



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Expresión de proteínas quiméricas de chagasina en la
plataforma de *Pichia pastoris*”**

T E S I S

Que presenta

PAOLA EUGENIA AGUSTÍN VÉLEZ

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: **Dr. Jaime Ortega López**

Ciudad de México

Octubre, 2024

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio 23 de Biotecnología de Proteínas del **Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (DBB) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)**, Unidad Zacatenco, bajo la dirección del **Dr. Jaime Ortega López**, Investigador Titular 3C del DBB, con la asesoría de la **Dra. María Viridiana Olin Sandoval**, Investigadora 3A Titular del DBB, de la **Dra. María del Carmen Montes Horcasitas**, Investigadora Titular 3B del DBB y de la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, Investigadora Titular 3D adscrita al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) del CINVESTAV-IPN. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del CINVESTAV-IPN, del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT, Proyecto 269657 y A1-S34224), junto con el apoyo de la fundación Carlos Slim: Chagas Vaccine Initiative (WO3-WO4) y la colaboración de la Universidad de Tulane TUL-HSC-561355-23/24.

Agradezco también a CONAHCYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con el número de becario 829991, durante el periodo de septiembre 2022 a agosto 2024.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el **Dr. Jaime Ortega López**, por haber confiado en mí y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por todo el apoyo, paciencia y dedicación brindada a lo largo de la realización de este proyecto y sobre todo por haber cultivado en mí una gran pasión por la ciencia. Muchas gracias por todo Dr. Jaime.

A mi comité tutorial conformado por la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, la **Dra. María Viridiana Olin Sandoval** y la **Dra. María del Carmen Montes Horcasitas**, por compartir conmigo su invaluable conocimiento, guiar este proyecto e inspirarme a ser una mujer en la ciencia.

Me gustaría agradecer profundamente a la **M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta** por su ayuda en técnicas de biología molecular, expresión y purificación de proteínas. Por compartir conmigo su experiencia, paciencia, conocimiento y muy bonitos momentos en el laboratorio. Sin su guía, ninguno de los experimentos presentados en este trabajo habrían sido posibles.

Al **IBT. Octavio Montes Flores** por su ayuda en la expresión y purificación de proteínas, así como en el manejo de biorreactores.

A **María Eugenia Zúñiga Trejo** por su apoyo técnico en el laboratorio, por brindarme un espacio seguro y agradable para desarrollar los experimentos. Muchas gracias, Maru.

Al **laboratorio 11 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular** por su colaboración en las técnicas de inmunoensayo, así como a mi compañera **Miriam**, por su paciencia y apoyo en los experimentos realizados.

Agradezco también a mis compañeros y amigos de laboratorio **Esdras, Alejandro, Verónica, Brenda, Monse y Leo**, por compartir conmigo sus consejos teórico-prácticos y por haber hecho de cada día en el laboratorio una nueva aventura llena de alegría y esperanza. Muchas gracias, amigos.

A **Marco**, por ser un pilar importante en mi vida académica y personal desde que nos conocimos al iniciar la licenciatura. Por ser mi mejor amigo, mi pareja, un gran compañero y formar juntos un increíble equipo en el laboratorio y en la vida. Gracias por tu apoyo, amor y comprensión.

Finalmente, me gustaría agradecer especialmente a mis padres **María Eugenia Vélez Ortiz y Joel Agustín Alvarado**, y a mi hermano **Gabriel Agustín Vélez** por todo su amor y apoyo incondicional en todos los ámbitos de mi vida. Por formar parte de cada etapa en mi desarrollo, por confiar siempre en mi potencial y permitirme cumplir todos mis sueños y metas.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
GLOSARIO	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
ANTECEDENTES	13
Enfermedad de Chagas	13
Semiología de la enfermedad	15
Tratamiento	15
Trypanosoma cruzi: Ciclo de vida y características morfológicas	15
Proteómica del parásito	18
TSA-1 y vacuna terapéutica	19
Chagasina como andamio molecular	21
Pichia pastoris como plataforma de producción	23
JUSTIFICACIÓN	26
HIPOTESIS	27
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1.-Mutación in silico de la secuencia de la chagasina de <i>T. cruzi</i> y diseño de quimeras con 3 y 4 epítomos de TSA-1.	29
2.-Análisis de similitud de epítomos respecto al giro L2 de la chagasina	29
3.-Predicción de solubilidad de las mutantes de chagasina y de las proteínas quiméricas.	30
4.-Normalización de la solubilidad	33
8.-Subclonación, expresión en <i>E. coli</i> y purificación de las mutantes de chagasina	33
9.-Estabilidad térmica de las mutantes de chagasina	35
6.- Mutación de las quimeras de chagasina, predicción de solubilidad y selección final de quimeras.	36
7.-Obtención de propiedades fisicoquímicas de las quimeras	37

10.-Recuperación de cepa de <i>P. pastoris</i> Superman 5 _____	37
11.-Subclonación de las proteínas quiméricas de chagasina en el plásmido pCri16a. _____	37
13.-Transformación de <i>P. pastoris</i> Superman 5 y verificación de clonas transformantes _____	38
14.-Resistencia a zeocina de las transformantes de <i>P. pastoris</i> _____	40
15.-Identificación del fenotipo generado en las transformantes de <i>P. pastoris</i> _____	40
16.-Expresión en matraz de las quimeras recombinantes de 4 epítomos Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K _____	40
17.- Identificación de las quimeras Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K por inmunoensayo Dot-Blot _____	41
18-Purificación de la quimera Q109 V18K-F58K por cromatografía de afinidad a níquel _____	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	44
1.-Mutación in silico al núcleo de la chagasina y predicción de la solubilidad. _____	44
2.-Diseño in silico de proteínas quiméricas multiepítopo y predicción de solubilidad. _____	46
3.- Subclonación, expresión en <i>E. coli</i> y purificación de las mutantes de chagasina _____	53
4.-Estabilidad térmica de las mutantes de chagasina _____	58
4.-Selección de las proteínas quiméricas de chagasina a expresar. _____	62
5.-Subclonación de las proteínas quiméricas de chagasina en pCri16a _____	67
6.-Transformación de la levadura <i>P. pastoris</i> y verificación de clonas transformantes _____	69
7.-Resistencia a zeocina de las clonas transformantes y selección para expresión. _____	73
8.-Determinación del fenotipo de las transformantes de <i>P. pastoris</i> _____	76
9.-Identificación de las proteínas quiméricas Q19 y Q109 por inmunoensayo Dot-Blot _____	78
10.- Purificación de la quimera Q109 e identificación por inmuno ensayo. _____	81
CONCLUSION _____	84
PERSPECTIVAS _____	85
BIBLIOGRAFÍA _____	86
APÉNDICES _____	92
METODOLOGÍAS GENERALES _____	103
Medios de cultivo utilizados para <i>E. coli</i> _____	103
Medios de cultivo utilizados para <i>P. pastoris</i> _____	103
Preparación de células competentes de <i>P. pastoris</i> para electroporación. _____	104
PCR de colonia para clonas de <i>P. pastoris</i> _____	105
Buffers _____	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de los epítomos de TSA-1 de <i>T. cruzi</i> . _____	20
Tabla 2 Secuencias de los giros de la chagasina de <i>T. cruzi</i> . _____	22
Tabla 3. Comparación de características en las diferentes plataformas de producción (Modificado de de Karbalei et al, 2020). _____	24
Tabla 4. Vectores comúnmente empleados para la producción de proteínas secretorias (Modificado de de Karbalei et al, 2020). _____	24
Tabla 5. Comparación energética de las mutantes de chagasina. Mutaciones seleccionadas se encuentran marcadas en rojo. _____	44
Tabla 6. Valores de pLDDT y solubilidad normalizada de las mutantes de chagasina. _____	45
Tabla 7. Datos de solubilidad normalizados de las quimeras de 3 epítomos. _____	49
Tabla 8. Datos de solubilidad normalizados de las quimeras de 4 epítomos _____	50
Tabla 9. Porcentaje de bandeo y porcentaje de intensidad relativa de las mutantes, obtenidos mediante densitometría _____	57
Tabla 10 Tm de las mutantes de chagasina a diferentes pH _____	59
Tabla 11. Solubilidad de quimeras mutadas con 3 epítomos. Quimeras seleccionadas se encuentran marcadas en rojo. _____	63
Tabla 12. Solubilidad de quimeras mutadas con 4 epítomos. Quimeras seleccionadas se encuentran marcadas en rojo. _____	64
Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas de las quimeras seleccionadas. _____	64
Tabla 14. Secuencia de quimeras de 3 epítomos seleccionadas para síntesis. _____	65
Tabla 15. Quimeras de 4 epítomos seleccionadas para síntesis. _____	65
Tabla 16. Concentraciones del plásmido pCri16a digerido y de los insertos purificados de gel __	92
Tabla 17. Concentraciones de las construcciones en pCri16a _____	92
Tabla 18. Reacciones de linealización de las construcciones con la enzima Pmel _____	93
Tabla 19 Secuencia de los oligos utilizados para PCR _____	93
Tabla 20. Quimeras de 3 epítomos y valores correspondientes de solubilidad. _____	96
Tabla 21 Quimeras de 4 epítomos y valores correspondientes de solubilidad. _____	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Prevalencia de Chagas a nivel mundial _____	14
Figura 2. Signo de Romaña en niño infectado. _____	14
Figura 3. Estadios morfológicos de <i>T. cruzi</i> . _____	17
Figura 4 Clasificación de la familia de las transalidasas. _____	17
Figura 5. Estructura tridimensional de TSA-1 de <i>T. cruzi</i> obtenida por predicción mediante AlphaFold. _____	20
Figura 6. Panel A) Estructura tridimensional de la chagasina de <i>T. cruzi</i> obtenida por predicción mediante AlphaFold. B) Secuencia de aminoácidos de la chagasina de <i>T. cruzi</i> . L2 remarcado en morado, L4 remarcado en azul y L6 remarcado en verde _____	22
Figura 7 Similitud fisicoquímica entre aminoácidos. _____	31
Figura 8. B Diagrama de Venn y C Árbol filogenético que muestran la similitud entre aminoácidos derivada del análisis fisicoquímico de cada aminoácido individual. _____	32
Figura 9. Aminoácidos a mutar del núcleo de la chagasina _____	45
Figura 10. Valores normalizados de solubilidad de la chagasina mutada en distintas posiciones. _____	46
Figura 11 Alineamiento realizado con MUSCLE de los 5 epítomos de TSA-1 con respecto a L2. _____	51
Figura 12. Top 10 de quimeras de 3 epítomos con mayor solubilidad _____	52
Figura 13. Top 10 de quimeras de 4 epítomos con mayor solubilidad _____	52
Figura 14. PCR de colonia de las mutantes de chagasina en <i>E. coli</i> DH5a. _____	54
Figura 15. Expresión de las mutantes de chagasina. _____	56
Figura 16. Análisis de densitometría de las mutantes de chagasina. _____	57
Figura 17 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 9.3. _____	60
Figura 18 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 8.5. _____	60
Figura 19 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 7.5. _____	61
Figura 20 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 6.0. _____	61
Figura 21 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 4.5. _____	62
Figura 22. Estructura 3D de las quimeras predichas con AlphaFold. _____	66
Figura 23. Verificación de clonas transformantes con las construcciones pCri16a-Q6, pCri16a-Q34, pCri16a-Q19 y pCri16-Q109 en <i>E. coli</i> DH5a. _____	68
Figura 24. Crecimiento de clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> . _____	69
Figura 25. Verificación de clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> , utilizando los oligos Alpha-factor 5' y AOX1 3'. _____	70

