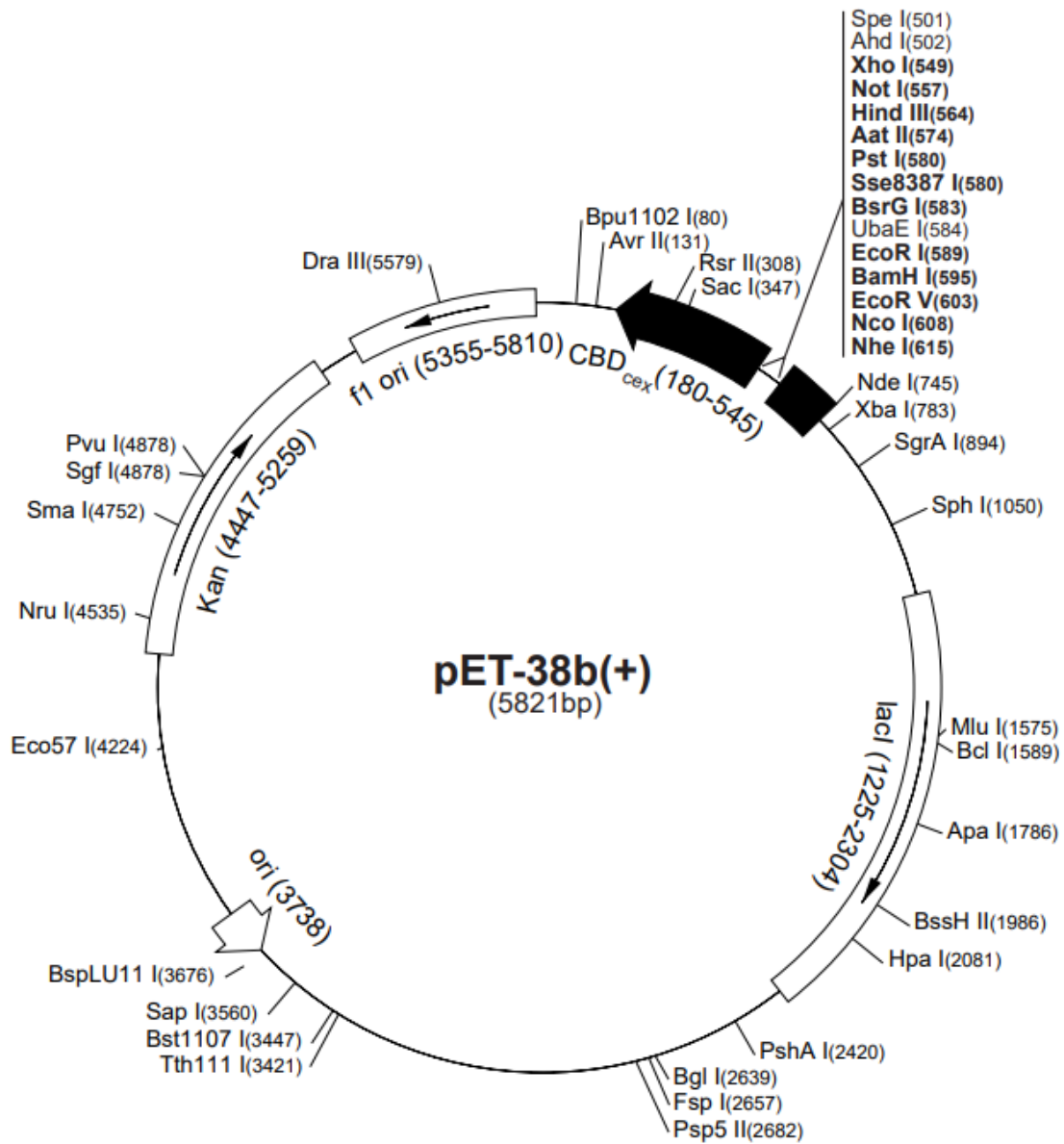


Figura 2. Mapa del vector de expresión pET-38b(+). Longitud de 5821 pb, cuenta con un marcador de resistencia a Kanamicina y permite la expresión de proteínas en fusión traduccional con un módulo de unión a carbohidratos tipo 2 (CBDCex/CBM2) en el extremo carboxilo terminal, seguida de una etiqueta de 8 histidinas (Novagen).

Primero se purificaron los plásmidos pUC57-TcCyP19, pUC57-TcCyP22 y pUC57-TcCySEC, mediante el protocolo descrito en el Kit de purificación de pDNA, NucleoBond®Xtra Midi de Macherey-Nagel. Para la cuantificación de cada plásmido purificado se determinó su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV/Visible NanoDrop® 2000 (*Thermo Scientific*) y se verificó la calidad del pDNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para comprobar la presencia del inserto a subclonar se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* para cada una de las construcciones, y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para la obtención del pDNA del vector de expresión pET-38b(+), el análisis de su calidad, pureza, cuantificación y doble digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* se realizó de acuerdo con el protocolo descrito previamente.

Finalmente, para la obtención de las construcciones pET-38b(+)-PPIasa, se realizaron dobles digestiones de 3 µg del pET-38b(+) y 3 µg de los plásmidos pUC57-PPIasa, con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* a 37 °C durante 16 h. El pDNA digerido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y se extrajo el pDNA del vector de expresión linealizado y de los insertos, mediante QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (QIAGEN). La concentración de los pDNA extraídos se cuantificó por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop®. La calidad de los pDNA recuperados se analizó mediante electroforesis en agarosa al 1.2%.

El siguiente paso fue la ligación de los insertos en el vector de expresión pET-38b(+), donde primeramente se realizaron los cálculos de la relación molar, utilizando la siguiente fórmula, así como la herramienta NEBcalculator de New England Biolabs®.

$$\text{moles DNA (mol)} = \frac{\text{Masa de DNA (g)}}{(\text{Tamaño de DNA (pb)} \times 617.96 \text{ g/mol/pb} + 36.04 \text{ g/mol})}$$

Donde 617,96 g/mol corresponde al peso molecular medio de un par de bases, excluyendo la molécula de agua eliminada durante la polimerización. Y los 36,04 g/mol corresponden a los 2 -OH y 2 -H añadidos a los extremos.

La ligación se realizó en una relación 1:3 (vector: inserto), respectivamente. Para lo cual se colocaron 20 µl de reacción a 16°C durante 16 h y la ligasa T4 se inactivó a 65°C durante 10 min. Las construcciones obtenidas (pET-38b(+)-TcCyP19, pET-38b(+)-TcCyP22 y pET-38b(+)-TcCySEC) se transformaron en células de *E. coli* DH5α y las bacterias se plaquearon en cajas Petri con medio LB-agar + Kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 16 h. Como controles se incluyeron un control de religación y un control positivo de transformación.

Una de las colonias obtenidas de cada una de las transformaciones se seleccionó para inocular tubos con 5 ml LB-Kanamicina (50 µg/ml), para purificar el pDNA de las mismas mediante el protocolo de Miniprep descrito en los kits *plasmid miniPREP kit* de *PureDirex* y QIAprep®Spin Miniprep Kit de QIAGEN. El pDNA obtenido se cuantificó en NanoDrop® y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, para verificar la calidad de éstos. Se realizaron dobles digestiones con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Para verificar la expresión de las proteínas recombinantes, se seleccionaron colonias al menos una de cada construcción.

7.1.4. Expresión de las PPlasas recombinantes fusionadas al CBM2.

Una vez obtenidas y verificadas las construcciones, cada una se transformó en *E. coli* BL21(DE3), se plaquearon en cajas Petri con medio LB agar + Kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 16 h. Las colonias seleccionadas se utilizaron para realizar los primeros ensayos de expresión.

En estos ensayos, cada colonia se inoculó e incubó en tubos con 5 ml de LB-Kanamicina (50 µg/ml) durante 16 h a 37°C y 200 RPM (MRC Orbital Shaker Incubator). Luego con 500 µl de estos cultivos se inocularon matraces con 50 ml de medio LB-Kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C y 200 RPM hasta alcanzar una OD₆₀₀=0.6-1.0. Previo a la inducción con 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), se tomó una muestra del cultivo (FNI) y, posteriormente, se incubaron durante 16 h a 25°C y se tomaron muestras para determinar la Proteína Total (PT), Fracción Soluble (FS) e insoluble (FI). Las muestras se centrifugaron a 12,000 RPM durante 5 minutos y se recuperó el paquete celular. Para la

determinación de la proteína total, la biomasa de una muestra se resuspendió con 30 μ l de H₂O y 10 μ l de amortiguador Laemmli 4x (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 8% beta-mercaptoetanol y 0.02% azul de bromofenol). Para determinar la FS y FI, se lisó el paquete celular con 30 μ l de BugBuster (Merck), las muestras se mantuvieron en agitación por 20 min y luego se centrifugaron a 13,000 RPM por 30 min a 4°C. El sobrenadante (30 μ l) se pasó a un tubo Eppendorf nuevo y se agregaron 10 μ l de amortiguador Laemmli 4x, mientras que a la fracción insoluble se le agregaron 30 μ l de amortiguador de solubilización y 10 μ l de amortiguador Laemmli 4x, para finalmente hervir todas las muestras colectadas y tratadas durante 5 min a baño María y se almacenaron a -20°C hasta su análisis mediante SDS-PAGE.

Para conservar las clonas seleccionadas de cada construcción, se inocularon 50 ml de medio líquido LB-Kanamicina (50 μ g/ml) con una colonia de *E. coli* BL21(DE3) recombinante. El cultivo se incubó a 37°C y 200 RPM hasta una OD₆₀₀ entre 0.6-1.0. Se tomaron 7.5 ml de cultivo y se diluyeron con glicerol hasta alcanzar una concentración final de 25% de glicerol, se alicuotaron asépticamente en 10 tubos de crioconservación y se almacenaron a -80°C.

Para mejorar la expresión de las PPlasas recombinantes en la fracción soluble, se realizaron diversos ensayos de expresión modificando la concentración de inductor, la temperatura y la composición del medio de cultivo. Estos ensayos se realizaron inoculando matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio 2TY + Kanamicina (50 μ g/ml) con glicerol de cada clona recombinante almacenados a -80°C. Los matraces se incubaron a 37°C y 200 RPM (MRC Orbital Shaker Incubator) hasta una OD₆₀₀=0.6-1.0 y se tomaron muestras (FNI) antes de agregar el inductor (0.1 mM de IPTG), posterior a la adición de IPTG, los cultivos se incubaron durante 20 h a 18°C. Se tomaron muestras para determinar PT, FS y FI como se describió previamente y se analizaron por SDS-PAGE y Western-Blot. La biomasa de cada cultivo se recuperó y se almacenó a -80°C.

7.1.5. Purificación de las PPlasas recombinantes

Una vez seleccionadas las mejores condiciones de cultivo para la expresión soluble de las PPlasas, el cultivo se escaló a 500 ml de medio, se incubó a 37°C y 200 RPM hasta una $OD_{600}=0.6-1.0$ y la proteína recombinante se indujo con 0.1 mM de IPTG durante 20 h a 18°C. La biomasa se recuperó por centrifugación a 10,000 RPM (Sorvall Lynx 6000, rotor F12-6X500 LEX) a 4°C durante 30 minutos, se resuspendió en PBS 1X y se centrifugó a 13,000 RPM (Sorvall Lynx 6000, rotor A27-8x50) durante 30 minutos a 4°C. La biomasa se resuspendió en amortiguador de lisis (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, glicerol 5%, PMSF 1 mM, lisozima [1 mg/ml], pH 7.5) y se incubó durante 30 minutos a 37°C, se sometió a 3 ciclos de sonicación de 30 segundos y 30 segundos de incubación en hielo entre cada ciclo (Sonic Dismembrator 550 de Thermo Scientific, 40% de potencia). Posteriormente, se agregó DNAsa (0.001 mg/ml) y después de 30 minutos a 30°C se centrifugó a 13,000 RPM durante 30 minutos a 4°C. Las PPlasas TcCyP19-CBM2 y TcCySEC-CBM2 se purificaron a partir del sobrenadante (fracción soluble), mientras que TcCyP22-CBM2 se purificó a partir de los CI (fracción insoluble).

La fracción insoluble de la TcCyP22-CBM2 se lavó cinco veces, dos con amortiguador de lavado I (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.1 M, urea 2 M, tritón X-100 al 1%, EDTA 1 mM), dos con amortiguador de lavado II (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM y urea 4 M) y un quinto lavado con amortiguador de lavado III (Tris 20mM). Para solubilizar los CI, la fracción insoluble se resuspendió en Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, glicerol al 1%, urea 8 M (amortiguador A8) durante toda la noche.

Previamente a la etapa de purificación, las muestras se pasaron por filtros de PVDF 0.45 μm (Whatman), para eliminar agregados o partículas suspendidas. TcCYP19-CBM2 y TcCySEC-CBM2 se purificaron utilizando columnas de níquel-sefarosa preempacadas HisTrap FF de un mililitro (Cytiva) y el sistema de cromatografía NGC. La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de amortiguador A (Tris 20 mM, NaCl 0.5 M, glicerol al 5%, imidazol 10 mM, azida de sodio 0.02%, Cocktail de inhibidores de proteasas [SIGMAFAST protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free]), posteriormente, se inyectó la muestra y se realizaron lavados de la columna con 12 CV con 100% de amortiguador A y 10 CV con 6% de amortiguador B (Tris

20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, azida de sodio 0.02%, glicerol al 5%, cocktail de inhibidores de proteasas). Luego, se realizó un gradiente con 10 CV de 6% a 50% de amortiguador B y finalmente 10 CV de 100% de amortiguador B. Las fracciones seleccionadas se analizaron mediante SDS-PAGE.

TcCyP22-CBM2 se purificó en condiciones desnaturalizantes en una columna de níquel-sefarosa HisTrap FF de 5 ml y previo a su elución la concentración de urea se disminuyó hasta 1 M para favorecer su replegamiento. Esta purificación y replegamiento se llevó a cabo en un cromatógrafo ÄKTA Avant 150 (Cytiva). Para ello la columna se equilibró con 5 CV de amortiguador A8 (Tris 20 mM, NaCl 0.5 M, glicerol al 1%, urea 8 M, Tween-20 0.05 mg/ml), se inyectó la muestra, se realizaron lavados con 15 CV de amortiguador A, seguido de lavados con 15 CV con 6% de amortiguador B8 (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, glicerol al 5%, urea 8 M, imidazol 500 mM, Tween-20 0.05 mg/ml y β -mercaptoetanol 1 mM). Posteriormente, se equilibró con 5 CV de amortiguador C (Tris 20 mM, NaCl 0.5M, glicerol al 5%, GSSH 0.4 mM, GSH 2 mM, urea 8 M, Tween-20 0.05 mg/ml). Para disminuir la concentración de urea, se realizó un gradiente de replegamiento con 20 CV de amortiguador C-D (0-100% de D) (Tris 20 mM, NaCl 0.5 M, glicerol al 5%, GSSH 0.4 mM, GSH 2 mM, Tween-20 0.05 mg/ml, urea 1 M). Adicionalmente, se pasaron 5 CV de 100% de amortiguador D, y la proteína eluyó con 5 CV de 100% de amortiguador E (Tris 20 mM, NaCl 0.5M, glicerol al 5%, imidazol 500 mM, azida de sodio 0.2%, urea 1 M, Tween-20 0.05 mg/ml).

Finalmente, se realizó un cambio de amortiguador para su almacenamiento (Tris 20 mM, NaCl 150 mM y glicerol al 30%), mediante una cromatografía de filtración en gel en columnas PD10 usando el protocolo sugerido por el proveedor (Cytiva). Previo a la adición de la muestra de proteína, la columna PD10 se equilibró con 4 CV del amortiguador de almacenamiento (24 ml), se adicionaron 2.5 ml de la proteína purificada por afinidad a Ni y la proteína se eluyó con 3.5 ml de amortiguador de almacenamiento.

7.1.6. Análisis electroforético SDS-PAGE.

El análisis electroforético (SDS-PAGE) de las diferentes muestras se realizó en geles de poliacrilamida al 10-12%. Las bandas de proteínas se resolvieron a 85 V durante 20 minutos y 110 V durante 1 h (apéndice 3). Después de cada corrida, los geles se tiñeron con una solución 50% (v/v) de metanol, 0.05% (v/v) azul de Coomassie, 10% (v/v) ácido acético, 40% H₂O y, posteriormente, se destiñeron en una solución compuesta por 7% (v/v) ácido acético, 5% (v/v) de metanol y 88% H₂O. Las imágenes se capturaron en un fotodocumentador (Bio-Rad GelDoc) para su posterior análisis.

7.1.7. Western Blot

Para la realización del Western Blot (WB), primero las proteínas se separaron respecto a su peso molecular en un SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%, luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad de 0.22 µm) a 40 V por 20 minutos y 100 V por 1 h. Previo a la adición del anticuerpo primario, la membrana se incubó en una solución de rojo de Ponceau, una vez comprobada la transferencia de las proteínas a la membrana, se lavó con PBS 1X. Y se incubó durante toda la noche a 4°C y 100 RPM en 10 ml de PBS-Tween-20 (0.05%) + 10% de leche descremada. Al día siguiente se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBS + Tween-20 0.05% (PBS-T) y se incubó con el anticuerpo primario (Anti-His) (dilución 1:3000) (Invitrogen) 1 h a 37°C con agitación suave, se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBS-T, se incubó con anticuerpo secundario acoplado a HRP (Bio-Rad) (dilución 1:3000) 1h a 37°C a 100RPM (MRC Orbital Shaker Incubator). Después se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBS-T, y la membrana se incubó en la solución reveladora de 5 a 30 minutos. La reacción se detuvo mediante 3 lavados con agua Mili Q y la imagen se capturó en un fotodocumentador (Bio-Rad GelDoc).