Figura 26. Verificación de clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> , utilizando los oligos AOX1 5' y AOX1 3'.	71
Figura 27. Verificación de clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> utilizando los oligos de la secuencia Q109 5' y Q109 3'.	72
Figura 28. Crecimiento de clonas seleccionadas de <i>P. pastoris</i> a diferentes concentraciones de zeocina.	75
Figura 29. Verificación de clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> que crecieron a 500 µg/mL de zeocina.	75
Figura 30. Clonas sembradas en Medio Mínimo con Dextrosa e Histidina (MDH).	77
Figura 31. Clonas sembradas en Medio Mínimo con Metanol e Histidina (MMH).	77
Figura 32. Dot Blot de la expresión de las quimeras en el lisado y sobrenadante de <i>P. pastoris</i> .	78
Figura 33. Dot Blot de la expresión de las clonas de la construcción Q109 en <i>P. pastoris</i> .	80
Figura 34. Dot Blot de la expresión de las clonas de la construcción Q19 en <i>P. pastoris</i> .	80
Figura 35. Perfil cromatográfico de la purificación de la proteína quimérica Q109 de <i>P. pastoris</i> .	82
Figura 36. Purificación de la proteína quimérica Q109 por afinidad a níquel.	82
Figura 37. Inmunodetección de la proteína quimérica Q109 purificada.	83
Figura 38 Mapa de restricción de pCri16a Figura 39. Mapa de restricción de pCri8a	92
Figura 40 Amplicón generado con los oligos Promotor T7 5' y Terminador T7 3'. Modelado con SnapGene	93
Figura 41. Amplicón generado con los oligos AOX1 5' y AOX1 3'. Modelado con SnapGene	94
Figura 42 Amplicón generado con los oligos Alpha-factor 5' y AOX1 3'. Modelado con SnapGene	94
Figura 43 Amplicón generado con los oligos Q109 Fw y Q109 Rv'. Modelado con SnapGene	94
Figura 44. Curva estándar para cuantificación de proteína mediante metodología del ácido bicinconinico (BCA)	94
Figura 45 Cromatogramas obtenidos de la purificación de las mutantes de chagasina. A) Chag KK. B) Chag RR, C) Chag RK y D) Chag KR	95

GLOSARIO

TSA-1: Proteína de Superficie de Trypomastigote

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

E. coli: *Escherichia coli*

P. pastoris: *Pichia pastoris*

Chag WT: Chagasina nativa

Chag KK: Chagasina V18K-F58K

Chag RR: Chagasina V18R-F58R

Chag KR: Chagasina V18K-F58R

Chag RK: Chagasina V18R-F58K

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

AOX 1: alcohol oxidase (gen y proteína)

MHC I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I

h: horas

s: segundos

pDNA: DNA plasmídico

UA: Unidad de Absorbancia

qPCR: PCR en tiempo real

His: Histidina

BMGY: Buffered Glycerol- complex Medium

BMMY: Buffered Methanol- complex Medium

rpm: revoluciones por minuto

DNTP: desoxinucleotidos trifosfato

WT: Wild-type

a.a: aminoácidos

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana es una enfermedad desatendida que afecta principalmente a regiones marginadas de Latinoamérica. Esta enfermedad es causada por el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*. Hoy en día el tratamiento de la enfermedad se encuentra limitado al uso de dos fármacos: Benznidazol y Nifutimox, los cuales son inefectivos en etapas crónicas de la enfermedad y generan efectos secundarios que inducen a los pacientes al abandono del tratamiento. Es por esto por lo que la búsqueda de antígenos de *T. cruzi* ofrece un área de oportunidad para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra la enfermedad de Chagas.

El Antígeno de Superficie de Tripomastigote (TSA-1) es una proteína de 85kDa involucrada en el proceso infectivo de *T. cruzi*, ha sido identificada como un antígeno prometedor. Estudios previos han demostrado que la inmunización de modelos murinos con el extremo amino de TSA-1 disminuye la parasitemia; por otra parte, se han identificado en dicho extremo, 5 epítomos conservados entre las diferentes DTU's (Unidades Discretas de Tipificación) de *T. cruzi*, capaces de inducir una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T-citotóxicos. Sin embargo, la producción recombinante de TSA-1 en *E. coli* se da en forma de cuerpos de inclusión, requiriendo así un paso extra de replegamiento. Asimismo, se ha propuesto el uso de un andamio molecular como lo es la chagasina fusionando 2 epítomos de TSA-1 para expresarlos de forma soluble. No obstante, para generar proteínas altamente inmunogénicas es necesario fusionar más de 2 epítomos en la estructura de la chagasina.

En el presente trabajo se diseñaron 180 proteínas quiméricas que contienen en su estructura 3 y 4 epítomos de TSA-1 sustituidos en los giros L2, L4 y L6 de la chagasina, se mutaron 2 aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran en el núcleo de ésta, se predijo su solubilidad mediante diferentes servidores y se seleccionaron las 2 quimeras más solubles de 3 y 4 epítomos, seguido de su clonación y expresión en la levadura *P. pastoris*. Dos proteínas con 4 epítomos de TSA-1, Q19 y Q109 se identificaron en el sobrenadante de la fermentación, produciéndose de forma soluble y secretándose al medio.

ABSTRACT

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a neglected disease affecting marginated regions in Latin America. It is caused by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. Nowadays, the treatment for this disease is limited to the use of two drugs: Benznidazol and Nifurtimox, which are ineffective at the chronic stage and, generate secondary effects that induce the patients to quit the treatment. Because of this, searching for *T. cruzi* antigens offers an opportunity for the development of therapeutic vaccines against Chagas disease.

Trypomastigote Surface Antigen (TSA-1), an 85kDa protein involved in the infective process of *T. cruzi*, has been identified as a promising antigen. Previous studies have demonstrated that murine immunization with the TSA-1 amino end decreases the parasitemia, on the other hand, it has been identified 5 conserved epitopes among different *T. cruzi* DTU's (Discret Typification Units) at this amino end, that can induce the immunological response mediated by T-cytotoxic lymphocytes. However, the recombinant production of TSA-1 in the bacteria *E. coli* is in inclusion bodies, requiring an extra refolding step. In addition, it has been proposed to use a molecular scaffold as chagasin, carrying 2 epitopes from TSA-1 to express them in a soluble way, which has been successfully proved. Nevertheless, to generate highly immunogenic proteins, merging more than 2 epitopes in the chagasin structure is necessary.

In the present work, we designed 180 chimeric proteins that have in their structure 3 and 4 TSA-1 epitopes, substituted in the chagasin loops L2, L4 and L6, and mutated 2 hydrophobic amino acids situated at the chagasin core. We predicted the solubility of the 180 proteins with different servers and selected the 2 most soluble chimeras of 3 and 4 epitopes, followed by their cloning and expression in the yeast *P. pastoris*. Two chimeric proteins with 4 TSA-1 epitopes, Q19 and Q109 were successfully identified at the fermentation supernatant, being soluble and secreting to the media.

ANTECEDENTES

Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas, es una enfermedad desatendida causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce a esta enfermedad como una de las 17 enfermedades tropicales olvidadas que han persistido en los sectores más pobres y marginados. Se estima que entre 6 a 8 millones de personas en el mundo están infectados con *T. cruzi*, mientras que aproximadamente 65 millones de personas se encuentran en riesgo de ser infectadas. La mayoría de los casos se sitúan en América Latina (Figura 1), región en donde la enfermedad representa un problema mayor con respecto a la mortalidad y morbilidad de la población en general (Haberland *et al*, 2013).

En México, alrededor del 88% de la población está expuesta a la infección vectorial de la enfermedad de Chagas debido a la prevalencia de 19 especies de triatóminos en hogares mexicanos, así como por la identificación de otras 29 especies que han sido reportadas con infección con *T. cruzi*. Actualmente se estima que el 3.38% de la población mexicana se encuentra infectada, lo que corresponde a 4.06 millones de personas (Bravo *et al*, 2023). La forma más común de transmisión es mediante la picadura del vector conocido comúnmente como “chinche besucona”, insecto perteneciente al género de triatóminos hematófagos (Olivo *et al*, 2022). Estos artrópodos son endémicos de México y otros países de América Latina y habitan comúnmente en paredes o pequeños espacios que se encuentran en las casas. A su vez, estos organismos se esconden durante el día e incrementan su actividad de noche, momento donde se alimentan de sangre humana o animal (OMS,2023).

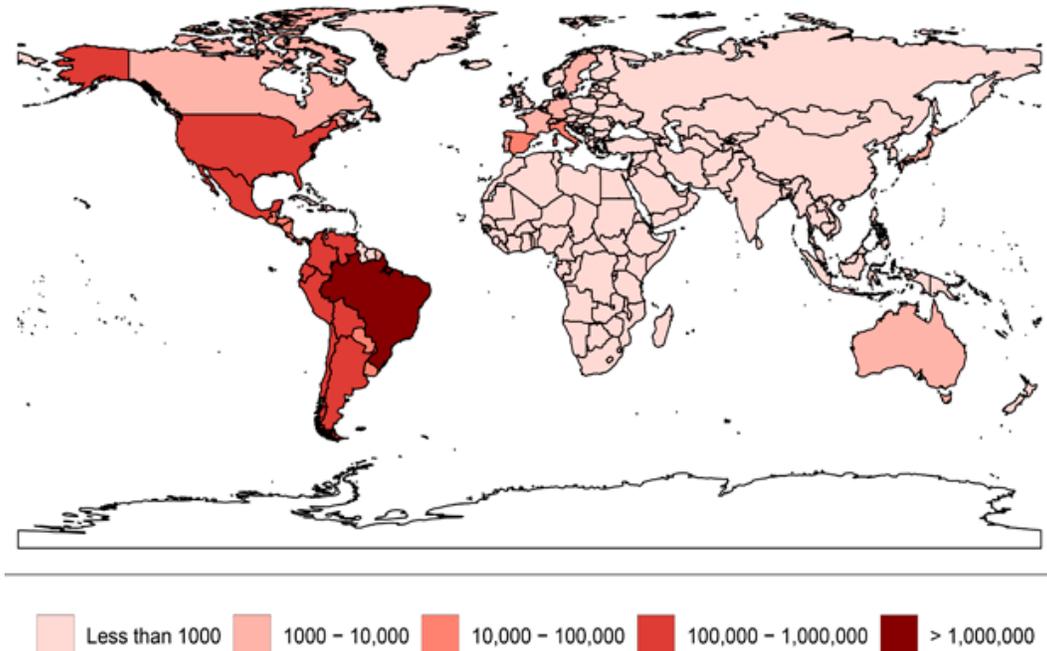


Figura 1 Prevalencia de Chagas a nivel mundial (Modificado de Cruz et al, 2014).

B



Figura 2. Signo de Romaña en niño infectado (Center for Disease Control and Prevention, 2022).

Semiología de la enfermedad

La enfermedad de Chagas se divide en dos fases: la fase aguda y la fase crónica. La primera ocurre inmediatamente después de la infección y puede durar algunas semanas o meses; puede ser asintomática o presentar síntomas comunes como fiebre, fatiga, dolor corporal, dolor de cabeza, vómito y diarrea. Dado que estos síntomas suelen confundirse con otras patologías, durante esta fase la persona desconoce si se infectó con *T. cruzi*. Otro signo visible que puede presentarse es la inflamación del sitio donde ocurrió la picadura (generalmente cerca de los ojos o boca) conocido como “signo de Romaña” (Figura 2). Posterior a la fase aguda, la fase crónica se hace presente, donde las afectaciones son más severas: megacolon o megaesófago, fallas cardíacas, engrandecimiento de corazón o repentinamente, un paro cardíaco (Center for Disease Control and Prevention, 2022).

Tratamiento

Hoy en día existen únicamente dos medicamentos indicados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox y Benznidazol los cuales son efectivos solo durante la fase aguda de la infección y que, además, pueden causar efectos adversos como náuseas, vómito, dolor de cabeza, depresión del sistema nervioso central, convulsiones, vértigo, dermatitis y polineuropatías; por lo que alrededor del 10 al 30% de los pacientes dejan el tratamiento. Otros fármacos que recientemente se ha estudiado su efecto contra la enfermedad son Fexinidazol, Triazol, Ketoconazol, Voriconazol, Ravuconazol y Oxaborol (García y Cardona, 2021), no obstante, aún no han sido evaluados en su totalidad en modelos humanos.

Trypanosoma cruzi: Ciclo de vida y características morfológicas

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el parásito *Trypanosoma cruzi*, protozooario intracelular flagelado y digénico que tiene predilección por células cardíacas, digestivas, nerviosas y epiteliales (Kowalska *et al*, 2011). Su ciclo de vida presenta diferentes etapas con características morfológicas, adaptativas e infectivas diversas.

El ciclo inicia cuando el vector se alimenta de sangre del huésped, defeca y *T. cruzi*, en su forma de tripomastigote metacíclico, penetra las células a través de la unión a receptores, generando una vacuola parasitaria capaz de unirse a la membrana celular

(Escolano *et al*, 2022). Una vez dentro de las células hospederas, estos tripomastigotes metacíclicos se convierten en amastigotes, la forma replicativa del parásito en mamíferos. Al haberse replicado por fisión binaria, los amastigotes maduran a ser tripomastigotes, causando lisis celular y permitiendo su liberación al torrente sanguíneo, donde podrán infectar otras células y a su vez, ser ingeridos nuevamente por los vectores a través de la succión de sangre. Una vez en el tracto intestinal del insecto, los tripomastigotes evolucionan a epimastigotes, la forma replicativa del parásito en el vector. Finalmente, estos epimastigotes migran al segmento del colon gracias a su flagelo, donde se convierten nuevamente en tripomastigotes metacíclicos, cerrando el ciclo de vida (Álvarez *et al*, 2018).

Morfológicamente, *T. cruzi* adquiere 3 formas principales: amastigote, epimastigote y tripomastigote metacíclico. Los tripomastigotes metacíclicos, células largas y delgadas que miden entre 12-30 μm , poseen una membrana ondulada que ayuda a la movilidad junto con el flagelo. El cinetoplasto, organelo especializado que contiene al DNA mitocondrial más complejo de la célula, se localiza en la parte posterior mientras que el núcleo se encuentra centralizado. El flagelo proviene del cinetoplasto y se extiende por todo el cuerpo del tripomastigote. Por otra parte, el epimastigote difiere del tripomastigote únicamente en la posición del cinetoplasto, ya que este se encuentra en la parte anterior al núcleo. Finalmente, los amastigotes son células circulares que carecen de flagelo (Figura 3) (Pereira & da Souza, 2018).

Sin embargo, en años recientes se han encontrado otros tipos de morfología que presenta este parásito. Una de ellas son los llamados zoides, forma celular que resulta de la diferenciación de los tripomastigotes en amastigotes mediante división asimétrica y que, además, posee cinetoplasto pero carece de núcleo (Samarchith & Rick, 2014). Por otra parte, en 2017 se reportó la presencia de amastigotes inactivos en células infectadas, los cuales, se sugiere, son estructuras de resistencia a factores ambientales no óptimos que residen inactivos durante largos periodos de tiempo, incluso después del tratamiento y que pueden proliferar reactivando el ciclo de vida del parásito (Valdez *et al*, 2018).

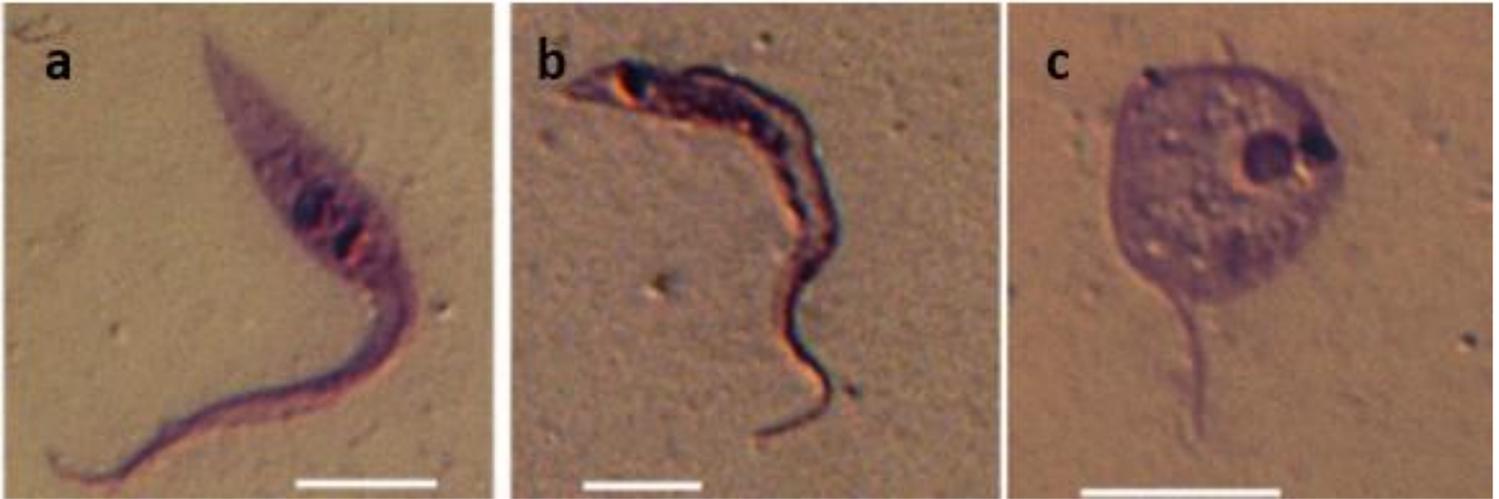


Figura 3. Estadíos morfológicos de *T. cruzi* a) Tripomastigote metacíclico b) Epimastigote c) Amastigote (Schaub & Meiser, 2011).