7.1.8. Cuantificación de proteína.

La determinación de la concentración de cada proteína purificada se hizo por el

método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA-Thermo Fisher) en placas de 96 pozos (NEST Biotechnology). En cada pozo se colocaron 25 μ l de muestra y 200 μ l de la mezcla de las soluciones A y B (proporcionadas por el Kit), se incubó durante 30 minutos a 37°C, y la absorbancia se midió a 562 nm en un lector de placas a temperatura ambiente (25°C). La concentración de proteína se determinó tomando como referencia una curva estándar de 25 a 2000 μ g/ml de albúmina de suero de bovino (BSA).

7.1.9. Determinación de la actividad enzimática.

La actividad enzimática de las tres PPIasas recombinantes fusionadas a CBM2 se determinó midiendo la tasa de replegamiento de la enzima RNAsa T1 desnaturalizada mediante la fluorescencia intrínseca a 10°C, siguiendo el protocolo descrito en Zemanova *et al.*, (2020).

8. Resultados

8.1. Determinación de los parámetros fisicoquímicos y solubilidad de las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC, a partir de su secuencia y estructura 3D.

Las secuencias de las tres PPlasas, así como la estructura 3D, se utilizaron para la predicción de solubilidad y agregación. Las predicciones a partir de su secuencia se realizaron en el servidores de Protein-Sol; mientras que el análisis a partir de su estructura tridimensional se realizó en los servidores de CamSol y Agresscan-3D. En las Figuras 3, 4 y 5 se muestran tanto los modelos de la estructura 3D de TcCYP19, TcCyP22 y TcCySEC fusionadas al CBM2 y de las PPlasas sin fusionar al CBM2.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la predicción de los parámetros fisicoquímicos, solubilidad y agregación de las proteínas TcCYP19, TcCyP22 y TcCySEC, así como de las fusionadas a CMB2. Los datos obtenidos para el índice GRAVY (ProtParam [<https://web.expasy.org/protparam/>]) sugieren que estas PPlasas fusionadas al CBM2 tienden a ser más hidrofóbicas. Además, los valores determinados de las predicciones de solubilidad y agregación, tanto respecto a su secuencia como a su estructura 3D, sugieren que las tres proteínas fusionadas al CBM2 tienden a ser menos solubles que las proteínas sin CBM2. Para comprobar lo anterior se expresaron las tres PPlasas fusionadas al CBM2 cuyos resultados se muestran más adelante.

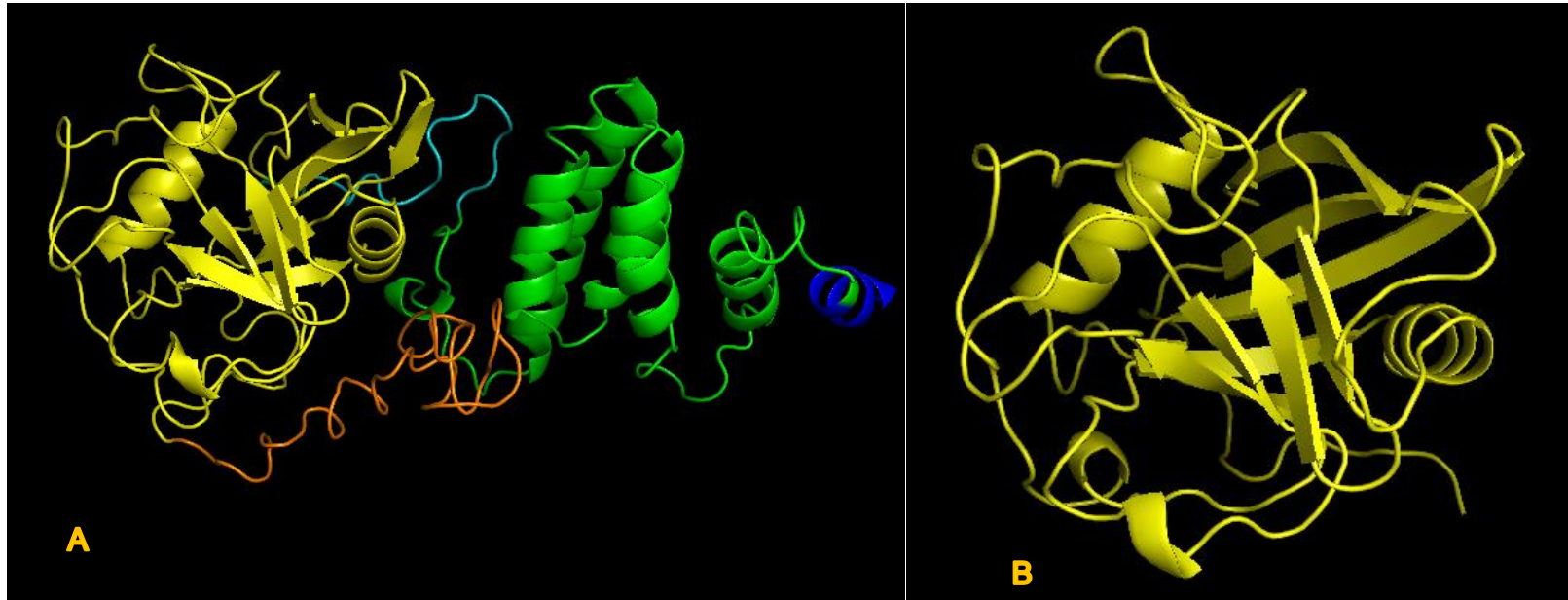


Figura 3. Estructura 3D de TcCyP19-CBM2 y TcCyP19. A) Para la predicción del modelo de la TcCyP19-CBM2 se utilizó el servidor de I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>); la TcCyP19, el péptido señal, el módulo de unión a carbohidratos tipo 2 y la etiqueta de histidinas se identifican con los colores amarillo, naranja, verde y azul, respectivamente; el sitio de corte de trombina y el espaciador PT en color cian. B) El modelo de la estructura 3D de la TcCyP19 se obtuvo del servidor de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). En ambos casos los modelos 3D se visualizaron con PyMOL.

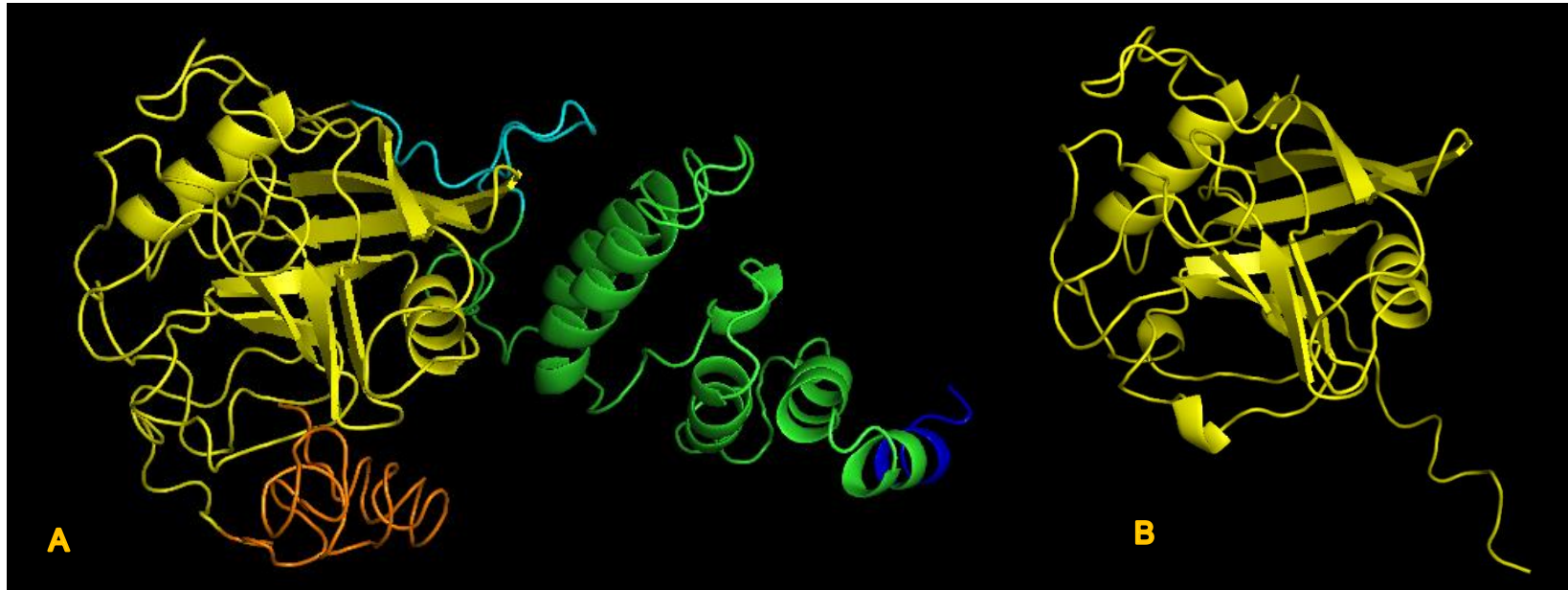


Figura 4. Estructura 3D de TcCyP22-CBM2 y TcCyP22. A) Para la predicción del modelo de la TcCyP22-CBM2 se utilizó el servidor de I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>); la TcCyP22, el péptido señal, el módulo de unión a carbohidratos tipo 2 y la etiqueta de histidinas se identifican con los colores amarillo, naranja, verde y azul, respectivamente; el sitio de corte de trombina y el espaciador PT en color cian. B) El modelo de la estructura 3D de la TcCyP22 se obtuvo del servidor de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). En ambos casos los modelos 3D se visualizaron con PyMOL.

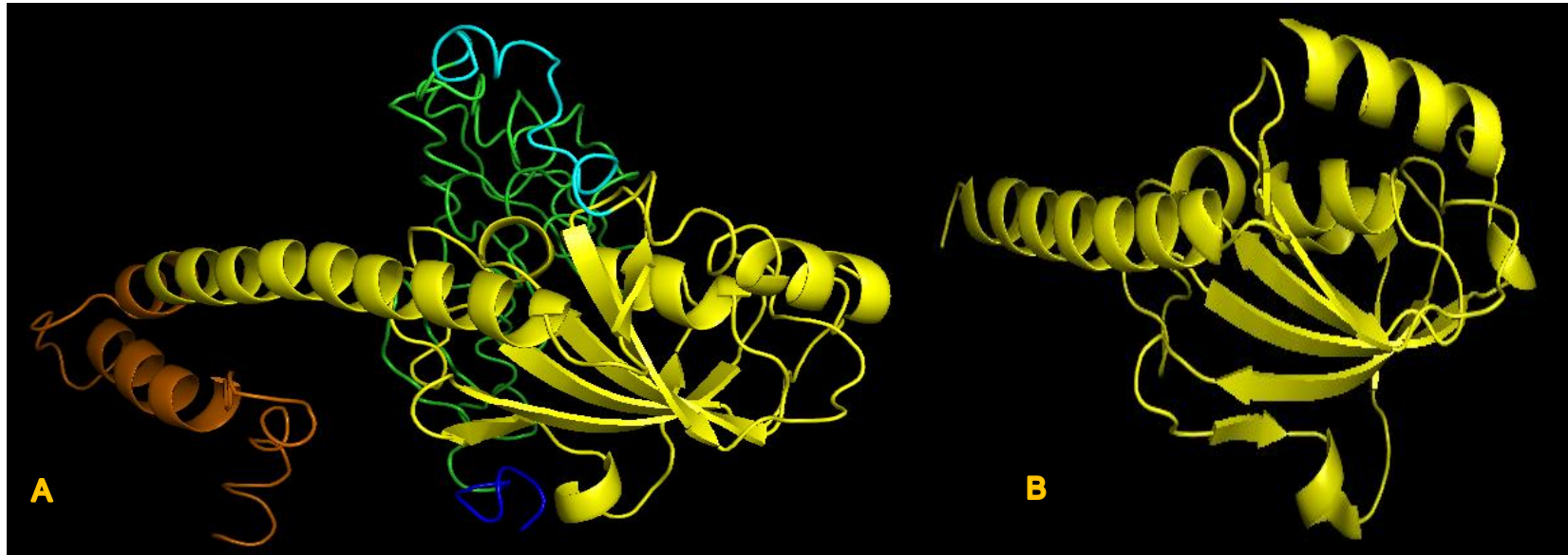


Figura 5. Estructura 3D de TcCySEC-CBM2 y TcCySEC. A) Para la predicción del modelo de la TcCySEC-CBM2 se utilizó el servidor de I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>); la TcCySEC, el péptido señal, el módulo de unión a carbohidratos tipo 2 y la etiqueta de histidinas se identifican con los colores amarillo, naranja, verde y azul, respectivamente; el sitio de corte de trombina y el espaciador PT en color cian. B) El modelo de la estructura 3D de la TcCySEC muestra la estructura cristalizada (PDB:1JVW). En ambos casos los modelos 3D se visualizaron con PyMOL.

Tabla 1. Determinación de parámetros fisicoquímicos y solubilidad a partir de su secuencia de aa y estructura 3D.

<i>Proteína</i>	<i>aa</i>	<i>PM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Coefficiente de Extinción (M⁻¹cm⁻¹)</i>	<i>Abs. 0.1% (1 mg/ml)</i>	<i>Índice de Inestabilidad</i>	<i>Índice Alifático</i>	<i>Gravy</i>	<i>Protein-Sol^a</i>	<i>CamSol 3D^b</i>	<i>Agrescan -3D^c</i>
<i>TcCyp19</i>	177	18.8	8.44	9970	0.531	21.53 (E)	61.19	-0.20	0.47	0.58	-0.79
<i>TcCyp19-CBM2</i>	358	37.1	9.16	37470	1.010	21.44 (E)	61.09	-0.18	0.46	-0.41	-0.46
<i>TcCyp19-CBM2-SPS</i>	316	33	8.33	37470	1.135	19.32 (E)	56.8	-0.25	ND	ND	ND
<i>TcCyp22</i>	196	21.3	9.13	22460	1.051	20.27 (E)	58.27	-0.35	0.51	0.68	-0.76
<i>TcCyp22-CBM2</i>	377	40	9.41	49960	1.259	21.96 (E)	59.58	-0.26	0.37	-0.33	-0.47
<i>TcCyp22-CBM2-SPS</i>	335	36	8.98	49960	1.404	20.02 (E)	55.34	-0.34	ND	ND	ND
<i>TcCySEC</i>	169	19.1	6.19	18450	0.968	43.3(I)	68.11	-0.72	0.58	2.36 ^d	-1.27 ^d
<i>TcCySEC-CBM2</i>	349	37.3	8.78	45950	1.232	32.92 (E)	64.33	-0.44	0.38	0.90	-0.73
<i>TcCySEC-CBM2-SPS</i>	307	33.2	6.92	45950	1.384	32.31 (E)	60.36	-0.55	ND	ND	ND

aa: aminoácidos; PM: Peso Molecular; pI: Punto isoelectrico; ND: No determinado; índice de Inestabilidad >40=Inestable, índice Gravy >0=Más hidrofóbicas GRAVY(Grand Average of hidropathicity); ^a:Solubilidad estimada con Protein-Sol (Soluble >0.45); ^b Solubilidad estimada con CamSol a partir de su estructura 3D (Soluble > 0.0); ^c: Solubilidad estimada con Aggrescan3D a partir de su estructura 3D (Agregación > 0); ^d: Para TcCySEC se utilizó el modelo cristalizado (PDB: ID 1JVW); mientras que para las determinaciones de las otras PPIasas, fueron utilizadas las estructuras 3D de las PPIasas del servidor de AlphaFold.

8.2. Subclonación de los ORFs *tccyp19*, *tccyp22* y *tccysec*

Las construcciones pUC57-TcCyP19, pUC57-TcCyP22 y pUC57-TcCySEC se sometieron a una doble digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* para liberar el inserto que codifica para cada proteína, el cual se purificó y se analizó su calidad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (Figuras 6, 7 y 8) para la subclonación en el vector de expresión pET-38b(+), el cual se obtuvo a partir de la construcción pET-38b(+)-DA.

En la Figura 9 (carriles 1 y 2) se muestra el análisis electroforético en gel de agarosa al 1% del pET-38b(+)-DA purificado, el cual se sometió a doble digestión con las enzimas *NcoI* y *XhoI* (Figura 10) en la que se muestra las bandas correspondientes a los fragmentos del plásmido linealizado (5762 pb) y del DA (555pb). Las bandas del plásmido pET-38b(+) linealizado (Figura 11) y de los ORFs de las tres PPlasas (Figura 6, 7 y 8) se purificaron para proceder a la ligación y obtener las construcciones para la expresión de las PPlasas fusionadas al CBM2.

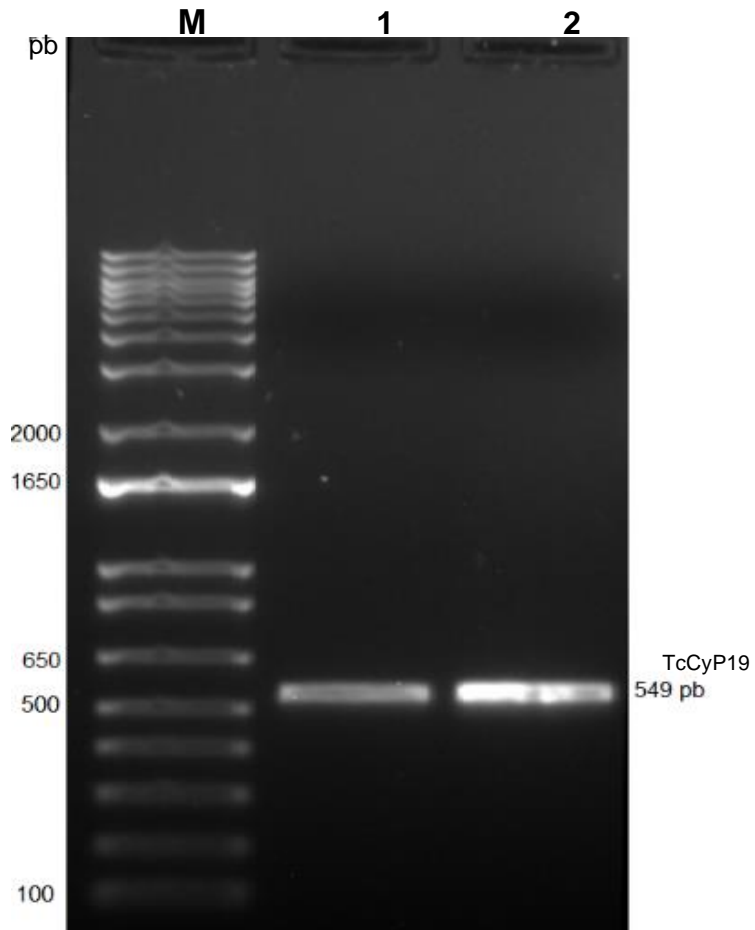


Figura 6. Análisis electroforético del fragmento de DNA que codifica para la TcCyP19. El fragmento se purificó a partir de la doble digestión del plásmido pUC57-TcCyP19 con las enzimas *NcoI* y *XhoI* como se indica en materiales y métodos y se analizó en un gel de agarosa al 1.2%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carriles 1 y 2: fragmentos de DNA que codifica para TcCyP19.

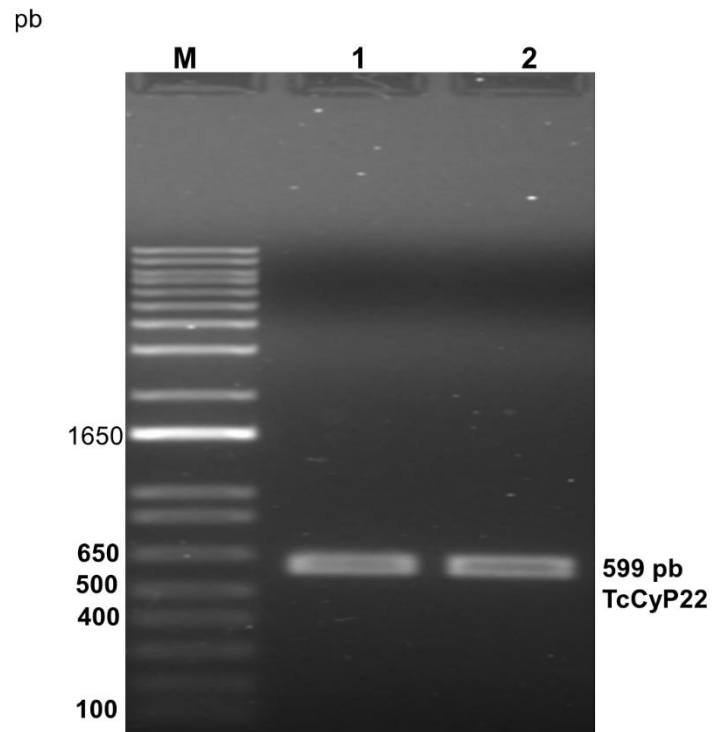


Figura 7. Análisis electroforético del fragmento de DNA que codifica para la TcCyP22. El fragmento se purificó a partir de la doble digestión del plásmido pUC57-TcCyP22 con las enzimas *NcoI* y *XhoI* como se indica en materiales y métodos y se analizó en un gel de agarosa al 1.2%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carriles 1 y 2: fragmentos de DNA que codifica para TcCyP22.

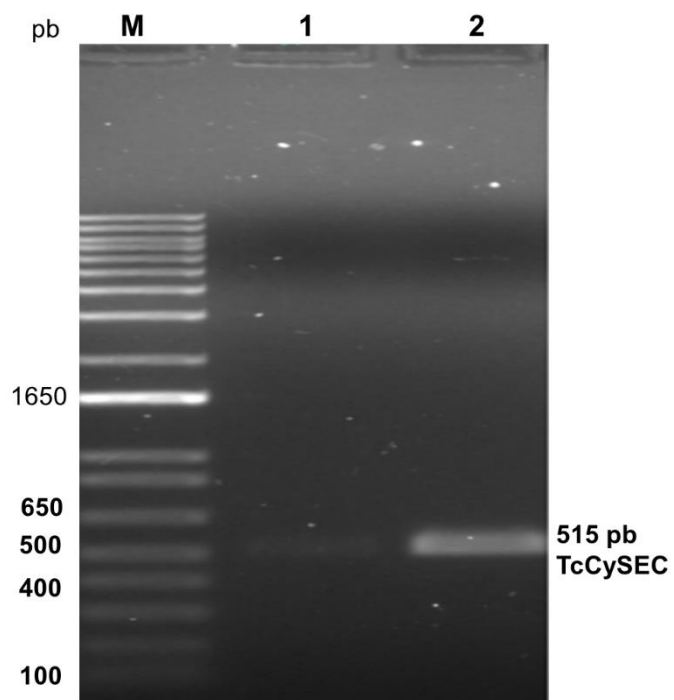


Figura 8. Análisis electroforético del fragmento de DNA que codifica para la TcCySEC. El fragmento se purificó a partir de la doble digestión del plásmido pUC57-TcCySEC con las enzimas *NcoI* y *XhoI* como se indica en materiales y métodos y se analizó en un gel de agarosa al 1.2%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carriles 1 y 2: fragmentos de DNA que codifica para TcCySEC.

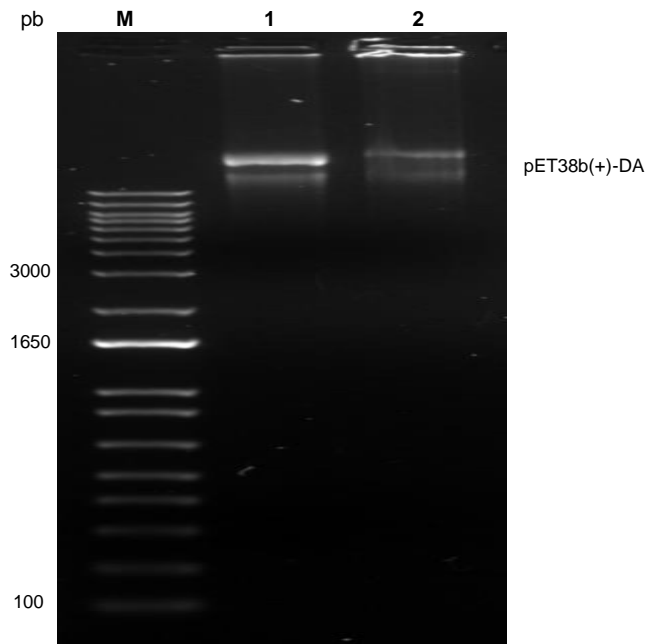


Figura 9. Análisis electroforético del pET-38b(+)-DA. El pDNA se purificó como se detalla en materiales y metodos y se analizó en gel de agarosa 1%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carriles 1 y 2: pET-38b(+)-DA.

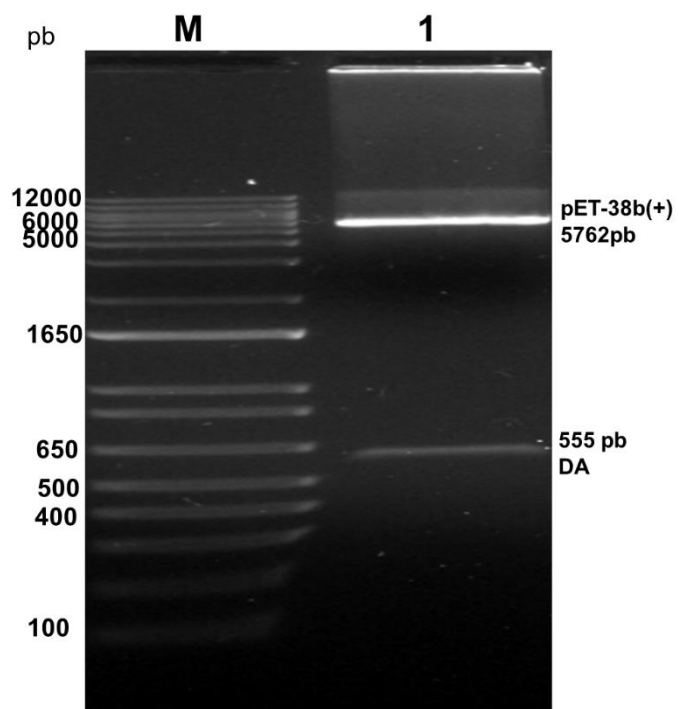


Figura 10. Análisis electroforético de la doble digestión del pET-38b(+)-DA. El pDNA purificado se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* y se analizó en un gel de agarosa 1.2%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carril 1: Doble digestión del pET-38b(+)-DA.

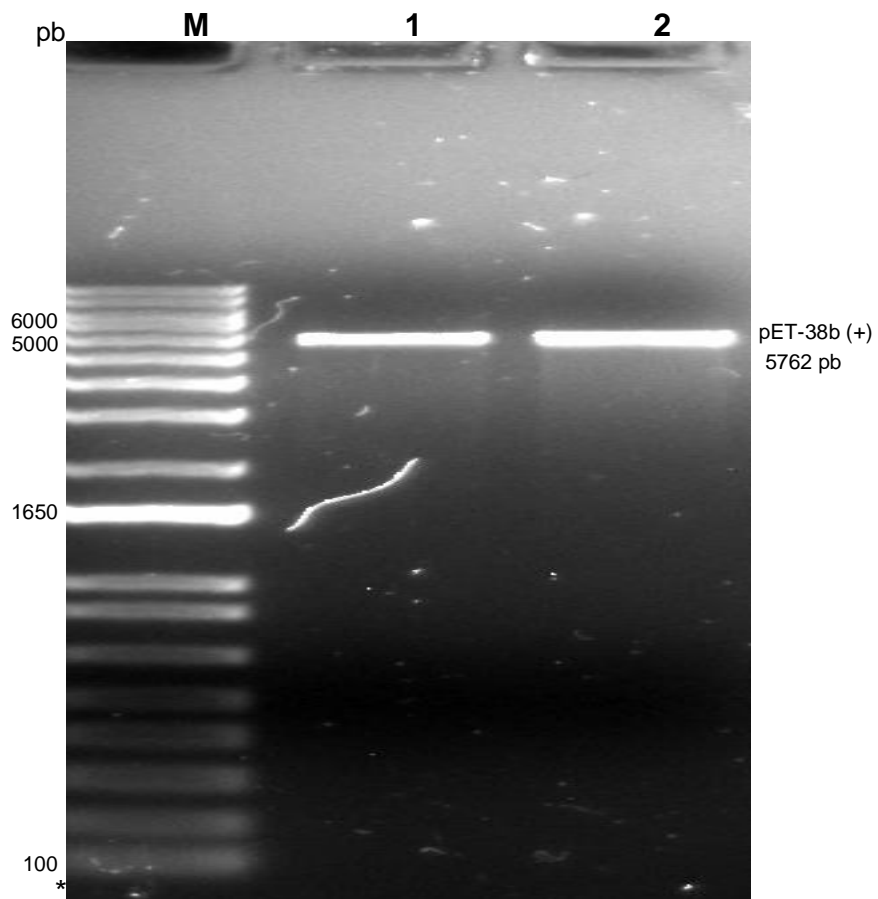


Figura 11. Análisis electroforético del pET-38b(+) linealizado. El fragmento de DNA correspondiente al pET-38b(+) linealizado se purificó como se indica en materiales y métodos y se analizó en gel de agarosa 1%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carril 1 y 2: pET-38b(+) linealizado.

La ligación del vector pET-38b(+) con cada uno de los 3 insertos (*tccyp19*, *tccyp22* y *tccysec*) se realizó en una relación molar 1:3 (vector: inserto) (Apéndice 4). Posteriormente, se realizaron transformaciones de las construcciones pET-38b(+) - TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC, agregándose un control de no ligación y un control positivo de transformación con pDNA de pUC57-TcCySEC.

Para comprobar las transformaciones con cada una de las construcciones, se realizaron extracciones y análisis de los pDNA (Figura 12 y 13), donde se observan que tanto su calidad, como su pureza eran adecuadas para proceder a la verificación mediante doble digestión, las cuales se realizaron con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* (Figura 14, 15 y 16). En estas figuras se observa la liberación de los insertos correspondientes para cada PPlasa y el vector del tamaño esperado, confirmando la correcta subclonación en el vector de expresión pET-38b(+).

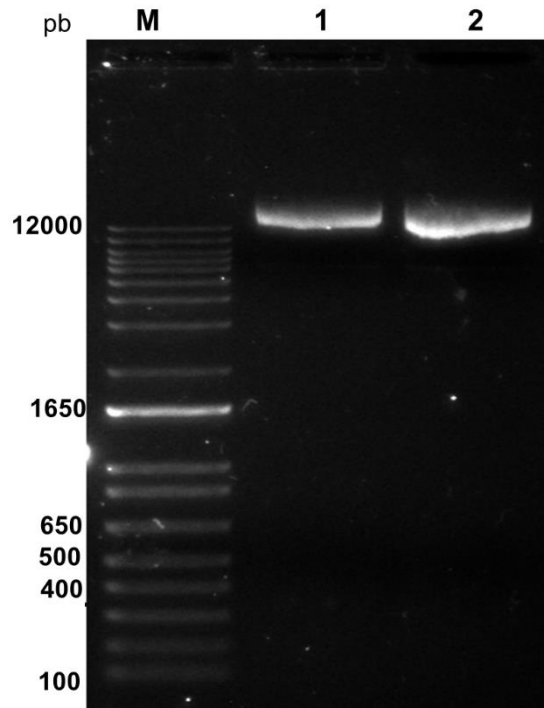


Figura 12. Análisis electroforético de las construcciones pET-38b(+)-TcCyP19 y pET-38b(+)-TcCyP22. Los fragmentos de DNA que codifican para TcCyP19 y TcCyP22 se ligaron al pET-38b(+). El pDNA de clonas transformantes para cada construcción se purificó y se analizó en gel de agarosa 1%, como se indica en materiales y métodos. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carril 1: pET-38b(+)-TcCyP19; Carril 2: pET-38b(+)-TcCyP22. Consultar materiales y métodos para mayor detalle.

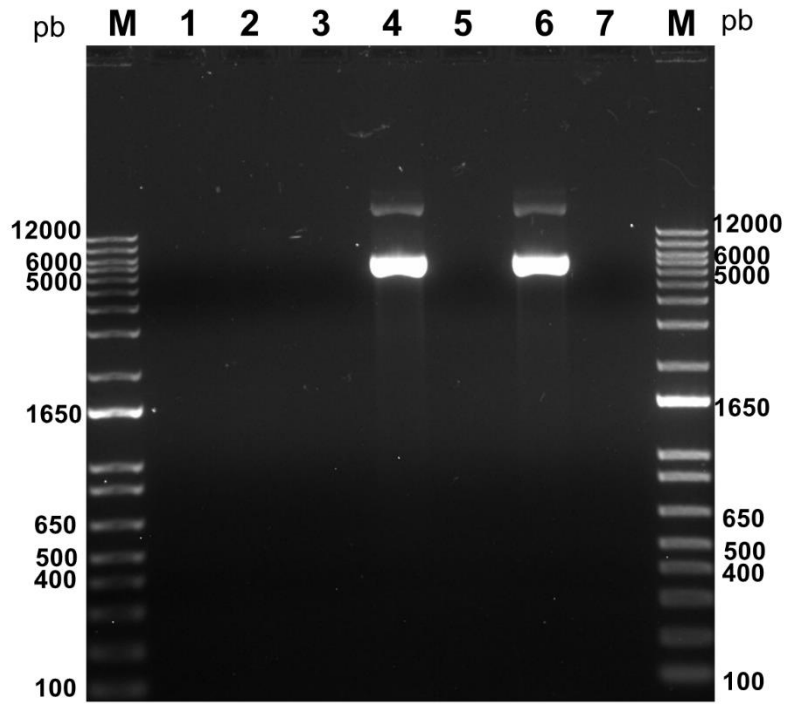


Figura 13. Análisis electroforético de la construcción pET-38b(+)-TcCySEC. El fragmento de DNA que codifica para TcCySEC se ligó al pET-38b(+). El pDNA de clonas transformantes se purificó y se analizó en gel de agarosa 1%, como se indica en materiales y métodos. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7: pDNA purificado.

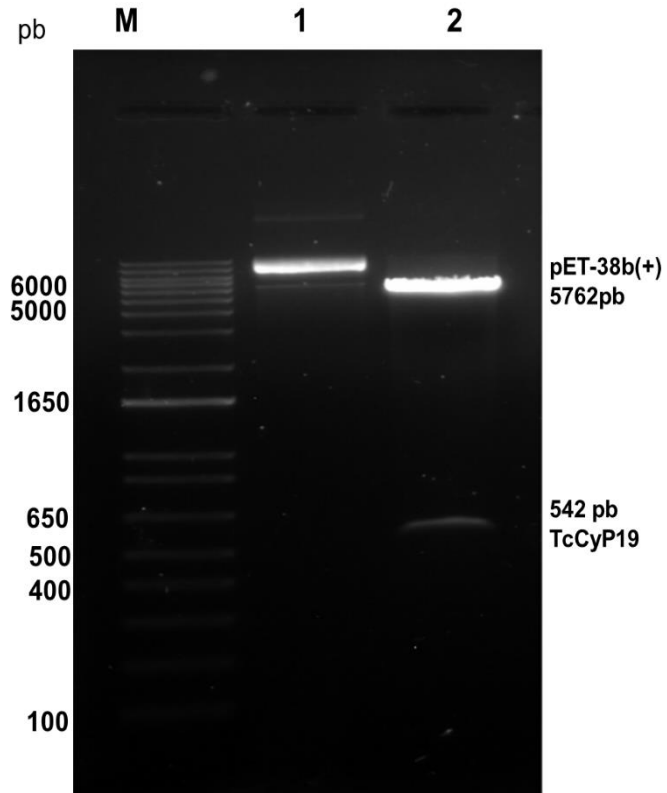


Figura 14. Análisis electroforético de la doble digestión de la construcción pET-38b(+)-TcCyP19. El pDNA purificado se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* y se analizó en un gel de agarosa 1.2%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carril 1: pET-38b(+)-TcCyP19; Carril 2: pET-38b(+)-TcCyP19 digerido.