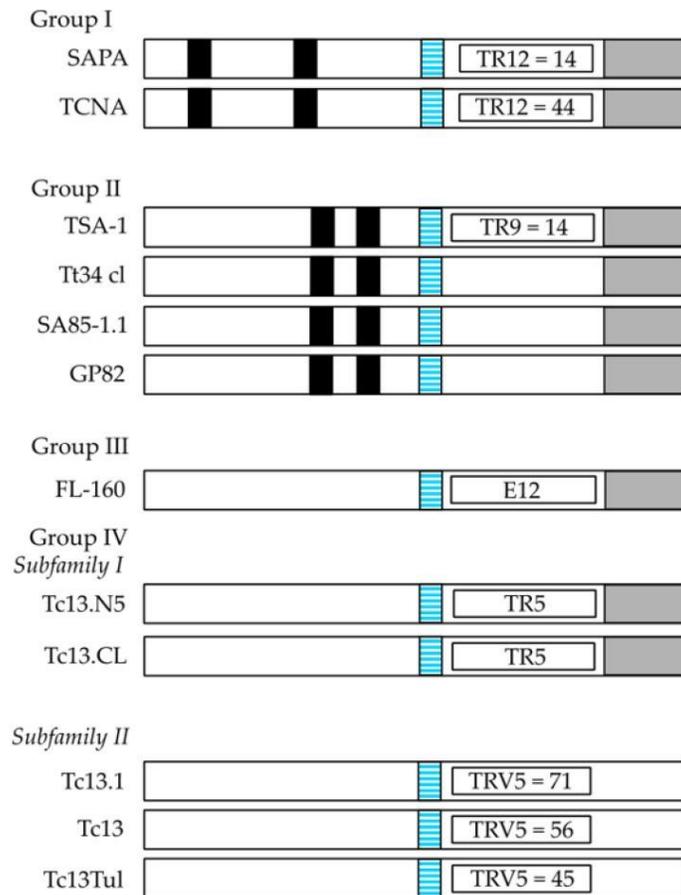


Figura 4 Clasificación de la familia de las transialidasas. Los motivos característicos son SxDxGTW (rectángulos negros), VTVxNVLYNR (rectángulos azul claro) y la señal de anclaje GPI (rectángulos grises). TR representan regiones de repeticiones en tándem (De la Cruz et al, 2017)

Desde el año 1963 se ha identificado la existencia de una población pleomórfica de tripomastigote metacíclico en la sangre: tripomastigotes delgados y anchos. Los primeros son más infecciosos, capaces de penetrar eficientemente las células y más sensibles a la respuesta humoral; por el contrario, los tripomastigotes anchos son menos infecciosos, permanecen mayormente en el torrente sanguíneo y presentan mayor resistencia ante anticuerpos (Brener & Chiari, 1983).

Proteómica del parásito

Debido a que el estadio de tripomastigote posee gran relevancia al ser la forma infectiva del parásito, la búsqueda de proteínas estructurales y funcionales se ha convertido en un objetivo importante para el desarrollo de fármacos y vacunas. Las características que deben cumplir las moléculas candidatas a vacuna deben ser las siguientes (Maldonado *et al*, 2022):

- Altamente inmunogénicas.
- Deben ser proteínas esenciales para el agente etiológico.
- Deben expresarse en todos los estadios que tiene el parásito dentro del huésped.
- Deben situarse en la superficie de la célula.

Una de las familias de proteínas que están ampliamente distribuidas en la superficie del parásito durante sus diferentes etapas del ciclo de vida son las mucinas, glicoproteínas capaces de interactuar con las células del huésped. Las mucinas con mayor importancia médica juegan un papel fundamental en la protección del microorganismo, así como en la infectividad y activación de la respuesta inmunológica del huésped (Buscaglia *et al*, 2006).

Asimismo, otra familia proteica de relevancia médica identificada en *T. cruzi* son las transialidasas. Estas proteínas están distribuidas a lo largo del cuerpo celular y del flagelo del parásito y funcionan como proteínas implicadas en el ataque a las células del hospedero, así como en su infección; son altamente antigénicas, capaces de elicitar una alta respuesta inmunológica humoral (Freitas *et al*, 2011). La actividad de las transialidasas se basa en la transferencia de ácido siálico de las glicoproteínas del huésped a las mucinas presentes en la membrana de los tripomastigotes, por lo que estas proteínas son cruciales para la viabilidad y proliferación en el huésped ya que, de forma natural, *T. cruzi* es incapaz de sintetizar el ácido siálico (Freire *et al*, 2015).

A su vez, esta superfamilia de proteínas puede dividirse en cuatro grupos de acuerdo con los motivos característicos que poseen (Figura 4). Dentro de estos grupos, se ha demostrado que el Grupo II está fuertemente implicado en el ataque al huésped y en la invasión. Además, las transialidasas no solo remueven el ácido siálico de las glicoproteínas del huésped, sino que también se ha demostrado que son capaces de sializar a las moléculas CD43 de los linfocitos T citotóxicos CD8+. Este efecto previene la activación adecuada de estas células y ocasiona una interacción inefectiva con el MHC I (Da Fonseca *et al*, 2019). Además, esta sialilación de las moléculas CD43 ha sido relacionada con la apoptosis de los linfocitos T citotóxicos inmaduros (Mucci *et al*, 2006). Por otra parte, la sialización de las mucinas le permite al parásito escapar de la detección del sistema inmunológico (Monteiro *et al.*, 2021).

TSA-1 y vacuna terapéutica

Dentro del grupo II de las transialidasas se encuentra la proteína TSA-1 (Trypomastigote Surface Antigen) una proteína de 85kDa que no posee actividad enzimática (Figura 5) (Ruef, 1992) y que es un blanco específico de los linfocitos T citotóxicos CD8+, induciendo una fuerte respuesta inmunológica en los hospederos (Pech *et al*, 2017), motivo por el cual ha sido estudiada para la identificación de epítomos que son reconocidos durante la etapa de infección.

TSA-1 es capaz de interactuar con elementos de la matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágeno y trombospondina-1, mientras que, específicamente el motivo VTVxNVLYNR tiene afinidad a la citoqueratina-18, la cual al interactuar con este motivo desencadena un rearrreglo del citoesqueleto en la célula del huésped, lo que permite la invasión del parásito (Alves *et al.*, 2007). Por otra parte, estudios anteriores han reportado que posterior a la inmunización de modelos murinos con las regiones amino y carboxilo terminal de TSA-1, aproximadamente el 70% de los animales inmunizados con la porción del extremo amino sobrevivieron y presentaron una respuesta inmunológica protectora posterior a la infección (Wrightsmann *et al*, 1994) por lo que a partir de diversas unidades de tipificación de *T. cruzi*, se identificaron 5 epítomos de linfocitos T en ésta región (Knight *et al*, 2014) (Tabla 1).



Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de los epítomos de TSA-1 de *T. cruzi*.

Epítomo	Secuencia	Posición en TSA-1
E1	KLFPEVIDL	192-200
E2	IVMGNGTLV	334-342
E3	RLTEELNTI	526-534
E4	FVDYNFTIV	617-625
E5	LLYSDDALHL	501-510

Figura 5. Estructura tridimensional de TSA-1 de *T. cruzi* obtenida por predicción mediante AlphaFold. Los 5 epítomos se encuentran marcados en color negro.; extremo NH₂- (azul rey), extremo COOH- (rojo).

En trabajos anteriores se ha logrado expresar de forma eficiente a TSA-1 en la bacteria *E. coli*, sin embargo, esta proteína se produce en forma de cuerpos de inclusión que son agregados proteicos mal plegados, por lo que el replegamiento resulta un inconveniente para la producción a nivel industrial, aumentando los costos (De la Cruz *et al*, 2019).

Chagasina como andamio molecular

Aunado al problema de replegamiento, y gracias a la identificación de epítomos, se ha realizado la búsqueda para producir una vacuna recombinante en distintas plataformas que faciliten el plegamiento y que, además, empleen a una proteína de andamiaje molecular la cual contenga los epítomos de TSA-1 fusionados a su estructura (Capelli *et al*, 2017).

La chagasina de *T. cruzi* es un inhibidor de cisteín-proteasas que juega un papel importante en la diferenciación del parásito, así como en la modulación de la cruzipaina (Cz) (Santos, 2005), la cual se encuentra en todas las etapas del ciclo de vida del microorganismo y está involucrada en el proceso de virulencia (Santos, 2005; Cerny *et al*, 2020). Se trata de una proteína monomérica de 110 aminoácidos (Monteiro *et al*, 2001) compuesta de 8 láminas beta y 2 alfa hélices, las cuales se encuentran unidas mediante 6 giros (L1-L6) (Figura 6A) (Salmon *et al*, 2006). Los giros involucrados en la actividad de cisteín-proteasa de la chagasina corresponden a L2, L4 y L6 y muestran una conformación sumamente estable (Da Silva *et al*, 2007). La secuencia de los giros se muestra en la Tabla 2 y Figura 6B.

Estudios previos han logrado sustituir de forma efectiva 2 epítomos de TSA-1 en los giros de la chagasina (L4 y L6). Algunas de estas proteínas quiméricas se expresaron en *E. coli* en forma soluble y con mayores rendimientos que la propia chagasina. En uno de estos trabajos, se reporta la expresión de solo una quimera con 3 epítomos, 2 de ellos en L4 y uno en L6, sin embargo, su expresión fue principalmente en forma de cuerpos de inclusión. Por lo tanto, se desconoce si es posible la modificación del giro L2 y así obtener quimeras con 3 o más epítomos de TSA-1 que se expresen solubles de forma recombinante (Cárdenas-Guerra *et al.*, 2024).

A

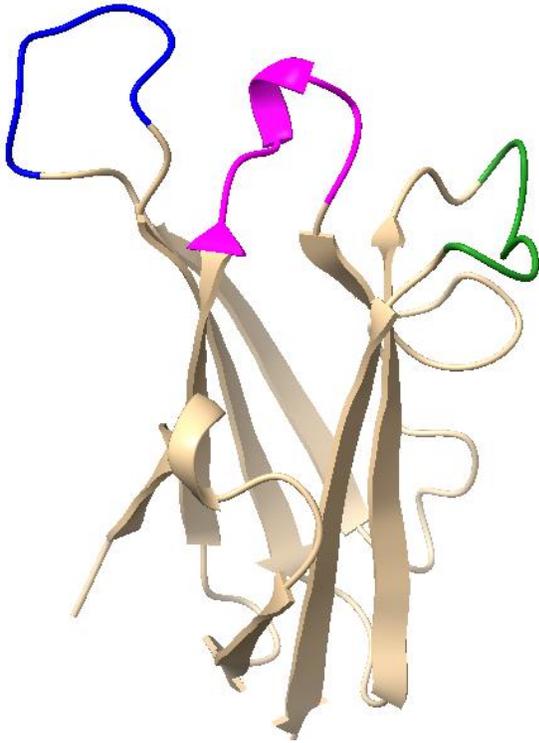


Tabla 2 Secuencias de los giros de la chagasina de *T. cruzi*.

Lazo	Secuencia	Posición en chagasina
L2	SNPTTGF	28-34
L4	DSKLLGA	61-67
L6	WTGPSHD	93-99

B

L2

MSHKVTKAHN GATLTVAVGE LVEIQLPSNP TTGFAWYFEG GTKESPNE SM FTVENKYFPP

DSKLLGAGAGGT EHFHVTVKAA GTHAVNLT YM RPWTGPSHDS ERFTVYLKAN

L4 L6

Figura 6. Panel A) Estructura tridimensional de la chagasina de *T. cruzi* obtenida por predicción mediante AlphaFold. B) Secuencia de aminoácidos de la chagasina de *T. cruzi*. L2 remarcado en morado, L4 remarcado en azul y L6 remarcado en verde

***Pichia pastoris* como plataforma de producción**

Si bien *E. coli* es la plataforma de expresión por excelencia cuando no se requieren modificaciones postraduccionales, la expresión de las proteínas recombinantes en forma de cuerpos de inclusión necesita una etapa extra de replegamiento. Una alternativa es el uso de un sistema de expresión que posea características similares a las de *T. cruzi*, lo que sugiere que el plegamiento sea el esperado y se exprese de forma soluble (Bretthauer *et al*, 1999). Entre las plataformas de producción comúnmente empleadas se encuentra la levadura metilotrófica *P. pastoris*, (conocida también como *Komagataella phaffii*) un sistema de expresión económico que crece a una alta densidad celular con medios de cultivo sencillos, que puede secretar proteínas al medio eficientemente y es capaz de realizar el plegamiento adecuado de proteínas eucarióticas (Radoman *et al*, 2020). Otras características que diferencian a *P. pastoris* como plataforma de producción de proteínas se muestran en la Tabla 3.

Entre las proteínas recombinantes que se han expresado satisfactoriamente en *P. pastoris* se encuentran algunas subunidades vacunales como PIMP-V1 y PIMP-V2 para el tratamiento de malaria (Spiegel *et al.*, 2005), DENV-3E para el tratamiento de Dengue (Tripathi *et al.*, 2015), Tc52 para la enfermedad de Chagas (Matos *et al.*, 2016), varias subunidades para el tratamiento de tuberculosis (Wang *et al*, 2018; Baghani *et al*, 2017; Farsiani *et al*, 2016), así como la proteína RBD para la vacuna contra SARS-CoV-2 (Pollet *et al.*, 2021)

Por otro lado, es necesario recurrir a técnicas de biología molecular para producir proteínas recombinantes, por lo que el uso de vectores se convierte en una herramienta fundamental para la síntesis de las proteínas de interés; en el caso de levaduras, específicamente para *P. pastoris*, algunos vectores han mostrado resultados satisfactorios en la producción de proteínas secretorias (Tabla 4).

Tabla 3. Características en las diferentes plataformas de producción de proteínas recombinantes.

Características	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Células CHO
Tiempo de duplicación	30 min	60-120 min	24hr
Costo del medio de cultivo	Bajo	Bajo	Alto
Complejidad del medio de cultivo	Mínimo	Mínimo	Complejo
Nivel de expresión	Alto	Bajo-Alto	Bajo a moderado
Expresión extracelular	Secreción a periplasma	Secreción al medio	Secreción al medio
Plegamiento de proteína	No	Si	Si
N-glicosilación	No	Si	Si
O-glicosilación	No	Si	Si
Fosforilación y acetilación	No	Si	Si
Inconvenientes	Acumulación de lipopolisacáridos	Sesgo de codones	Contaminación por virus

(Modificado de de Karbalaeei *et al*, 2020).

Tabla 4. Vectores empleados para la producción de proteínas secretorias.

Nombre del vector	Cepa utilizada	Proteína producida
pPIC9K	GS115	Xilanasas, circovirus porcino y endoglucanasa
pPICZa	SMD1168	Quitinasa humana
	GS115	Interferon gamma humano
	Superman5	Insulina
	X-33	Proteína C reactiva y RNAsa humana
pHIL-S1	GS115	Glicoproteína del virus de la rabia
	KM71	
pGAPZa	GS115	Acil homoserinlactonasa
	SMD1168	Receptor variable de linfocito B
	X-33	Lipasa gástrica humana

(Modificado de de Karbalaeei *et al*, 2020)

Uno de los vectores derivados del grupo pPICZa es el plásmido pCri16a el cual contiene un factor de secreción alfa proveniente de *Sacharommyces cerevisiae* que permite la secreción de la proteína al medio; así como la secuencia que codifica para la proteína amarilla fluorescente (EYFP), un sitio múltiple de clonación y un tag de 6 histidinas, requerido para la purificación por afinidad a níquel (Apéndices. Figura 38). Asimismo, el plásmido posee la secuencia del promotor AOX1 que es inducible por la adición a metanol y reprimido por glucosa y etanol (Goulas *et al.*, 2014; *Türkanoğlu et al.*, 2019), el cual permitirá la transcripción del gen que codifica para la proteína de interés que se requiere producir.

JUSTIFICACIÓN

Alrededor de 6 a 8 millones de personas en el mundo padecen de la enfermedad de Chagas, mientras que 65 millones de personas están en riesgo de ser infectadas, por lo que esta enfermedad se manifiesta como un problema de salud grave que afecta principalmente a regiones marginadas de Latinoamérica, lugares donde el diagnóstico y tratamiento se ven limitados debido a la evidente falta de acceso a los mismos, así como a su costo elevado. A su vez, los fármacos que se han desarrollado anteriormente no muestran efectividad en etapas crónicas de la enfermedad y desarrollan efectos secundarios que provocan que los pacientes no terminen el tratamiento.

Debido a esto, la búsqueda de fármacos y vacunas representa un área de oportunidad para el desarrollo científico, sobre todo para la biotecnología de proteínas. Anteriormente se ha analizado la posibilidad de producir proteínas recombinantes que actúen como antígenos que desarrollen una respuesta inmunológica en el paciente, brindándole protección posterior. Un caso muy particular de dichas proteínas recombinantes es el de la proteína de superficie de *T. cruzi*, TSA-1, la cual posee epítopos capaces de ser identificados por linfocitos T y desencadenar una respuesta inmunológica; por lo que se desarrolló un método experimental para fusionar únicamente 2 de los epítopos de TSA-1 en una molécula de andamiaje como lo es la chagasina de *T. cruzi*, con la finalidad de solubilizar a la proteína y que esta se produzca en una plataforma económica como lo es *E. coli*, sin embargo, la mayoría de estas proteínas quiméricas de 2 epítopos no se plegaban adecuadamente, por lo que era insolubles.

Debido a esto, el uso de una plataforma de producción eucariótica como lo es *P. pastoris* permite no solo producir la proteína de forma soluble con un plegamiento adecuado, sino que también disminuye costos al ser un organismo capaz de secretar las proteínas al medio.

Gracias a las características anteriormente mencionadas, en este proyecto se propone producir proteínas quiméricas de chagasina que tengan 3 o 4 epítopos de TSA-1 en su estructura empleando como plataforma a la levadura *P. pastoris*, buscando generar moléculas altamente inmunogénicas capaces de brindar una eficiente inmunización a pacientes infectados con *T. cruzi*.

HIPOTESIS

Es factible expresar de forma recombinante proteínas quiméricas de chagasina con 3 o 4 epítomos de TSA-1 en la plataforma *Pichia pastoris* de manera eficiente.

OBJETIVOS

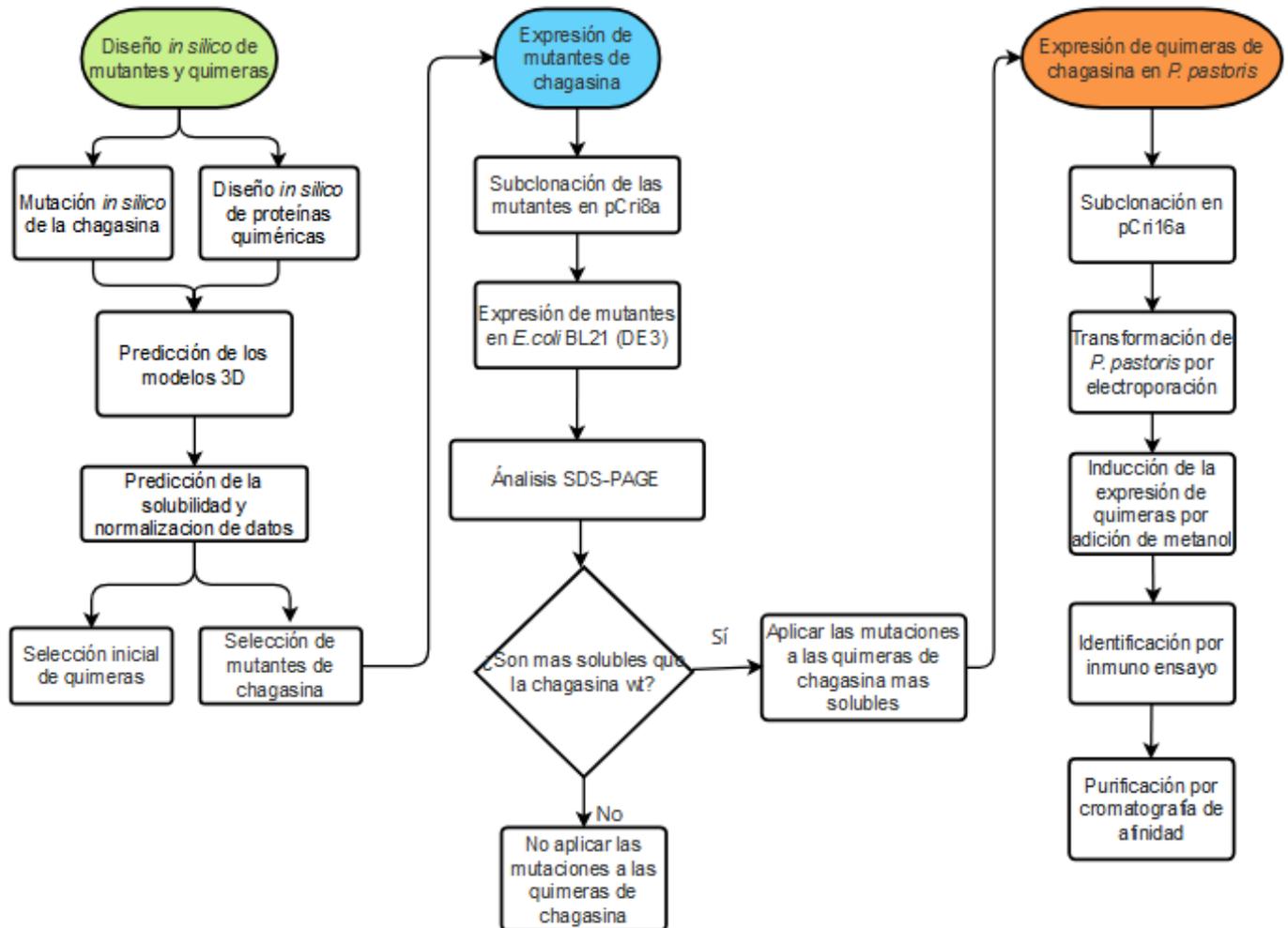
Objetivo general

Sintetizar proteínas quiméricas de chagasina con 3 o 4 epítomos de TSA-1 en la levadura *Pichia pastoris*.