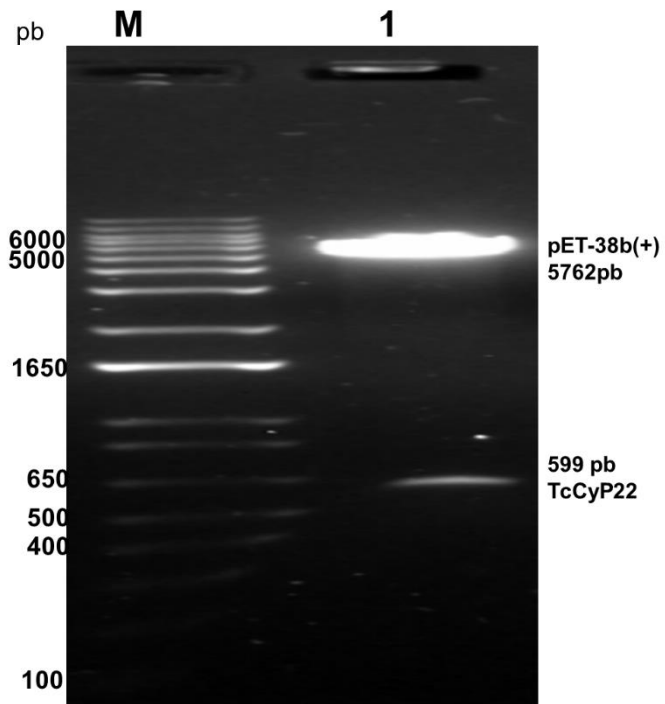


Figura 15. Análisis electroforético de la doble digestión de la construcción pET-38b(+)-TcCyP22. El pDNA purificado se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* y se analizó en un gel de agarosa 1.2%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carril 1: pET-38b(+)-TcCyP22 digerido.

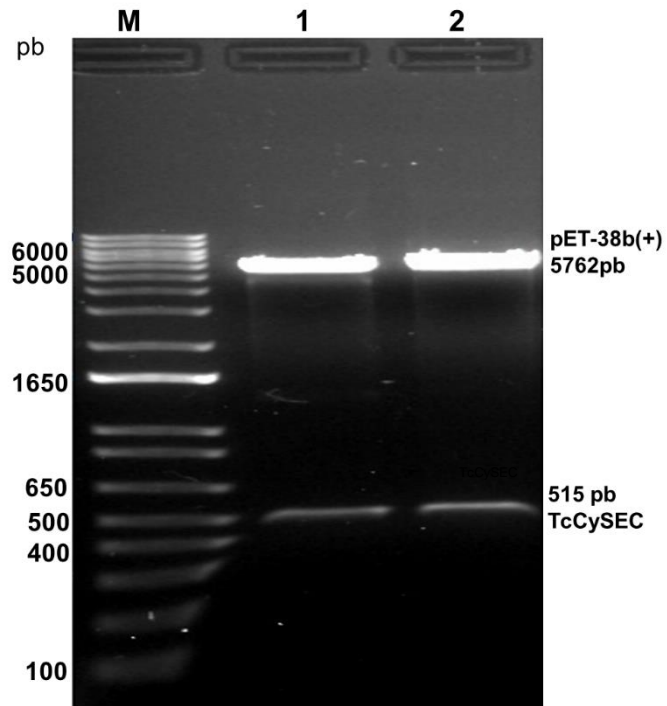


Figura 16. Análisis electroforético de la doble digestión de la construcción pET-38b(+)-TcCySEC. El pDNA purificado se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* y se analizó en un gel de agarosa 1.2%. M: Marcador de pares de base 1 kb Plus DNA Ladder; Carril 1 y 2 pET-38b(+)-TcCySEC digerido de dos clones seleccionadas.

8.3. Expresión de las PPlasas recombinantes fusionadas a CBM2

Una vez confirmadas las construcciones de las tres PPlasas en el vector de expresión pET-38b(+), células quimio-competentes de *E. coli* BL21(DE3) se transformaron con cada una de las construcciones y se analizó la expresión de las proteínas recombinantes siguiendo las metodologías anteriormente descritas. En la Figura 17 se muestra el análisis SDS-PAGE de la expresión de las PPlasas TcCyP19-CBM2, TcCySEC-CBM2 y TcCyP22-CBM2, respectivamente. Como se puede observar, a las condiciones de inducción utilizadas de 25°C con 1 mM de IPTG por 16h, la expresión de las PPlasas tiende a ser mayoritariamente insoluble.

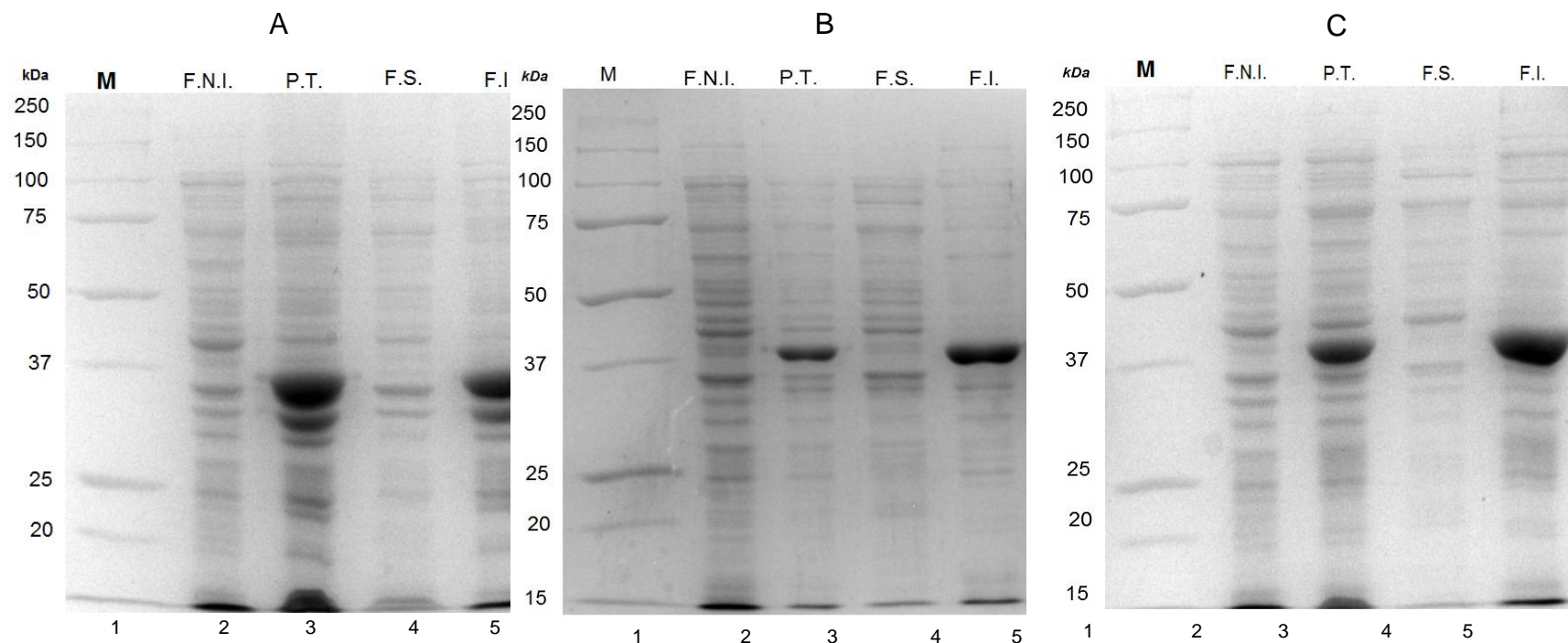


Figura 17. Expresión de las PPIasas recombinantes fusionadas a CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10%, de la expresión de la PPIasa TcCyP19-CBM2 (A), TcCySEC-CBM2 (B) y TcCyP22-CBM2 (C) inducida con 1 mM de IPTG durante 16 h a 25°C en medio LB-Kanamicina (50 µg/ml). Carril 1: Marcadores de peso molecular "Precision Plus Protein Standard" en kDa; Carril 2: Fracción no inducida (FNI); Carril 3: Proteína total (PT); Carril 4: Fracción soluble (FS); Carril 5: Fracción insoluble (FI).

8.4. Mejoramiento de la expresión soluble de las PPlasas recombinantes.

Para mejorar la expresión soluble de las tres PPlasas recombinantes, la temperatura del cultivo durante la inducción se cambió a 18°C y se probaron dos concentraciones de IPTG: 1 y 0.1 mM. El análisis SDS-PAGE de la expresión de la TcCyP19-CBM2 (Figura 18), TcCySEC-CBM2 (Figura 19) y TcCyP22-CBM2 (Figura 20) muestran que la inducción con 0.1 mM de IPTG mejoró la expresión soluble de las proteínas TcCyP19-CBM2 y TcCySEC-CBM2. Sin embargo, aún con estas modificaciones la proteína TcCyP22-CBM2 solo se expresó en la fracción insoluble.

Para corroborar estos resultados se realizó un análisis por Western Blot. En la Figura 21, se observa un mejor reconocimiento del anticuerpo a bandas de proteína en las fracciones solubles inducidas a 0.1 mM de IPTG de TcCySEC-CBM2 y TcCyP19-CBM2, mientras que para la TcCyP22-CBM2 no hubo cambio y solo se observa el reconocimiento del anticuerpo en la banda correspondiente a la fracción insoluble.

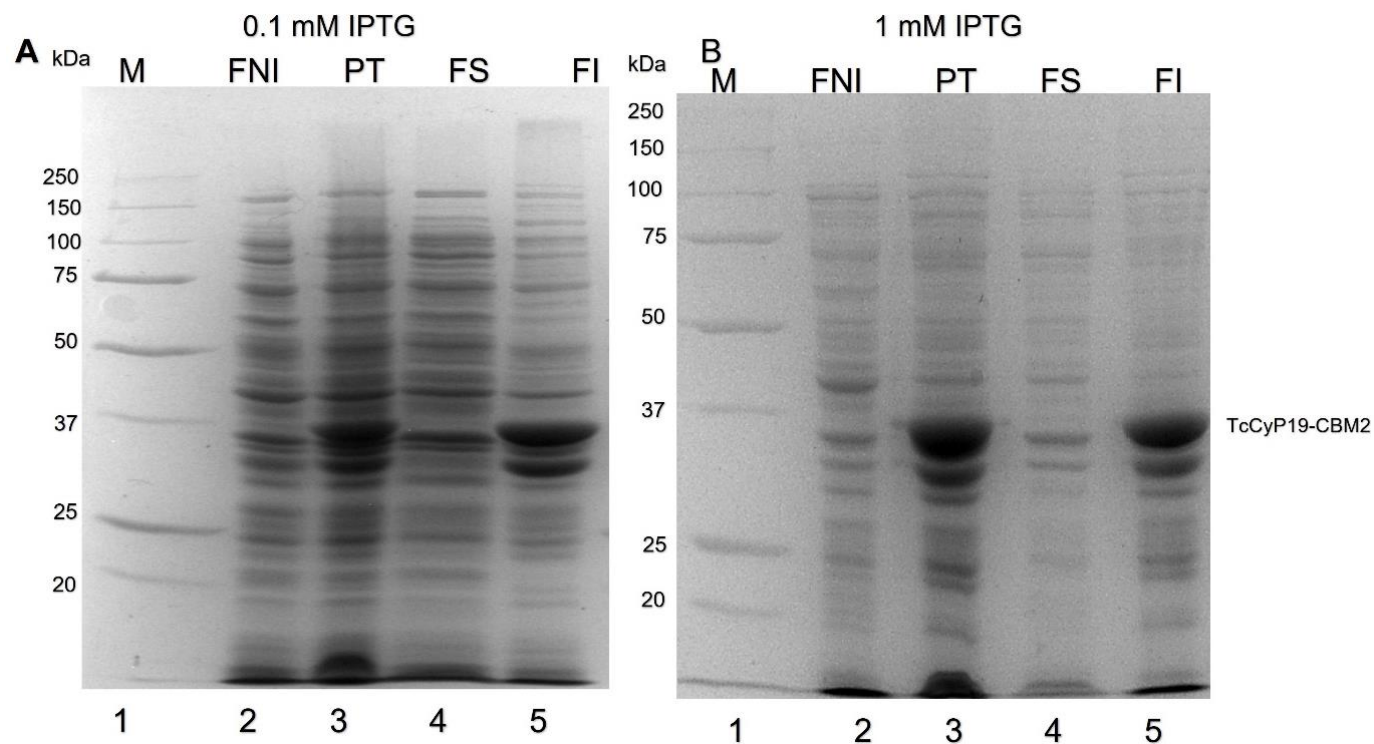


Figura 18. Expresión de TcCyP19-CBM2 a diferentes condiciones de cultivo e inducción. Análisis electroforético SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. A) Inducción con 0.1 mM de IPTG a 18°C en medio 2TY. B) Inducción con 1 mM de IPTG a 25°C en medio LB. Carril 1: Marcadores de peso molecular “Precision Plus Protein Standard” en kDa; Carril 2: Fracción no inducida (FNI); Carril 3: Proteína total (PT); Carril 4: Fracción soluble (FS); Carril 5: Fracción insoluble (FI).

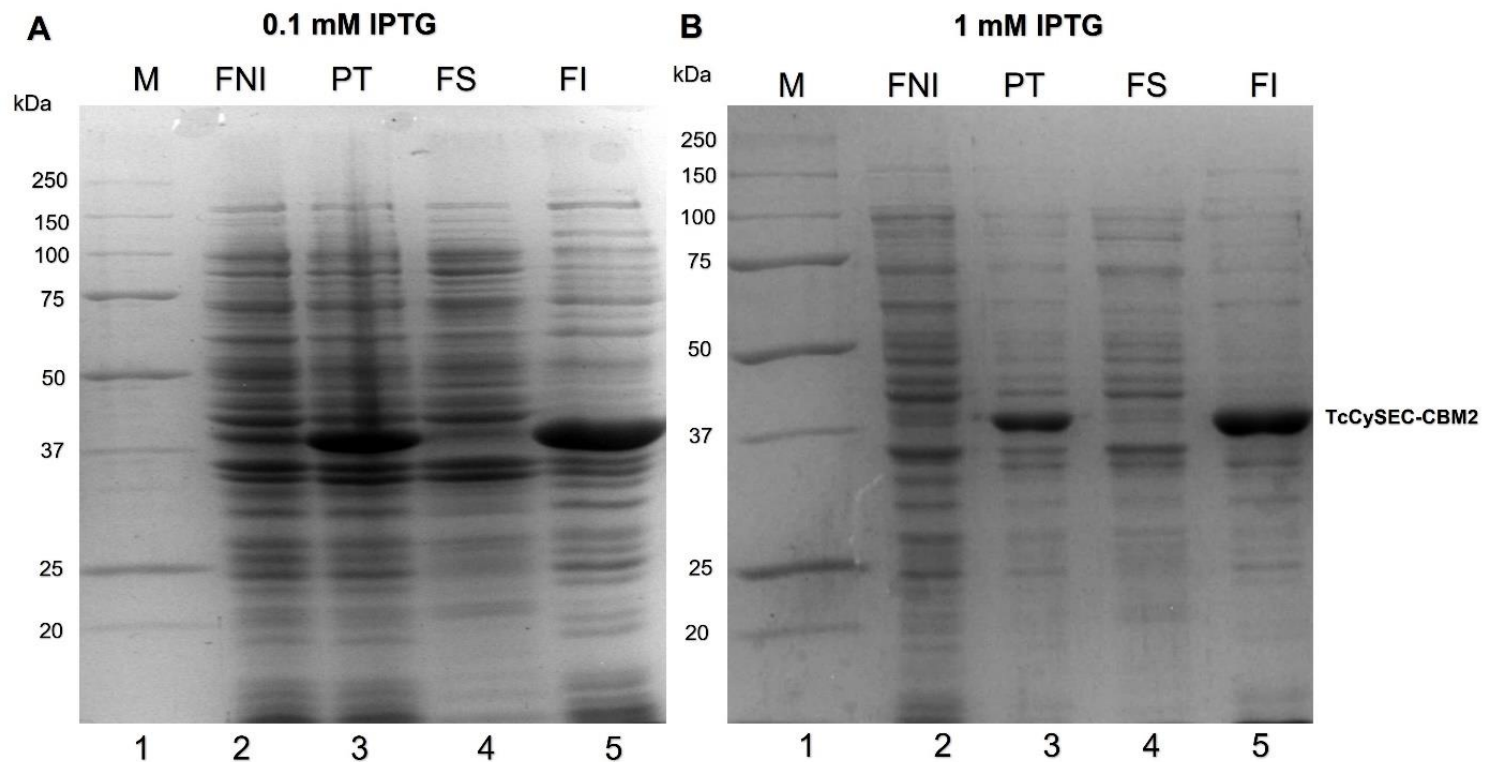


Figura 19. Expresión de TcCySEC-CBM2 a diferentes condiciones de cultivo e inducción. Análisis electroforético SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. A) Inducción con 0.1 mM de IPTG a 18°C en medio 2TY. B) Inducción con 1 mM de IPTG a 25°C en medio LB. Carril 1: Marcadores de peso molecular "Precision Plus Protein Standard" en kDa; Carril 2: Fracción no inducida (FNI); Carril 3: Proteína total (PT); Carril 4: Fracción soluble (FS); Carril 5: Fracción insoluble (FI).