Objetivos específicos

- ✓ Realizar un análisis bioinformático para aumentar la solubilidad de la chagasina mediante mutagénesis dirigida y probar mediante su expresión en *E. coli* BL21 (DE3)
- ✓ Desarrollar el análisis bioinformático de solubilidad mediante distintos softwares, de la sustitución de 3 y 4 epítomos de TSA-1 en los giros L2, L4 y L6 de la chagasina mutada y seleccionar cuatro quimeras con mejor perfil de solubilidad
- ✓ Subclonar las secuencias de quimeras seleccionadas en el plásmido pCri 16a, para su expresión en *P. pastoris*.
- ✓ Expresar las quimeras seleccionadas en *P. pastoris*

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Mutación *in silico* de la secuencia de la chagasina de *T. cruzi* y diseño de quimeras con 3 y 4 epítomos de TSA-1.

La estructura tridimensional nativa de la chagasina (UniProt ID: Q966X9) fue sometida a un análisis de mutación con Agresscan 3D 2.0 (<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D2/>) para incrementar su solubilidad usando la herramienta “Enhance protein solubility” excluyendo a los residuos que comprenden los giros L2, L4 y L6.

Asimismo, las secuencias de los 5 epítomos (E1-E5) de TSA-1 (ID: A0A068FJJ8) se recuperaron de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Posteriormente se realizó la sustitución de aminoácidos de los giros L2, L4 y L6 de la chagasina por la de los epítomos E1, E2, E3, E4 y E5 de TSA-1.

Las combinaciones de proteínas quiméricas con 3 epítomos se obtuvieron sustituyendo un epítomo distinto en cada giro (L2, L4 y L6). Por otra parte, para el diseño de las proteínas quiméricas de cuatro epítomos, se sustituyó un epítomo en L2, otro distinto en L6 y dos epítomos en L4, los cuales están unidos mediante el linker flexible GSGS (Linker Database (<https://www.ibi.vu.nl/programs/linkerdbwww/>), el cual ha sido utilizado anteriormente (Bird *et al.*, 1988, George & Heringa., 2002, Alagheband *et al.*, 2019).

Las secuencias en formato fasta de las mutantes de chagasina y de las quimeras se introdujeron al programa ChimeraX versión 1.5 y mediante la herramienta Structure Prediction>AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021) se obtuvieron las predicciones de las estructuras 3D de las proteínas.

2.-Análisis de similitud de epítomos respecto al giro L2 de la chagasina

Las secuencias en formato fasta de los epítomos E1, E2, E3, E4 y E5 se alinearon con el giro L2 mediante el programa UGENE versión 34, esto para determinar que epítomo era más fisicoquímicamente similar al L2 ya que no ha sido sustituido anteriormente. El alineamiento se llevó a cabo con el método MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation), tomando por default los parámetros otorgados por el programa. Al obtener el alineamiento, la similitud entre los aminoácidos alineados se analizó con la

ayuda de una matriz consenso de distancias (Figura 7), un diagrama de Venn y un árbol filogenético (Figura 8) que muestra la similitud con respecto a las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos (Stephenson & Freeland, 2013).

3.-Predicción de solubilidad de las mutantes de chagasina y de las proteínas quiméricas.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas y de las mutantes de chagasina se introdujeron a los servidores en línea Protein Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) (Hebditch, 2017) y SoDoPe (<https://tisigner.com/sodope>) para predecir su solubilidad.

Por otro lado, el análisis predictivo de la solubilidad empleando la estructura 3D de las proteínas se realizó a través de los servidores CamSol Structured Corrected (<https://wwwcohssoftware.ch.cam.ac.uk/index.php/camsolstrucorr>) (Pietro *et al*, 2015) de la Universidad de Cambridge, considerando un pH de 7; con Aggrescan3D 2.0 (<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D2/>) (Pujols *et al*, 2022), con los parámetros por default brindados por el programa y con el servidor SOLART (http://babylone.ulb.ac.be/SOLART/k_query.php) (Hou, 2020).

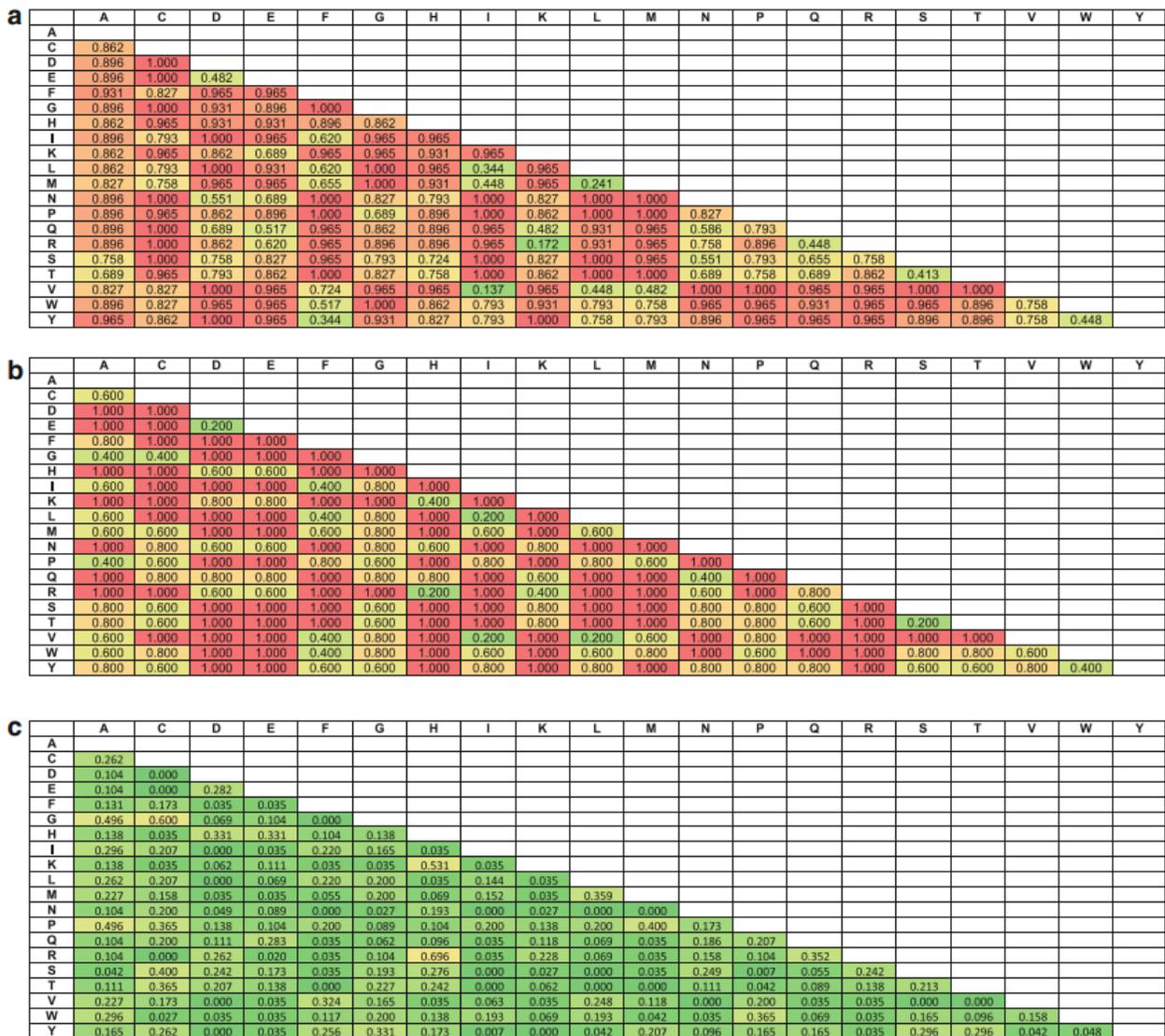


Figura 7 Similitud fisicoquímica entre aminoácidos. Matriz consenso de distancias considerando **a** aminoácidos como residuos dentro de proteínas; **b** propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido individual; y **c** la diferencia entre ambas características. Un valor cercano a 0 (verde) indica mayor similitud entre aminoácidos, mientras que un valor cercano a 1 (rojo) indica menor similitud (Stephenson & Freeland, 2013).

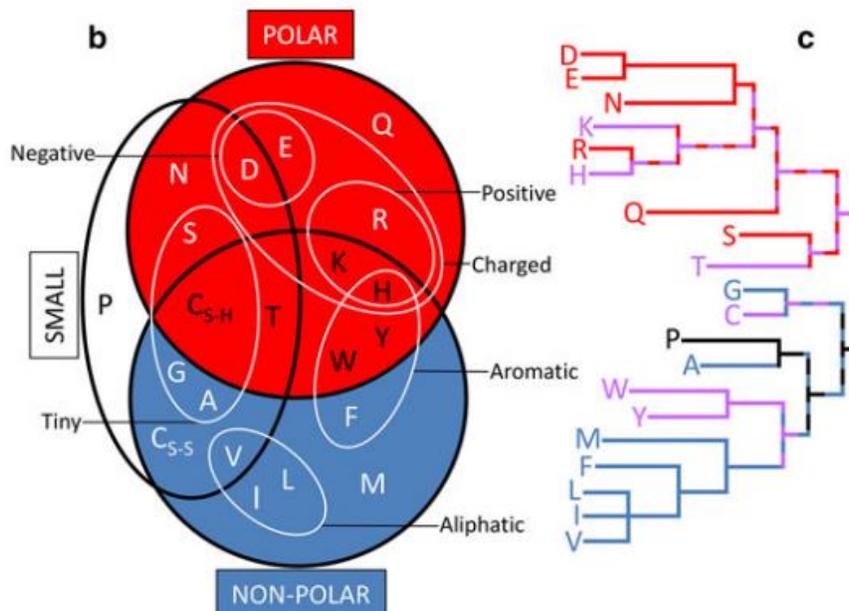


Figura 8. B Diagrama de Venn y C Árbol filogenético que muestran la similitud entre aminoácidos derivada del análisis fisicoquímico de cada aminoácido individual (Stephenson & Freeland, 2013).

4.-Normalización de la solubilidad

La comparación y normalización de los datos de solubilidad obtenidos mediante los servidores se llevó a cabo tomando como base los puntajes de solubilidad de la chagasina nativa (Chag WT), siendo estos considerados como los más altos y dándoles un valor global de 1.0 para cada servidor utilizado. Ya que solo se consideraron los puntajes de solubilidad obtenidos con CamSol y Agresscan 3D, la normalización se basó en el uso de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Sol. normalizada con Agresscan} = 1 - \frac{\text{Sol. de la chagasina wt} - \text{Sol. de la quimera/mutante}}{\text{Sol. de la chagasina}}$$

$$\text{Sol. normalizada con CamSol} = 1 - \frac{\text{Sol. de la chagasina wt} - \text{Sol. de la quimera/mutante}}{\text{Sol. de la chagasina wt}}$$

La solubilidad normalizada obtenida con cada servidor se sumó, teniendo un valor total de 2 para la Chag WT, dato que se tomó como referencia para comparar con los valores obtenidos de las mutantes y quimeras. Se seleccionaron 4 mutantes de chagasina que presentaron dobles mutaciones en su estructura, las cuales se analizaron experimentalmente para comprobar el aumento de solubilidad de estas. Por otra parte, se eligieron 10 quimeras con 3 epítomos, y 10 quimeras con 4 epítomos de TSA-1 para analizar posteriormente el efecto de las mutaciones en estas proteínas.

8.-Subclonación, expresión en *E. coli* y purificación de las mutantes de chagasina

Con el fin de corroborar el aumento de la solubilidad al mutar *in silico* el núcleo de la chagasina y así poder aplicar las mutaciones en las 20 quimeras seleccionadas, las secuencias de 4 mutantes se enviaron para su síntesis química a Synbio Technologies. Células quimiocompetentes de *E. coli* DH5a se transformaron con los plásmidos que contenían las construcciones enviadas por la compañía. Posterior a la incubación de las células a 37°C durante 18 hrs, 5 clonas se seleccionaron para realizar PCR de colonia con el Thermal Cycler T100 de BioRad. Tras verificar la presencia de los plásmidos se digirieron 10 µg de los mismos con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, para liberar los insertos. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 3 hrs y al finalizar la misma, toda la reacción se analizó en una electroforesis en gel de agarosa al 2% para purificar

los insertos del gel mediante el kit de extracción y purificación de gel QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Los insertos se cuantificaron cuantificados por espectrofotometría a 260 nm con el espectrofotómetro UV/Visible NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), para llevar a cabo una reacción de ligación con relación molar 1:10 (plásmido-inserto) con el plásmido pCri8a (Apéndices. Figura 39), utilizando la ligasa T4 de New England Biolabs. La reacción de ligación se llevó a cabo durante 16 hrs a 16°C y 2 hrs a 25°C.

Posteriormente, células quimiocompetentes de *E. coli* DH5a se transformaron por choque térmico con 5 µL de las reacciones de ligación. Las células competentes se cultivaron en medio LB con 50 µg/mL de kanamicina y se incubaron a 37°C durante 18 hrs. Para verificar la presencia de las construcciones, 2 clonas de cada mutante se seleccionaron para lisarlas con 1 mg/mL de lisozima, incubación a 37°C por 15 minutos y 100°C por 15 minutos y analizarlas por PCR de colonia con el Thermal Cycler T100 de BioRad. Los productos de la amplificación se identificaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Finalmente se realizó la extracción de las construcciones de pDNA por lisis alcalina con el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) para su posterior cuantificación por espectrofotometría.

Para la expresión de las mutantes de chagasina, células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) se transformaron por choque térmico con 1 µL de las construcciones obtenidas. Las células se incubaron 18 hrs a 37°C y una colonia se seleccionó para inocular 5 mL de medio LB con 50 µg/mL de kanamicina. Este preinóculo se incubó 16 hrs a 37°C, se tomaron 500 µL y se inocularon 50 mL de medio 2TY para inducir; asimismo, al inocular se tomó el volumen equivalente a 1 U.A para analizar esta muestra como la fracción no inducida. El medio 2TY se incubó a 37°C y se midió su densidad óptica hasta que el cultivo alcanzara una OD de 0.6 a 600 nm, momento donde se añadió 0.5 mM de IPTG. La inducción se realizó durante 18 hrs a 20 °C con agitación de 200 rpm. Al finalizar el tiempo de inducción se tomó el volumen equivalente a 1 U.A, lo que correspondía a la fracción inducida. Asimismo, nuevamente se tomó el volumen equivalente a 1 U.A, el cual se lisó con el amortiguador BugBuster (Merck), donde el sobrenadante se analizó como la fracción soluble, y el pellet como la fracción insoluble.

Para identificar el aumento en la expresión soluble de las mutantes, las fracciones solubles de estas se cuantificaron con la metodología del ácido bicinconínico (BCA) a una longitud de onda de 562 nm. 4 µg de cada fracción soluble se analizaron en un SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida.

Tras analizar la expresión de las proteínas se procedió a purificarlas mediante cromatografía por afinidad a níquel con el sistema ÄKTA PURE de Cytivia. Se inocularon 500 mL de medio 2TY con 50 µg/mL de kanamicina con un preinóculo previamente realizado y se realizó el mismo protocolo de inducción previamente descrito. Posterior a la inducción, el cultivo celular se centrifugó a 7500 rpm durante 20 minutos y la pastilla celular se recuperó para lavarla con 10 mL/g de biomasa de PBS 1X pH 7.4. Después del lavado, el cultivo se centrifugó nuevamente, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Para lisar la pastilla, ésta se resuspendió en 10 mL/g de buffer de lisis y se añadió lisozima a una concentración final de 0.5 mg/mL. La suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y se sonicó a 30% de potencia, durante 10 ciclos, 30 s de sonicación y 30 s de reposo. Al finalizar la sonicación, se añadió DNAsa al lisado a una concentración final de 1 µg/mL, y se incubó a 30°C durante 30 minutos. El lisado se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 minutos, se separó el sobrenadante y se filtró a 0.44 µm. El lisado ya filtrado se inyectó a una columna His-Trap de 5 ml (Cytiva) acoplada al sistema de cromatografía ÄKTA PURE de Cytivia. El buffer A utilizado para equilibrar la columna corresponde al buffer de lisis anteriormente mencionado, mientras que el buffer B únicamente aumenta su concentración de Imidazol a 500 mM, manteniendo igual las concentraciones de los demás componentes. Posterior a la inyección de la muestra, el buffer B se inyectó a la columna para llevar a cabo la elución de la proteína bajo un gradiente de imidazol que inició en 7% de buffer B y finalizó en 100% de buffer B. Las fracciones recuperadas del cromatógrafo se resolvieron en un SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida.

9.-Estabilidad térmica de las mutantes de chagasina

Para analizar la termoestabilidad de las mutantes de chagasina purificadas se sometieron a ensayos de termofluorimetría (thermal shift) a diferentes pH's. Inicialmente, las proteínas se cambiaron a diversos buffers con las columnas Micro Bio Spin 6 de

BioRad; los pH's utilizados fueron pH 8.5 y 7.5 en buffer Tris-HCl, pH 6.0 en Bis-Tris y pH 4.5 en buffer de acetatos. Cada buffer contenía además 100 mM de NaCl y 0.02% de azida de sodio. Al cambiar las proteínas de buffer, su concentración se cuantificó por el método de BCA. Finalmente, las reacciones de Thermal Shift se llevaron a un volumen final de 25 μ L, con una concentración final de SyproOrange 10x, así como 15 μ M de proteína. El ensayo se realizó con un gradiente de temperatura de 25°C a 90°C a través de qPCR en el equipo GENTIER 48E de IANLONG.

6.- Mutación de las quimeras de chagasina, predicción de solubilidad y selección final de quimeras.

Tras analizar el efecto en la solubilidad de las mutaciones al núcleo de la chagasina de forma experimental, estas sustituciones se aplicaron a las secuencias de aminoácidos de las 10 quimeras más solubles de 3 epítomos y de las 10 quimeras de 4 epítomos, por lo que se determinó nuevamente cada modelo de la estructura tridimensional de las 20 proteínas con AlphaFold. Las estructuras consideradas para la predicción de solubilidad con Agresscan3D y CamSol fueron aquellas que presentaron valores de confiabilidad (pLDDT) mayores a 50.

De las quimeras mutadas con 3 y 4 epítomos que presentaron mayor puntaje de solubilidad se seleccionaron 2 quimeras con 3 epítomos y 2 quimeras con 4 epítomos; las secuencias de aminoácidos se tradujeron de forma reversa a secuencias de nucleótidos con la herramienta Reverse Translate (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) para visualizar los posibles sitios de corte con enzimas de restricción.

Los genes codificantes de las quimeras se diseñaron *in silico* integrando en los extremos 5' y 3' los sitios de restricción NcoI y XhoI respectivamente para llevar a cabo la clonación en el plásmido pCri16a, asimismo, no se añadió codón de paro a las secuencias ya que este se encuentra integrado en la etiqueta de histidinas que posee el plásmido pCri16a en el extremo carboxilo.

Finalmente, las secuencias de los genes se optimizaron para su expresión en *P. pastoris* y se sintetizaron por la empresa Synbio Technologies.