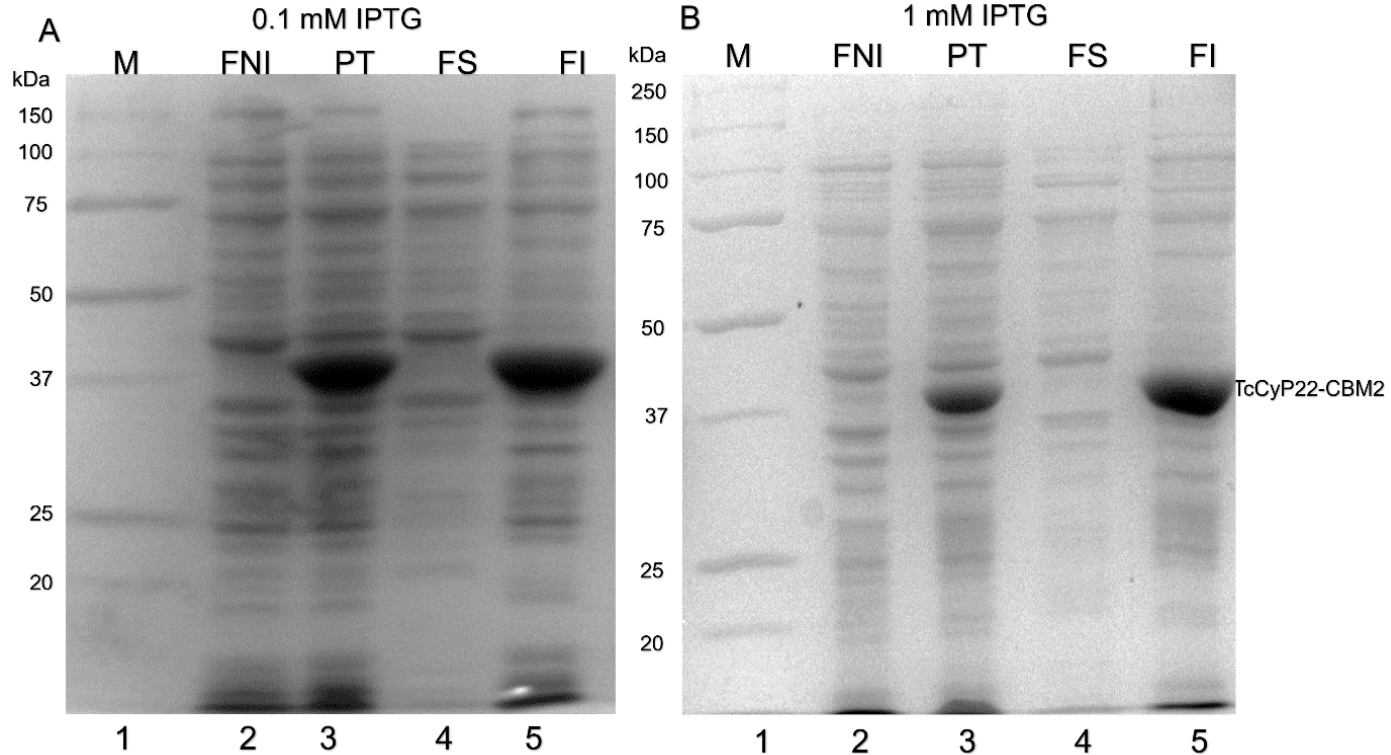


Figura 20. Expresión de TcCyP22-CBM2 a diferentes condiciones cultivo e inducción. Análisis electroforético SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. A) Inducción con 0.1 mM de IPTG a 18°C en medio 2TY. B) Inducción con 1 mM de IPTG a 25°C en medio LB. Carril 1: Marcadores de peso molecular “Precision Plus Protein Standard” en kDa; Carril 2: Fracción no inducida (FNI); Carril 3: Proteína total (PT); Carril 4: Fracción soluble (FS); Carril 5: Fracción insoluble (FI).

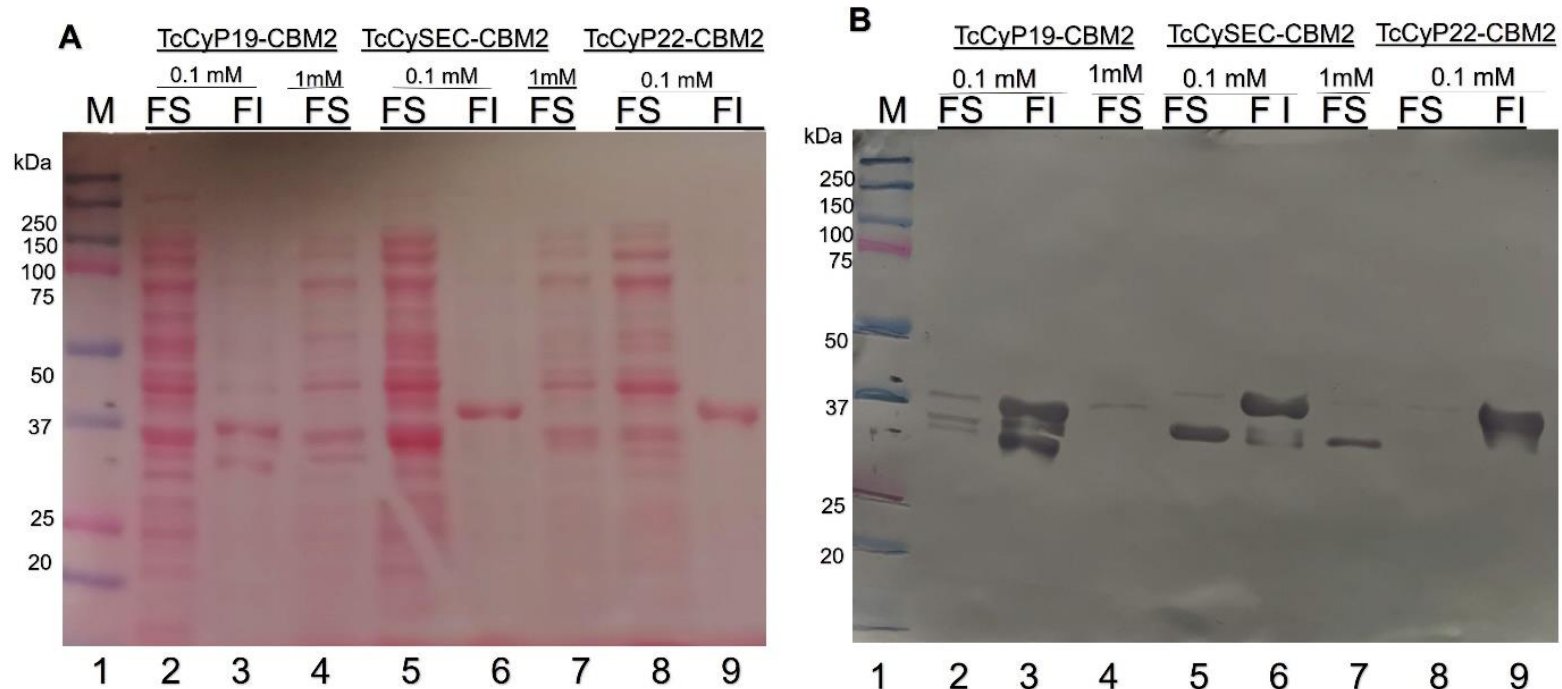


Figura 21. Análisis por Western Blot de la expresión de TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC fusionadas a CBM2. A) Membrana teñida con rojo de Ponceau. B) Inmunodetección con el anticuerpo anti-HisTag. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa; Carril 2: Fracción soluble de TcCYP19 inducida con 0.1 mM de IPTG; Carril 3: Fracción insoluble de TcCYP19 inducida con 0.1 mM de IPTG; Carril 4: Fracción soluble de TcCYP19 inducida con 1 mM de IPTG; Carril 5: Fracción soluble de TcCySEC inducida con 0.1 mM de IPTG; Carril 6: Fracción insoluble de TcCySEC inducida con 0.1 mM de IPTG; Carril 7: Fracción soluble de TcCySEC inducida con 1 mM de IPTG; Carril 8: Fracción soluble de TcCYP22 inducida con 0.1 mM de IPTG; Carril 9: Fracción insoluble de TcCYP22 inducida con 0.1 mM de IPTG.

8.5. Purificación de las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC fusionadas a CBM2

Para la purificación de las proteínas recombinantes se partió de la biomasa recuperada después de 20 h de inducción con 0.1 mM de IPTG a 18°C y 200 RPM en cultivos de 0.5 L en medio 2TY. Una vez que se recuperó la biomasa, se analizó la expresión para cada proteína mediante SDS-PAGE (Figuras 22 y 23). Tanto TcCySEC-CBM2, como TcCyP19-CBM2 se purificaron a partir de la fracción soluble, mientras que la TcCyP22-CBM2 se purificó a partir de la fracción insoluble en condiciones desnaturalizantes.

Una vez lisada la biomasa, se separó la fracción soluble y se filtró utilizando membranas de PVDF 0.45µm y se inyectó a una columna de afinidad a Ni²⁺ acoplada al cromatógrafo NGC. En la Figura 24 se muestra el perfil cromatográfico de la purificación de la TcCySEC-CBM2 donde se observan dos picos de absorbancia a 280 nm (línea azul). Las fracciones colectadas se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 25), donde se observan fracciones eluidas que contenían a la proteína de interés. A estas fracciones se les cambió a amortiguador de almacenamiento mediante una cromatografía de filtración en gel en columnas PD10, se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 26), donde se observa un doblete en la mayoría de las muestras analizadas.

El mismo protocolo se siguió con la TcCyP19-CBM2. En la Figura 27 se muestra el perfil cromatográfico de la purificación, donde se observan 3 picos de absorbancia a 280 nm (línea azul). Las fracciones colectadas se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 28). De igual forma, se realizó un cambio de amortiguador mediante cromatografía de filtración en gel y se analizó mediante SDS-PAGE (Figura 29). De manera similar a la TcCySEC-CBM2, las muestras purificadas de TcCyP19-CBM2 muestran 3 bandas de proteína que sugiere procesamiento de ambas proteínas, posiblemente del péptido señal, ya que el His-tag para su purificación se encuentra en el C-terminal. Estos resultados son consistentes con lo observado en el reconocimiento del anticuerpo anti-HisTag en el WB de fracciones solubles e insolubles de ambas proteínas (Figura 25). Ambas proteínas purificadas se almacenaron hasta la determinación de actividad PPlasa.

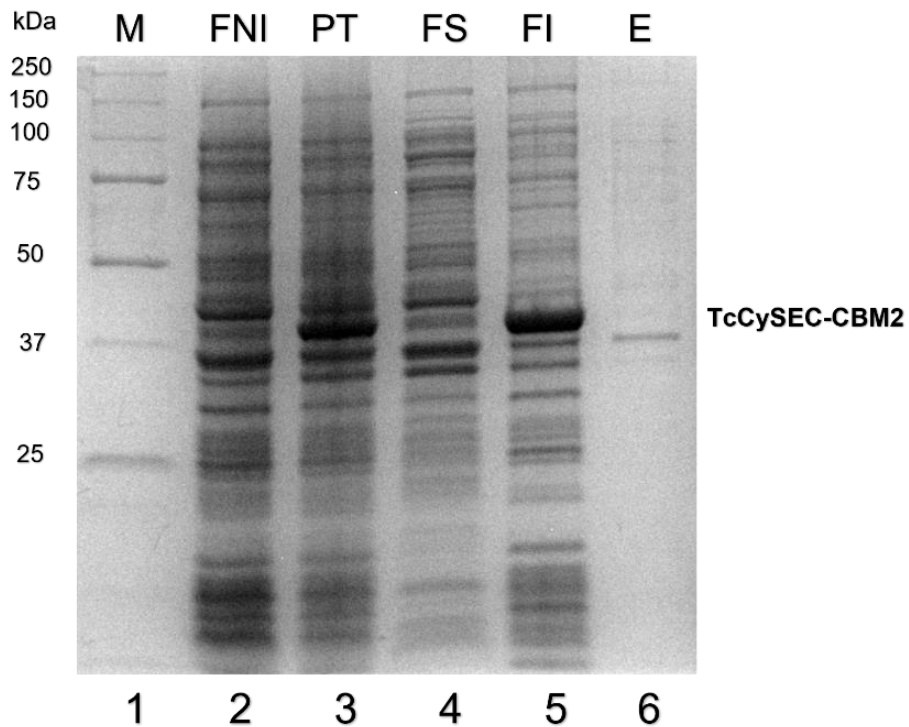


Figura 22. Expresión de TcCySEC fusionada a CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%, de la expresión de la proteína recombinante TcySEC-CBM2 en 0.5 L de medio 2TY e inducida con 0.1mM de IPTG durante 20 h a 18°C y 200 RPM. Carril 1: Marcador de peso molecular “Precision Plus Protein Standard” en kDa; Carril 2: Fracción no inducida (FNI); Carril 3: Proteína total (PT); Carril 4: Fracción soluble (FS); Carril 5: Fracción insoluble (FI); Carril 6: Fracción recuperada del medio de cultivo (E).

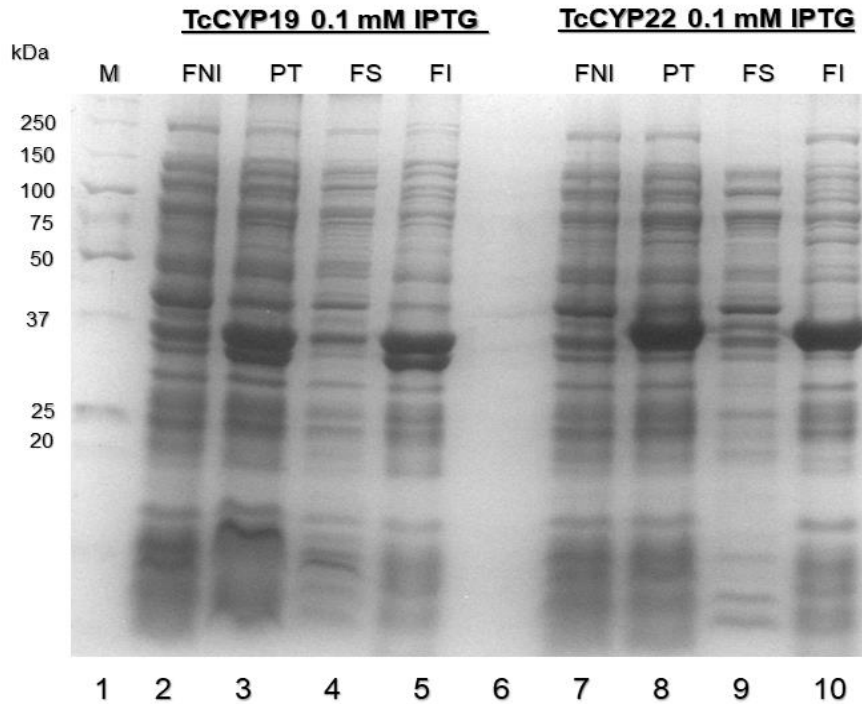


Figura 23. Expresión de TcCyP19 y TcCyP22 fusionadas a CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%, de la expresión de las proteínas recombinantes TcCyP19-CBM2 (carriles 2-5) y TcCyP22-CBM2 (carriles 7-10) en 0.5 L de medio 2TY e inducidas con 0.1 mM de IPTG a 18°C y 200 RPM durante 20 h. Carril 1: Marcadores de peso molecular “Precision Plus Protein Standard” en kDa; Carriles 2 y 7: Fracción no inducida (FNI); Carriles 3 y 8: Proteína total (PT); Carriles 4 y 9: Fracción soluble (FS); Carriles 5 y 10: Fracción insoluble (FI).

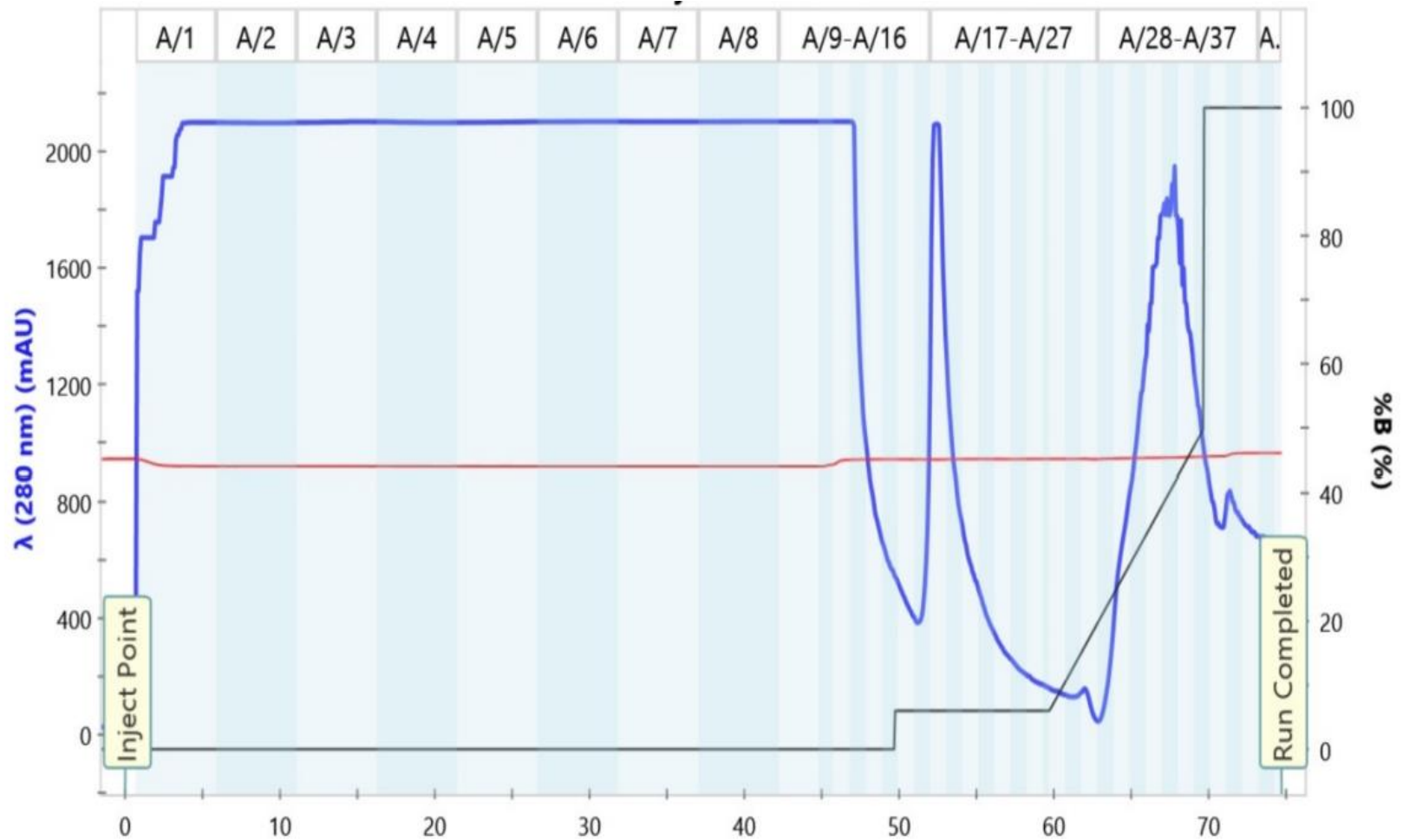


Figura 24. Cromatograma de la purificación de TcCySEC-CBM2 recombinante. La purificación se realizó utilizando cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (Ni^{2+}) en NGC Chromatography System como se indica en materiales y métodos. Línea azul: Absorbancia a 280 nM (mAU); Línea roja: Conductividad (mS/cm); Línea negra: % amortiguador B.

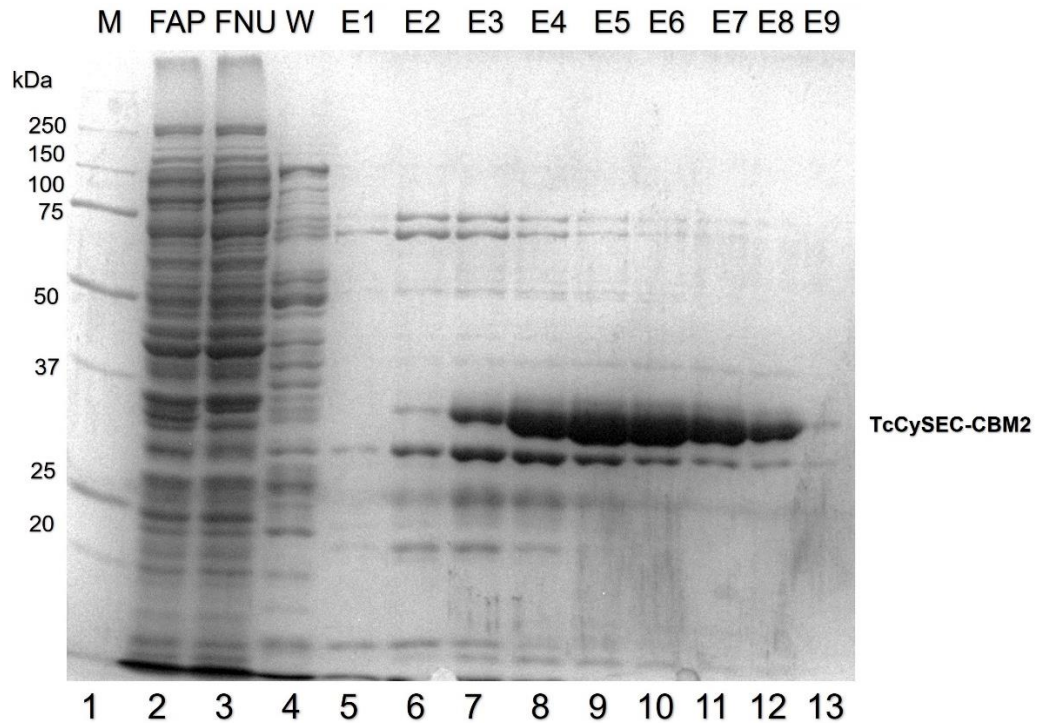


Figura 25. Purificación de TcCySEC-CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%, de la purificación de la proteína recombinante TcCySEC-CBM2 a partir de la fracción soluble. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa; Carril 2: Fracción soluble (FAP); Carril 3: Fracción no unida (FNU) ; Carril 4: Lavado con 6% de amortiguador B (W); Carril 5-13: Eluciones (E) con 20% hasta 100% de amortiguador B.

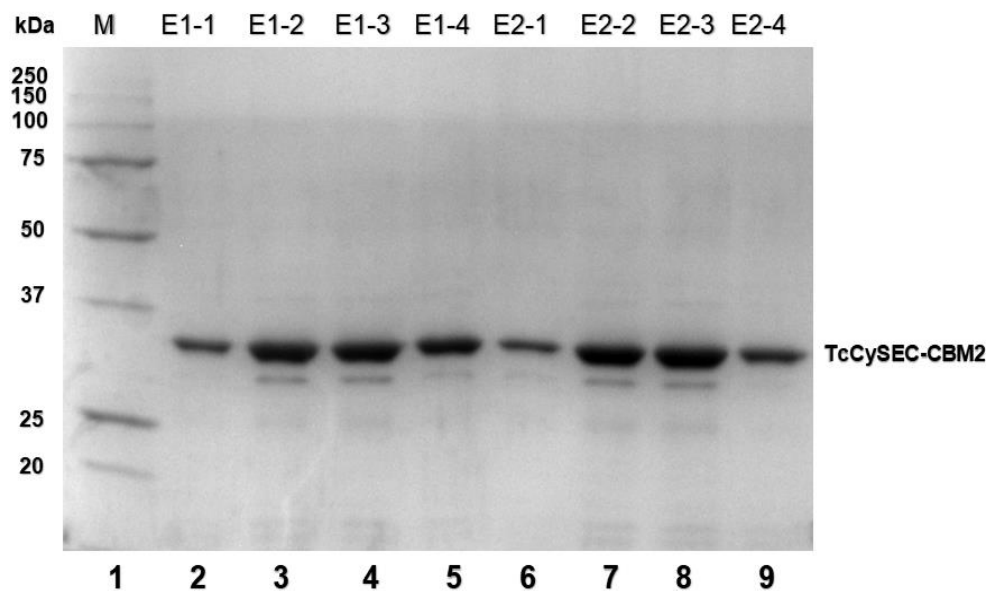


Figura 26. Cambio de amortiguador de TcCySEC-CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%, del cambio de amortiguador de la proteína recombinante TcCySEC-CBM2. Las fracciones colectadas fueron cambiadas de amortiguador mediante cromatografía de filtración en gel en columnas PD10. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa; Carriles 2-9: Eluciones recuperadas tras cambiar de amortiguador.

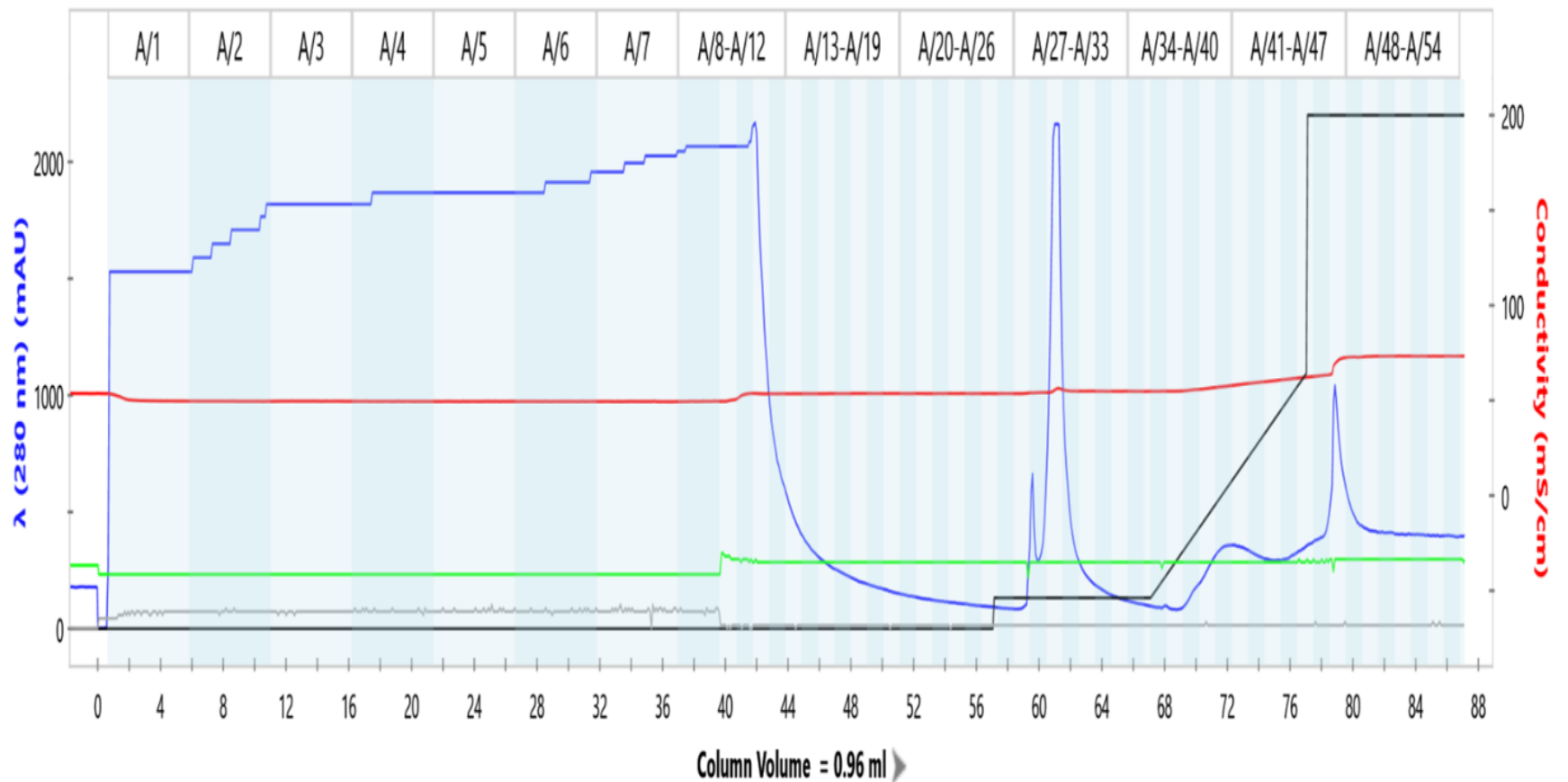


Figura 27. Cromatograma de la purificación de TcCyP19-CBM2 soluble La purificación se realizó utilizando cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (Ni^{2+}) en NGC Chromatography System como se indica en materiales y métodos. Línea azul: Absorbancia a 280 nm (mAU); Línea roja: Conductividad (mS/cm); Línea negra: %amortiguador B; Línea verde: Presión del sistema.

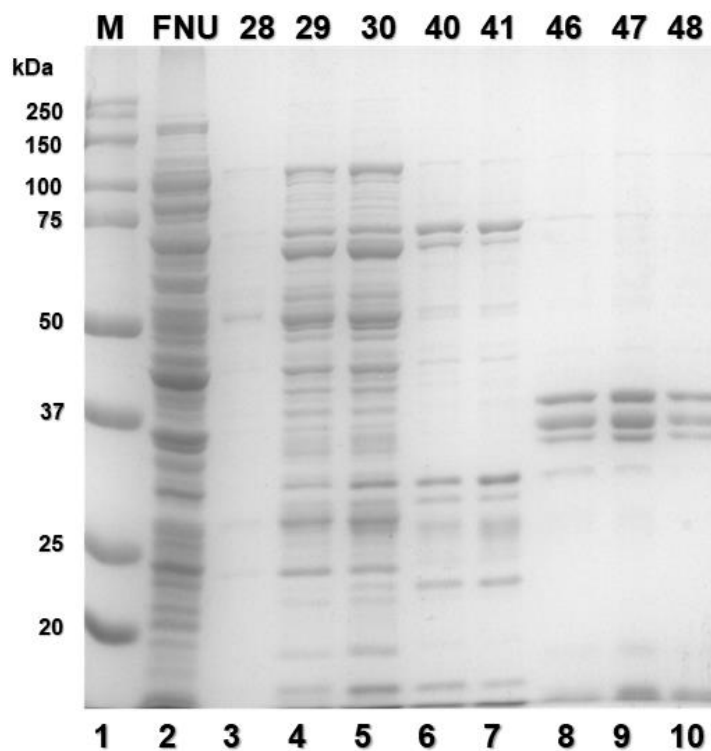


Figura 28. Purificación de TcCyP19-CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%, de la purificación de la proteína recombinante TcCyP19-CBM2 a partir de la fracción soluble. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa; Carril 2: Fracción no unida (FNU); Carriles 3, 4 y 5: Lavados con 6% de amortiguador B; Carriles 6 y 7: Eluciones de proteínas utilizando gradiente de amortiguador B (6%-50%); Carriles 8, 9 y 10: Eluciones con 100% de amortiguador de elución B (500mM de Imidazol).

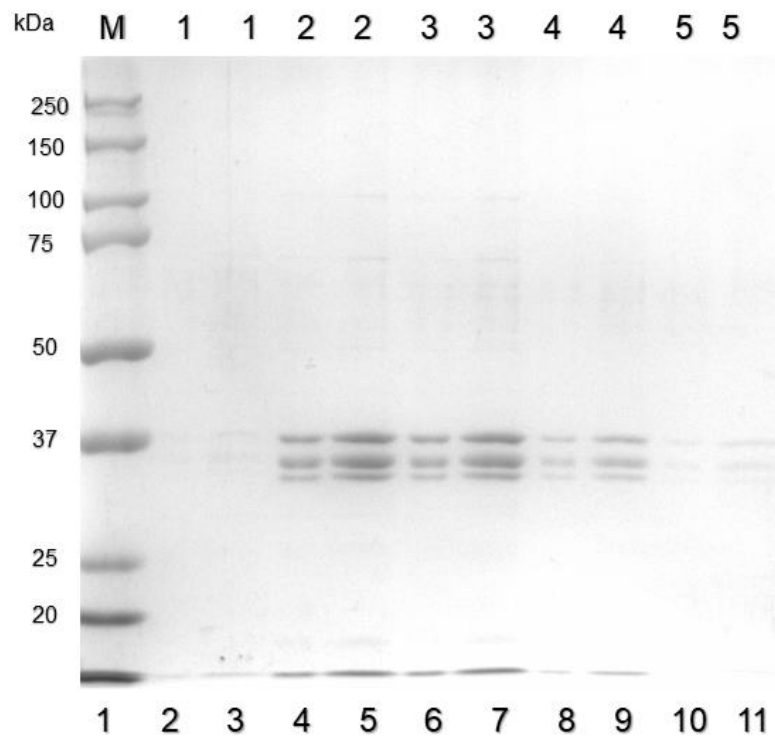


Figura 29. Cambio de amortiguador de TcCyP19-CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%, del cambio de amortiguador de la proteína recombinante TcCyP19-CBM2. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa; Carriles 2-11: Eluciones recuperadas tras cambiar de amortiguador.

Sin embargo, debido a que la TcCyP22-CBM2 se expresó en la fracción insoluble se purificó en condiciones desnaturalizantes. Los CI se aislaron y solubilizaron en 8M de urea. La proteína recombinante se purificó por afinidad a Ni²⁺ y se replegó disminuyendo la concentración de urea en la misma columna previo a su elución, como se detalla en materiales y métodos.

En la Figura 30 se muestra el perfil cromatográfico de la purificación y replegamiento cromatográfico de TcCyP22-CBM2. Las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia se colectaron y analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 31) donde se pueden observar bandas de proteína con el peso molecular esperado para la TcCyP22-CBM2 en las fracciones correspondiente a la elución. De igual forma que para las PPIasas purificadas de la fracción soluble, TcCyP22-CBM2 replegada se cambió a amortiguador de almacenamiento.

Previo a la determinación de la actividad enzimática se cuantificó la proteína purificada de las tres PPIasas recombinantes mediante el ensayo de BCA. La cantidad y concentración de proteína obtenidas fueron aproximadamente 3mg de TcCySEC-CBM2, 0.9 mg de TcCyP19-CBM2 y 7.5 mg de TcCyP22-CBM2, suficiente para la determinación de su actividad enzimática.

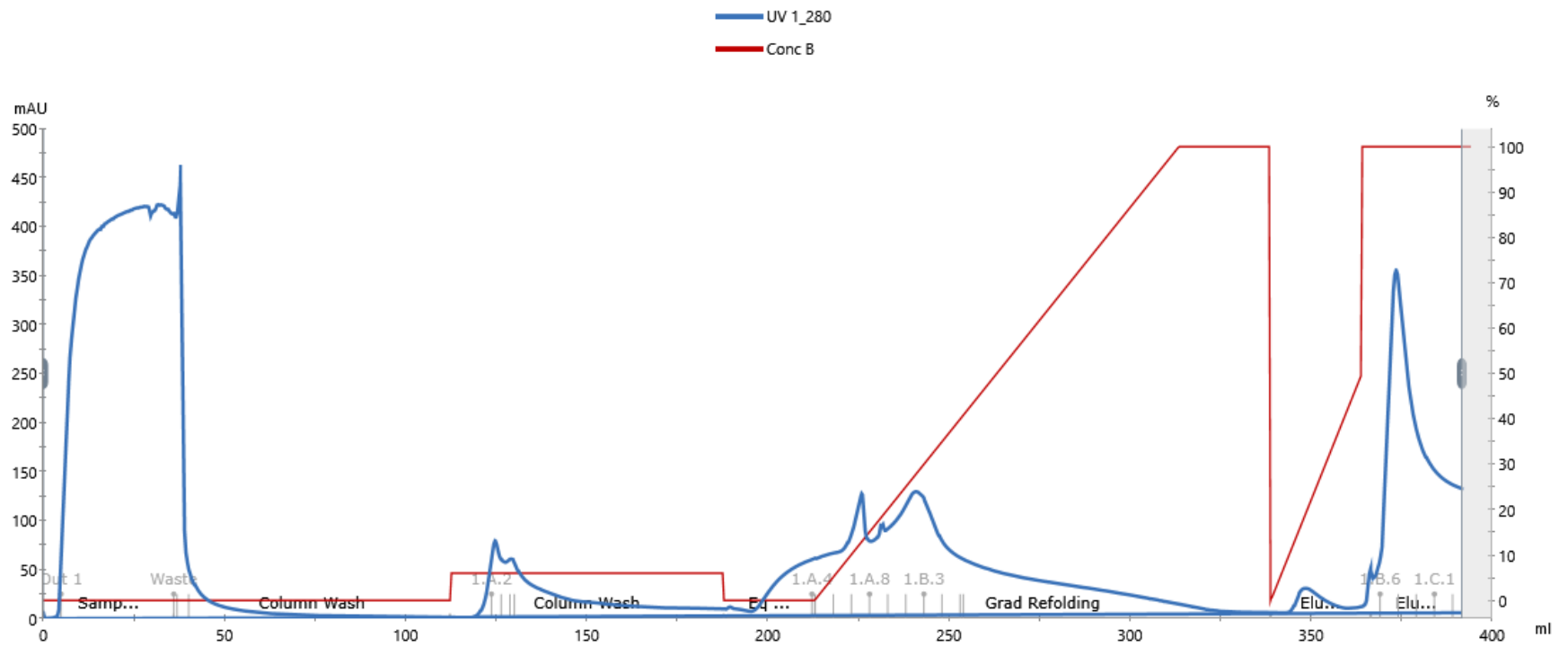


Figura 30. Purificación y replegamiento cromatográfico de TcCyP22-CBM2. La purificación se realizó en ÄKTA Avant 150 (GE). Línea azul: Absorbancia a 280nm (mAU); Línea roja: % amortiguador B.

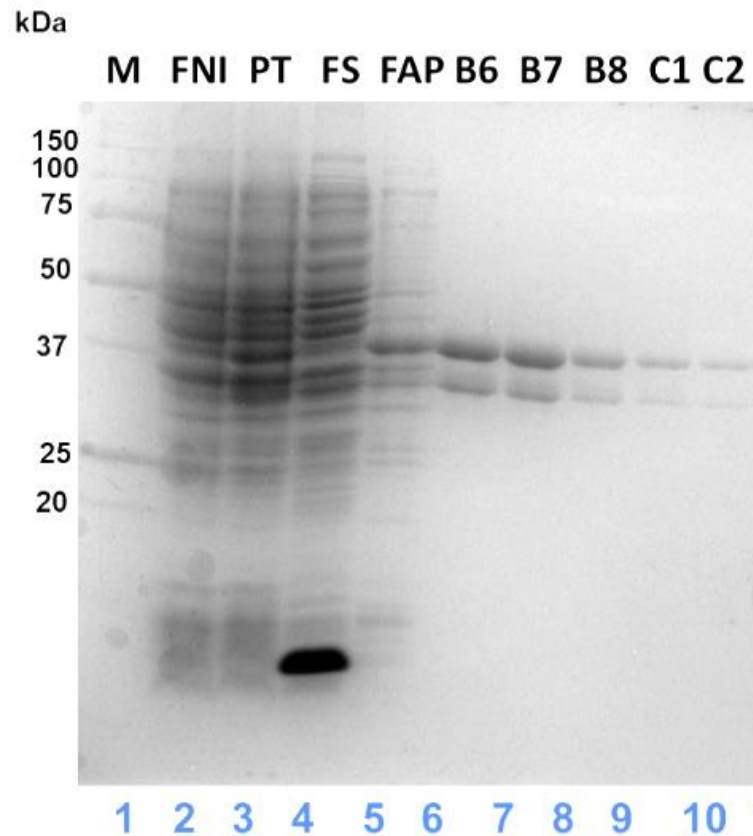


Figura 31. Expresión y purificación de TcCyP22-CBM2. Análisis electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%, de la purificación de la proteína recombinante TcCyP22-CBM2. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa; Carril 2: Fracción no inducida (FNI); Carril 3: Proteína total tras la inducción (PT); Carril 4: Fracción soluble a partir de cuerpos de inclusión (FS); Carril 5: Fracción antes de purificar (FAP); Carriles 6-10: Eluciones con 100% de amortiguador E.

8.6. Determinación de la actividad PPlasa mediante el ensayo de la RNAsa T1.

La actividad enzimática de las tres PPlasas recombinantes fusionadas a CBM2 se determinó midiendo la tasa de replegamiento de la enzima RNAsa T1 (Zemanova *et al.*, 2020) desnaturalizada mediante la fluorescencia intrínseca a 10°C. En la Figura 32 se muestran la gráfica de intensidad de fluorescencia relativa (IFR) (CPS) (símbolos) en función del tiempo en segundos (s) de los primeros segundos (fase lineal) para cada PPlasa. Como se puede apreciar en la gráfica, la línea de mayor pendiente fue la TcCyP19-CBM2, seguida de la TcCySEC-CBM2 y la pendiente de la TcCyP22-CBM2, ligeramente superior a la del control negativo DA-CBM2 (sin PPlasa). En la Tabla 2 se muestran los valores estimados de actividad enzimática específica ($\Delta F/s \cdot \text{nmol}$) de las tres PPlasas recombinantes; TcCyP19-CBM2 (22450 $\Delta F/s \cdot \text{nmol}$) > TcCySEC-CBM2 (7535 $\Delta F/s \cdot \text{nmol}$) > TcCyP22-CBM2 (2293 $\Delta F/s$).

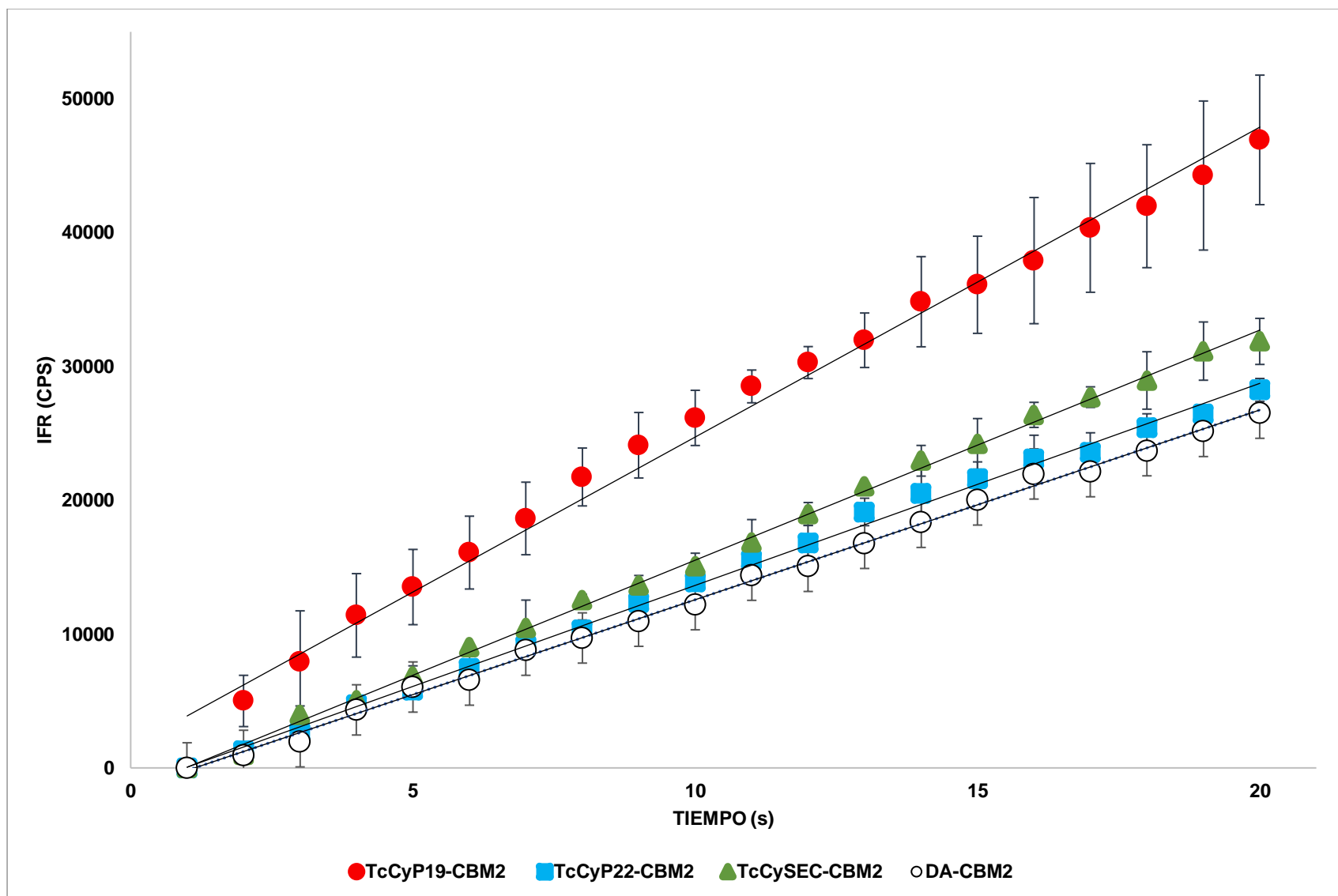


Figura 32. Cinéticas de replegamiento de RNAsa T1 asistida con PPlasas recombinantes fusionadas a CBM2. Cada punto en la gráfica representa el promedio de los datos obtenidos de las repeticiones de cada ensayo. En forma de barras se indica la desviación estándar de cada uno de los puntos.

Tabla 2. Actividad enzimática de las PPlasas recombinantes.

PPlasa	Concentración (nM).	$\Delta F/s$	$\Delta F_{PP/s} - \Delta F_C/s$	nmoles PPlasa	$\Delta F/s \text{ nmol}$
Control (No PPlasa)	0	1603	NA	0	NA
DA-CBM2	40	1418	NA	0.040	NA
TcCyP19-CBM2	40	2316	898	0.040	22450
TcCyPSEC-CBM2	40	1719	301.4	0.040	7535
TcCyP22-CBM2	40	1510	91.7	0.040	2293

ΔF : Intensidad de Fluorescencia relativa; PP: Asistida con PPlasa C: No asistida con PPlasa

9. Discusión.

Los análisis bioinformáticos son una herramienta valiosa para predecir el comportamiento y/o expresión de las proteínas. En el caso de las PPlasas recombinantes, al compararse las fusionadas al CBM2 respecto a las no fusionadas, los análisis bioinformáticos predecían que probablemente serían más insolubles al estar fusionadas. Jiménez-Guerra, en el 2022, había reportado predicciones de solubilidad de las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC, en las cuales sugerían la expresión soluble de las tres PPlasas. No obstante, solamente fueron solubles TcCyP19 y TcCySEC recombinantes, por lo que, con base en ambas predicciones, la expresión de las PPlasas TcCyP19-CBM2 Y TcCySEC-CBM2 se esperaban en menor concentración en la fracción soluble. De acuerdo con los resultados de Jiménez-Guerra, 2022, TcCyP22-CBM2 tendería a ser insoluble, mismo que sería comprobado con los análisis por electroforesis SDS-PAGE mostrados anteriormente.

Los análisis *in silico* a partir de las secuencias de aa, sugerían a la TcCyP19-CBM2 como la más soluble, sin embargo, a partir de las estructuras 3D los mejores puntajes fueron para TcCySEC-CBM2. Al momento de expresarlas se comprobó que TcCySEC-CBM2 era más soluble que TcCyP19-CBM2, por lo que en este caso particular la mejor predicción fue a partir de la estructura 3D.

En el caso de las predicciones de estructuras 3D en los diversos servidores, aún faltan pulir algunos aspectos respecto a estructuras desordenadas. Es un nicho de investigación relevante que solamente TcCySEC/MIP (1JVW), y una ciclofilina (1XO7) son las únicas PPlasas de *T. cruzi* que a la fecha se han cristalizado. Además, TcCySEC ya se ha clonado y expresado en *E. coli*, realizándose ensayos de actividad PPlasa ($k_{cat}/K_m=745/mM/s$). Sin embargo, se ha utilizado una metodología diferente a la realizada en este proyecto, por lo que sería una comparación inválida (Moro *et al.*, 1995).

Por otro lado, TcCyP19 también se ha expresado en *E. coli*, y se ha utilizado en ensayos de actividad PPlasa. Además, se han realizado ensayos de inhibición por CsA, sin embargo, los datos aún no se han reportado (Búa *et al.*, 2001).

Por último, TcCyP22 se ha logrado purificar a partir del procesamiento del parásito

mediante afinidad a CsA (Potenza *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2018). Sin embargo, no se había expresado como proteína recombinante de forma soluble (Jiménez-Guerra, 2022).

Los cambios en la composición del medio, así como los cambios en las condiciones de inducción (medio 2TY, 0.1 mM de IPTG a 18°C durante 20 h) mejoraron la expresión en la fracción soluble de las proteínas recombinantes TcCyP19-CBM2 y TcCySEC-CBM2, lo que permitió su purificación en su conformación nativa y catalíticamente activa. Sin embargo, la TcCyP22-CBM2 en todas las condiciones probadas solo se expresó en la fracción insoluble de donde finalmente se purificó en condiciones desnaturalizantes y se replegó para determinar su actividad enzimática.

Estos resultados son consistentes con los reportados en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, donde se expresaron y purificaron a las tres PPlasas sin fusionar al CBM2 (Jiménez-Guerra, 2022). TcCyP19 y TcCySEC se purificaron de la fracción soluble y TcCyP22 de CI, de manera similar a las PPlasas fusionadas al CBM2.

En cuanto a la actividad enzimática, los valores obtenidos en este trabajo para las proteínas TcCyP19 y TcCySEC fusionadas al CBM2 son consistentes con los obtenidos previamente para las proteínas sin CBM2. Sin embargo, como no se determinó previamente la actividad enzimática para TcCyP22, no se podría saber si la baja actividad de la proteína fusionada al CBM2 es menor a la actividad de las otras dos PPlasas, o su baja actividad es debido a que solo una fracción de la proteína replegada adquirió su estructura 3D activa.

Los datos de concentraciones de proteínas recuperadas para estas PPlasas no han sido reportados. En este proyecto a partir de 500ml de cultivo, se obtuvieron aproximadamente ~3mg de TcCySEC-CBM2, ~0.9mg de TcCyP19-CBM2 y ~7.5mg de TcCyP22-CBM2. Es interesante ver que la proteína que se recuperó en mayor concentración fue TcCyP22-CBM2, debido a que se encontró concentrada en cuerpos de inclusión. Como se muestran en los diversos análisis electroforéticos SDS-PAGE de las expresiones de TcCyP19-CBM2 y TcCySEC-CBM2 en *E. coli*, aún tenemos gran cantidad de proteína en la fracción insoluble almacenada. Sin

embargo, después de purificarla es necesario replegarla y algunas veces no es posible llegar a su conformación nativa.

Finalmente, tanto en los ensayos de actividad mediante el ensayo de la RNAsa T1 (Jiménez-Guerra, 2022), como los reportados previamente mediante un ensayo diferente (Moro *et al.*, 1995 y Búa *et al.*, 2001) para la TcCyP19 y TcCySEC son similares a los obtenidos en este trabajo para ambas proteínas fusionadas al CBM2; mayor actividad de PPIasa de la TcCyP19-CBM2 (22,450 $\Delta F/s$ nmol), tres veces menor para la TcCySEC-CBM2 (7,535 $\Delta F/s$ nmol) y diez veces menor para la TcCyP22-CBM2 (2,293 $\Delta F/s$ nmol). Para el caso de la TcCyP22 no se había reportado su actividad enzimática, por lo que es posible que la determinada para la proteína fusionada al CBM2, haya sido menor debido a que no toda la proteína replegada pudo haber alcanzado su conformación nativa. Por otro lado, se ha considerado adecuado tomar como control negativo en los ensayos de actividad PPIasa de las proteínas fusionadas al CBM2, la proteína DA-CBM2 ya que la tasa de replegamiento de la RNAsa T1 muestran valores de ΔF por debajo del ensayo de su replegamiento espontáneo por dilución (sin PPIasa), por lo que se propone que el CBM2, de alguna forma interfiere en el replegamiento de la RNAsa T1.

10. Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que se logró expresar catalíticamente activas a las tres PPlasas de *T. cruzi* fusionadas a CBM2 en la plataforma de expresión de *E. coli*, confirmando de manera concluyente la hipótesis propuesta.

11. Perspectivas

Para complementar este proyecto sería importante realizar los siguientes ensayos.

- Probar alternativas para la expresión soluble de TcCyP22, como expresarla fusionada a SUMO o MBP.
- Ensayos de replegamiento de proteínas de difícil expresión como TSA-1, realizando ensayos en solución con TcCyP19, o TcCyP19 con chaperonas.
- Ensayos con la PPlasa inmovilizada, con y sin chaperonas.
- Replegamiento cromatográfico de TSA-1 utilizando diferentes PPlasas recombinantes.
- Coexpresar TSA-1 con TcCyP19.

12. Bibliografía:

- Amos et al., (2021). VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center, *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab929>
- Antonio-Pérez, A., Ramón-Luing, L. A., & Ortega-López, J. (2012). Chromatographic refolding of rhodanese and lysozyme assisted by the GroEL apical domain, DsbA and DsbC immobilized on cellulose. *Journal of Chromatography A*, 1248, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.086>
- Antonio-Pérez, A., Rivera-Hernández, T., Aldaz-Martínez, L. M., & Ortega-López, J. (2012). Oxidative refolding of lysozyme assisted by DsbA, DsbC and the GroEL apical domain immobilized in cellulose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(4), 703–710. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0663-9>
- Bell, A., Monaghan, P., & Page, A. P. (2006). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 36, Issue 3, pp. 261–276). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.11.003>
- Búa, J., Åslund, L., Pereyra, N., García, G. A., Bontempi, E. J., & Ruiz, A. M. (2001). Characterisation of a cyclophilin isoform in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS microbiology letters*, 200(1), 43-47.
- Bustos, P. L., Volta, B. J., Perrone, A. E., Milduburger, N., & Bua, J. (2017). A homolog of cyclophilin D is expressed in *Trypanosoma cruzi* and is involved in the oxidative stress-damage response. *Cell death discovery*, 3, 16092. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.92>
- Castro, J. A., deMecca, M. M., & Bartel, L. C. (2006). Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25(8), 471–479. doi:10.1191/0960327106het653oa
- de la Cruz, J. J., Villanueva-Lizama, L., Dzul-Huchim, V., Ramírez-Sierra, M. J., Martínez-Vega, P., Rosado-Vallado, M., ... & Dumonteil, E. (2019). Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immuno-therapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(1), 210-219.
- Dos Santos, G. P., Abukawa, F. M., Souza-Melo, N., Alcântara, L. M., Bittencourt-Cunha, P., Moraes, C. B., Jha, B. K., McGwire, B. S., Moretti, N. S., & Schenkman, S. (2021). Cyclophilin 19 secreted in the host cell cytosol by *Trypanosoma cruzi* promotes ROS production required for parasite growth. *Cellular microbiology*, 23(4), e13295.

- <https://doi.org/10.1111/cmi.13295>
- Dumonteil, E., Herrera, C., Tu, W., Goff, K., Fahlberg, M., Haupt, E., Kaur, A., Marx, P. A., Ortega-Lopez, J., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2020). Safety and immunogenicity of a recombinant vaccine against *Trypanosoma cruzi* in Rhesus macaques. *Vaccine*, 38(29), 4584–4591. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.010>
- Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V., Durinx., C. (2021). Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*. Consultado en: <https://web.expasy.org/protparam/>
- Ferrer-Miralles N., Saccardo P., Corchero J.L., Garcia-Fruitós E. (2022) Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. In: Garcia Fruitós E., Arís Giralt A. (eds) *Insoluble Proteins. Methods in Molecular Biology*, vol 2406. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1859-2_1
- Fischer, G., Bang, H., & Mech, C. (1984). Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomedica biochimica acta*, 43(10), 1101-1111.
- Galat A. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): Biological diversity–targets– functions. *Curr Top Med Chem*. 2003; 3:1315–1347. [PubMed: 12871165]
- Hebditch M, Carballo-Amador M A, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. (2017). Protein-Sol: A web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*. Consultado en: <https://protein-sol.manchester.ac.uk>.
- Jha, B. K., Varikuti, S., Verma, C., Shivahare, R., Bishop, N., Dos Santos, G. P., ... & McGwire, B. S. (2023). Immunization with a *Trypanosoma cruzi* cyclophilin-19 deletion mutant protects against acute Chagas disease in mice. *npj Vaccines*, 8(1), 63.
- Jimenez-Guerra, D. (2022). Caracterización enzimática de las Peptidil-Prolyl Isomerasas recombinantes de *Trypanosoma cruzi* (TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC) a partir de su expresión en *Escherichia coli*.
- Jumper, J., *et al.* (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. Consultado en: (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)
- Kulkarni, M. M., Karafova, A., Kamysz, W., Schenkman, S., Pelle, R., & McGwire, B. S. (2013). Secreted trypanosome cyclophilin inactivates lytic insect defense peptides and induces parasite calcineurin activation and infectivity. *The Journal of biological chemistry*, 288(12), 8772–8784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.421057>
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Connor, D. L., Willig, A. M., & Bailey, R. R. (2010). The Potential Economic Value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease)

- Vaccine in Latin America. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(12), e916. doi:10.1371/journal.pntd.0000916
- Martinez-Campos, V., Martinez-Vega, P., Ramirez-Sierra, M. J., Rosado-Vallado, M., Seid, C. A., Hudspeth, E. M., ... Dumonteil, E. (2015). Expression, purification, immunogenicity, and protective efficacy of a recombinant Tc24 antigen as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*, 33(36), 4505–4512. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.017
- Moro, A., Ruiz-Cabello, F., Fernández-Cano, A., Stock, R. P., & González, A. (1995). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. *The EMBO journal*, 14(11), 2483–2490. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07245.x>
- Novagen, (s.f.). pET-38b(+) Vector. Consultado el 17 de Julio del 2023 de: <http://www.youbio.cn/sites/default/files/product/documents/vector/pET-38b.pdf>
- Oeller, M., Kang, R., Bell, R., Ausserwoeger, H., Sormanni, P., & Vendruscolo, M. (2023). Sequence-based prediction of pH-dependent protein solubility using CamSol. *Briefings in Bioinformatics*. doi:10.1093/bib/bbad004. Consultado en: <https://www-cohsoftware.ch.cam.ac.uk/>
- Page, A. P., Kumar, S., & Carlow, C. K. S. (1995). Parasite cyclophilins and antiparasite activity of cyclosporin A. *Parasitology Today*, 11(10), 385–388. doi:10.1016/0169-4758(95)80007-7
- Perrone, A. E., Milduberger, N., Fuchs, A. G., Bustos, P. L., & Bua, J. (2018). A functional analysis of the cyclophilin repertoire in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biomolecules*, 8(4), 132.
- Potenza, M., Galat, A., Minning, T. A., Ruiz, A. M., Duran, R., Tarleton, R. L., Marín, M., Fichera, L. E., & Búa, J. (2006). Analysis of the *Trypanosoma cruzi* cyclophilin gene family and identification of Cyclosporin A binding proteins. *Parasitology*, 132(6), 867–882. <https://doi.org/10.1017/S0031182005009558>
- Ramón-Luing, L. A., Cruz-Migoni, A., Ruíz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., & Ortega-Lopez, J. (2006). One-step purification and immobilization in cellulose of the GroEL apical domain fused to a carbohydrate-binding module and its use in protein refolding. *Biotechnology Letters*, 28(5), 301–307. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5714-x>
- Rêgo, J. V., Duarte, A. P., Liarte, D. B., de Carvalho Sousa, F., Barreto, H. M., Bua, J., Romanha, A. J., Rádis-Baptista, G., & Murta, S. M. F. (2015). Molecular characterization of Cyclophilin (TcCyP19) in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Experimental Parasitology*, 148, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.11.007>
- Research and Markets, 2022. *Biopharmaceuticals Market by Product and by*

- Application - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast 2022-2030 . Recuperado el 20 de noviembre del 2022 de: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5529485/biopharmaceuticall-market-by-product-and-by#src-pos-1>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. In *Protein Science* (Vol. 28, Issue 8, pp. 1412–1422). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Seid, C. A., Jones, K. M., Pollet, J., Keegan, B., Hudspeth, E., Hammond, M., ... & Hotez, P. J. (2017). Cysteine mutagenesis improves the production without abrogating antigenicity of a recombinant protein vaccine candidate for human chagas disease. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(3), 621-633.
- Varadi, M., *et al.* (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*. Consultado en: (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)
- Villanueva-Lizama, L. E., Cruz-Chan, J. v., Aguilar-Cetina, A. del C., Herrera-Sanchez, L. F., Rodriguez-Perez, J. M., Rosado-Vallado, M. E., Ramirez-Sierra, M. J., Ortega-Lopez, J., Jones, K., Hotez, P., Bottazzi, M. E., & Dumonteil, E. (2018). Trypanosoma cruzi vaccine candidate antigens Tc24 and TSA-1 recall memory immune response associated with HLA-A and -B supertypes in Chagasic chronic patients from Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006240>
- World Health Organization. (2023). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Recuperado el 22 de mayo del 2023 de: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Yang J., & Zhang. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. Consultado en: <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>
- Zambrano, R., Jamroz, M., Szczasiuk, A., Pujols, J. Kmiecik, S., and Ventura., S. (2015). AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures, *Nucleic Acids Research*. Consultado en: <http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D2/>
- Zemanova, L., Vaskova, M., Schmidt, M., Roubalova, J., Haleckova, A., Benek, O., & Musilek, K. (2020). RNase T1 refolding assay for determining mitochondrial cyclophilin D activity: a novel in vitro method applicable in drug research and discovery. *Biochemistry*, 59(17), 1680-1687.

13. Apéndices.

Apéndice 1.

Created with SnapGene®

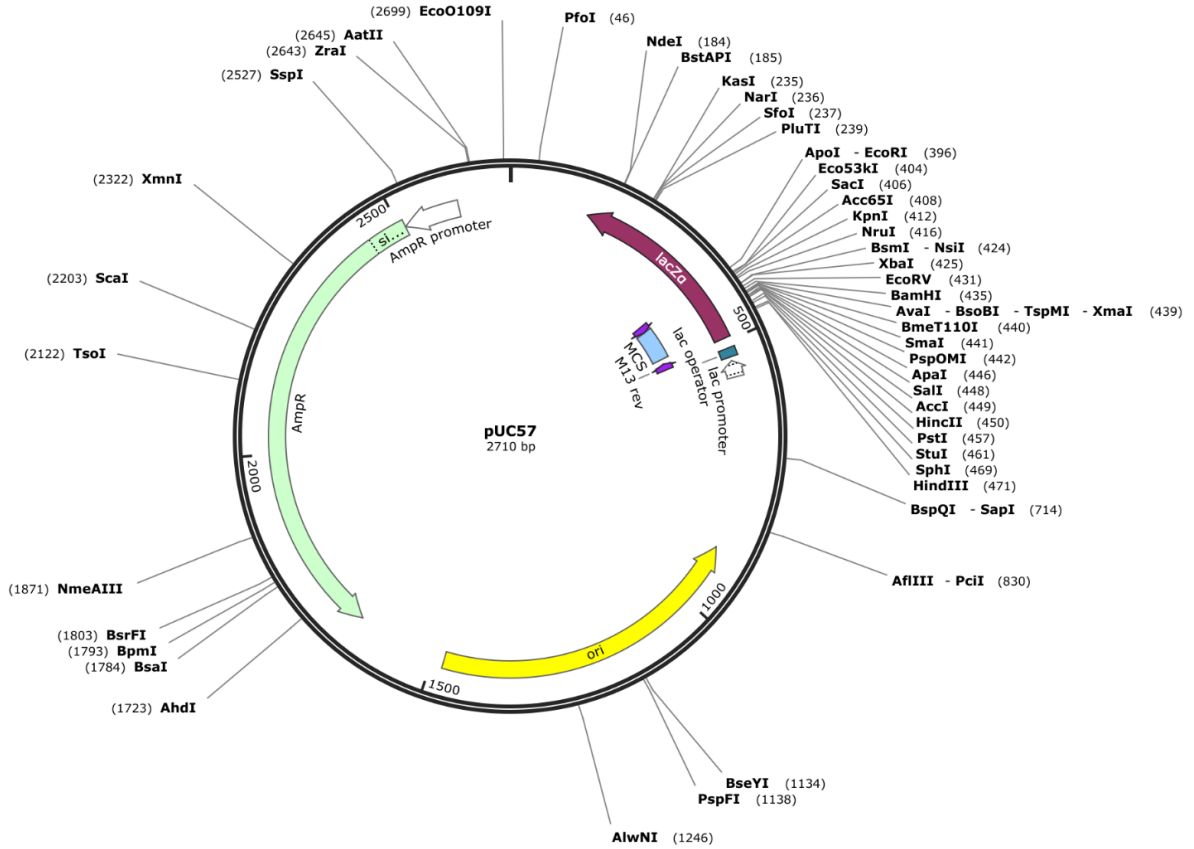


Figura A. Mapa del vector de clonación pUC57.

Apéndice 2.

Secuencia optimizada pUC57-*TcCyP19*-coli.

**CCATG GCC AGT TAT AAA CCG CAT CAC GCA ACC GTT CCG ACC AAT CCG
AAA GTC TTC TTC GAC GTC AGC ATT GGC GGT CAA AGC GCG GGC CGC
GTT GTT TTT GAA CTG TTT GCA GAC GCC GTT CCG AAA ACC GCA GAA
AAT TTT CGC GCA CTG TGC ACC GGC GAG AAA AAC TTT GGC TAC GCA
GGT AGC GGC TTT CAC CGC ATT ATT CCG CAG TTC ATG TGT CAG GGC
GGC GAT TTT ACC AAC CAT AAC GGC ACC GGC GGT CGT AGT ATT TAC
GGC GAA AAA TTC GCG GAC GAA AGT TTT GCA GGC AAA GCA GGT AAA
CAC TTT GGT CTG GGC ACC CTG AGT ATG GCA AAC GCA GGT CCG AAT
ACC AAC GGT AGC CAG TTT TTC ATT TGC ACC GCT CCG ACC CAG TGG
CTG GAC GGT AAA CAC GTT GTA TTT GGC CAG GTT CTG GAA GGC ATC
GAA GTT GTC AAA GCG ATG GAA GCG GTT GGT AGT CAA ACC GGC AAA
ACC AGC AAA CCG GTC AAA ATC GAA GCA TCT GGT CAG CTG **CTC GAG.****

Secuencia optimizada pUC57-*TcCyP22*-coli.

**CCATG GCC TTT AGT CGT ACC TGG TTT TGG GCA CAG CGT AAA CTG CCG
TTC TAT CCG ATC AAC CCG AAA AAC CCG CTG GTC TTC TTT GAA ATT AGC
ATT GGC GCA CAA CCG GCA GGT CGC GTTGAA ATG GAA CTG TTC AAA
GAC GCG GTC CCG AAA ACC GCA GAA AAT TTT CGC GCA CTG TGT ACC
GGC GAA AAA GGC GTA GGT CGT TCT GGT AAA GCG CTG TGC TAC AAA
GGC AGC AAA TTC CAC CGC GTT ATT CCG CAA TTC ATG TGT CAG GGC
GGC GAT TTT ACC AAC GGT AAC GGC ACC GGC GGC GAA TCT ATC TAC
GGC ATG AAA TTC CCG GAC GAA AGT TTT GCA GGT CGC GCA GGT AAA
CAT TTT GGT CCG GGC ACC CTG AGT ATG GCA AAC GCA GGT CCG AAT
ACC AAC GGT AGT CAG TTT TTC ATT TGT ACC GCT GCT ACC GAG TGG
CTG GAC GGC AAA CAC GTT GTT TTT GGC CAG ATC ACG AAA GGC TAC
GAG GTC ATC GAG AAA GTC GAA GCA AAC GGT AGT CGT TCT GGC GCA
ACC CGT CAA CCG ATT CTG ATT ACC GAT TGC GGT GAA GTC AAA AAC
AAC **CTC GAG.****

Secuencia optimizada pUC57-*TcCySEC*-coli.

**CCATG GTG AGT GGT GAC GCA GCA AGT CAC GAA GAA CGT ATG AAC
AAC TAC CGT AAA CGC GTT GGT CGC CTG TTT ATG GAA CAG AAA GCT
GCT CAG CCG GAT GCA GTT AAA CTG CCG TCT GGT CTG GTT TTT CAG
CGC ATT GCA CGC GGT TCT GGT AAA CGC GCA CCG GCT ATT GAC GAC**

AAA TGC GAA GTC CAT TAT ACC GGT CGT CTG CGC GAC GGC ACC GTG
 TTT GAT AGT AGT CGC GAA CGC GGT AAA CCG ACC ACC TTT CGT CCG
 AAC GAA GTC ATC AAA GGT TGG ACC GAA GCT CTG CAA CTG ATG CGC
 GAA GGC GAT CGT TGG CGT CTG TTT ATT CCG TAC GAT CTG GCA TAC
 GGC GTT ACC GGC GGT GGC GGT ATG ATT CCG CCG TAT AGT CCG CTG
 GAA TTT GAC GTT GAA CTG ATC AGC ATC AAA GAC GGC GGT AAA GGT
 CGT ACC GCA GAA GAA GTC GAC GAA ATT CTG CGC AAA GCG GAA GAA
 GAT CGC GAA GAC ATG **CTC GAG**.

Apéndice 3:

Tabla P1. Formulación para la elaboración de geles de electroforesis SDS-PAGE.

REACTIVO	SEPARADOR			CONCENTRADOR
	10 %	12%	15%	5%
AGUA	1.9 ml	1.6 ml	1.1 ml	1.4 ml
ACRILAMIDA (30%)	1.7 ml	2.0 ml	2.5 ml	330 µl
TRIS 1.5M PH 8.8	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	250 µl Tris pH 6.8
SDS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
PSA 10%	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	3 µl

Apéndice 4:

Tabla P2. Volúmenes para la ligación entre los insertos de las PPlasas y el vector de expresión pET-38b(+). Basado en los manuales de New England Biolabs.

		TcCyp19	TcCyp22	TcCySEC	Control (-)
PET38b (+)	50 ng	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Inserto	14.11 /13.41/ 15.59 ng	1 µl	1 µl	1 µl	-
T4 DNA LIG	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Amortiguador	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H₂O	11µl	11µl	11µl	11µl	12µl