7.-Obtención de propiedades fisicoquímicas de las quimeras

El pl y el peso molecular (kDa) de las quimeras seleccionadas se calculó mediante la herramienta ProtParam del servidor web ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

10.-Recuperación de cepa de *P. pastoris* Superman 5

La cepa de *P. pastoris*, Superman 5 se recuperó de gliceroles realizados anteriormente por el equipo de trabajo del Laboratorio 23 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav, CDMX. Esta se resembró por estría cruzada en medio YPD y se incubó a 30°C durante 3 días.

11.-Subclonación de las proteínas quiméricas de chagasina en el plásmido pCri16a.

El plásmido pCri16a-GFP (Apéndices. Figura 38) se recuperó de células *E. coli* DH5a por lisis alcalina mediante el kit de extracción QIAprep Spin Midiprep kit (QIAGEN), el cual se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm.

Por otra parte, células quimiocompetentes de *E. coli* DH5a se transformaron con 5 µL de las construcciones enviadas por SynBioTechnologies en el plásmido pUC57 para la propagación de los mismos y se extrajeron por lisis alcalina con el kit previamente mencionado. Los ácidos nucleicos se cuantificaron. A continuación, se realizó la doble digestión de 10 µg de pCri16a-YFP, así como de los plásmidos pUC57-Q6 V18K-F58R, pUC57-Q34 V18R-F58K, pUC57- Q19 V18R-F58R y pUC57- Q109 V18K-F58K con las enzimas de restricción NcoI y XhoI. La digestión se llevó a cabo durante 5 horas a 37°C. Las reacciones se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2% para identificar la liberación de los insertos correspondientes a las quimeras Q6 V18K-F58R, Q34 V18R-F58K, Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K; a su vez, el plásmido pCri16a digerido se analizó con una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Tanto los insertos como el plásmido pCri16a se purificaron de los geles de agarosa mediante el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y se cuantificaron a 260 nm.

Al obtener los insertos y el plásmido pCri16a purificados se procedió a realizar las ligaciones entre los mismos. Las reacciones de ligación entre las quimeras Q34 V18R-F58K, Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K y el pCri16a se realizaron con la enzima

ligasa convencional del Fago T4 de New England Biolabs, utilizando una relación molar de 1:10 (plásmido-inserto), incubando la reacción a 16°C, 16 hrs y 10 minutos a 25°C. Por otra parte, la reacción de ligación entre la quimera Q6 V18K-F58R y el plásmido pCri16a se realizó con la enzima Ligasa T4 rápida de New England Biolabs, incubando la reacción a 22°C durante 5 minutos, con una relación molar de 1:3 (plásmido-inserto).

Transcurrido el periodo de ligación, 50 µL de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5a se transformaron por choque térmico con 5 µL de las reacciones de ligación obtenidas. Las células transformadas se incubaron con 1mL de LB bajo en sales durante 1 hr a 37°C, 200 rpm. Posteriormente, 100 y 400 µL de la mezcla de transformación se sembraron en LB bajo en sales con zeocina a una concentración de 100 µg/mL y se incubaron a 37°C durante 18 hrs.

Entre 4 a 10 colonias de cada construcción se resembraron en LB bajo en sales con 100 µg/mL de zeocina, y únicamente una colonia de cada construcción se sometió a una extracción de pDNA por lisis alcalina mediante con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Estas construcciones se cuantificaron por espectrometría a 260 nm y 500 ng se digirieron durante 3 hrs a 37°C con las enzimas de restricción NcoI y XhoI. Finalmente, las reacciones de digestión se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar la presencia de las bandas del tamaño esperado de los genes que codifican para las 4 quimeras, así como del plásmido pCri16a digerido.

La extracción de DNA plasmídico de las construcciones pCri16a-Q6 V18K-F58R, pCri16a-Q34 V18R-F58K, pCri16a-Q19 V18R-F58R y pCri16a-Q109 V18K-F58K se realizó por lisis alcalina con el kit de extracción QIAprep Midiprep Kit (QIAGEN), y a su vez se cuantificaron los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nm.

13.-Transformación de *P. pastoris* Superman 5 y verificación de clonas transformantes

5 µg de DNA plasmídico de cada construcción distinta (pCri16a-Q6 V18K-F58R, pCri16a-Q34 V18R-F58K, pCri16a-Q19 V18R-F58R y pCri16a-Q109 V18K-F58K) se linealizaron con la enzima de restricción PmeI (Apéndices Tabla 18). La reacción de linealización se incubó durante 5 hrs a 37°C y se inactivó a 65°C durante 10 minutos. Las reacciones se

mezclaron con 80 μ L de células electrocompetentes de *P. pastoris*, se incubaron durante 2 minutos en hielo y se sometieron a electroporación en el equipo Eporator de Eppendorf a 1300-1500V de 3 a 5 ms. Seguido esto, las células se resuspendieron en 1 mL de sorbitol 1M y se incubaron 3 hrs a 30°C sin agitación. Las células transformantes se sembraron por extensión con varilla en placas de YPDS que contenían 100 μ g/mL de zeocina, las cuales se incubaron a 30°C durante 4 días. Asimismo, 200 μ L de las células transformantes se sembraron en placas de YPDS con 500 μ g/mL de zeocina.

Transcurrido el periodo de incubación se seleccionaron 7 clonas de cada construcción que crecieron a una concentración de zeocina de 100 μ g/mL y 3 colonias de cada construcción que crecieron a una concentración de zeocina de 500 μ g/mL para resembrarlas; donde únicamente 3 clonas de cada construcción se seleccionaron para ser analizadas por PCR.

Para determinar la integración del casete de expresión al genoma de *P. pastoris*, se utilizó el método rápido de PCR de colonia reportado por Linder *et al.*, 1996, bajo ciertas modificaciones mencionadas por De Baere *et al.*, 2002, donde el protocolo final modificado se describe a continuación: cada clona se creció en un tubo de 5mL con medio YPD durante 24 hrs a 30°C y 200 rpm. Posteriormente, 10 μ L del medio de cultivo se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 10 μ L de agua libre de DNAsas y se hirvió durante 5 minutos, para después enfriarse a temperatura ambiente durante 5 minutos. A cada muestra se le añadieron 2.5 μ L de Liticasa (10 U/ μ l) y se incubaron a 30°C por 10 minutos. Las muestras se congelaron a -80°C durante 15 minutos y se descongelaron a temperatura ambiente, para nuevamente centrifugarse a 10,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó como templado de DNA para la PCR en el Thermal Cyclor T100 de BioRad.

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L, utilizando dos oligos distintos por cada PCR en el extremo 5' (Forward) para asegurar la correcta integración del casete: 5'AOX1 y 5'alpha-factor, así como el uso del oligo 3'AOX1 (Reverse). A su vez, se llevó a cabo una PCR específica con oligos Fw que flanquean únicamente la secuencia de las quimeras. La composición de las reacciones de PCR se describe a

continuación: 2.5 μL de buffer de reacción 10x Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen), 0.5 μL de Mix DNTP's 10mM, 1 μL de MgCl_2 25mM, 1 μL del oligonucleótido forward, 1 μL del oligonucleótido reverse, 5 μL del lisado celular, 0.4 μL de Taq platinum polimerasa brindada por el laboratorio de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, y 13.5 μL de agua estéril.

14.-Resistencia a zeocina de las transformantes de *P. pastoris*

Tras confirmar la presencia de la integración del cassette de expresión al genoma de la levadura de las clonas analizadas éstas se sembraron por estría simple en placas de YPDS con diferentes concentraciones de zeocina (100, 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Debido a que se planteó expresar primero las quimeras de 4 epítomos, 4 clonas de la construcción pCri16a-Q19 V18R-F58R y 3 clonas de la construcción pCri16a-Q109 V18K-F58K que habían crecido en 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zeocina se analizaron nuevamente por PCR.

15.-Identificación del fenotipo generado en las transformantes de *P. pastoris*

Previo a la inducción de la expresión de las proteínas quiméricas, se realizó un ensayo para la identificación del fenotipo de las transformantes de *P. pastoris*. Esto fue determinado utilizando la metodología descrita en el manual *Easy Select Pichia* de Invitrogen: utilizando palillos de madera estériles se sembraron por picadura 9 clonas de las quimeras Q6 V18K-F58R, Q34 V18R-F58K y Q109 V18K-F58K y 4 clonas de la quimera Q19 V18R-F58R tanto en placas con Medio Mínimo con Dextrosa e Histidina (MDH) como en Medio Mínimo con Metanol e Histidina (MMH). Como controles se utilizaron las cepas *P. pastoris* X-33 (Mut^+) y *P. pastoris* KM71H (Mut^s). Las placas se incubaron durante 3 días a 30°C y se observó el crecimiento.

16.-Expresión en matraz de las quimeras recombinantes de 4 epítomos Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K

Inicialmente, una clona transformante previamente verificada por PCR se seleccionó para llevar a cabo la inducción de la inducción de las proteínas quiméricas Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K. Cada clona se creció en 25 mL de medio BMGY durante 16-18 hrs, a 30°C con agitación de 150 rpm. Cuando la D.O llegó a ~ 2 , la biomasa se recuperó centrifugando el medio a 3000xg durante 5 minutos. Posteriormente, la biomasa se resuspendió en 100 mL de medio BMMY. La inducción se llevó a cabo a una

temperatura de 30°C con agitación de 150 rpm; adicionando metanol a una concentración final de 0.5%, durante 5 días, cada 24 hrs. Para el análisis de expresión y detección por inmunoensayo, se recuperaron muestras de 1mL cada 24 hrs, separando la biomasa del sobrenadante mediante centrifugación a 5000xg durante 3 minutos. Tanto la biomasa como el sobrenadante obtenido se analizaron para identificar la presencia de las proteínas quiméricas.

Se determinó el peso húmedo de la biomasa y ésta se lisó con el mismo volumen de YeastBuster de Novogen según el protocolo descrito por la empresa; además, para garantizar una eficiente lisis celular, se emplearon perlas de vidrio de 426-600 µm de Sigma. Las perlas de vidrio se lavaron con HCl 5M, se enjuagaron con agua destilada hasta que las perlas tuvieran un pH aproximado a 7 y se secaron a 37°C toda la noche. Una vez resuspendida la biomasa, se agregó el mismo volumen de YeastBuster en perlas de vidrio. La lisis celular se realizó mediante la agitación en vortex con 8 ciclos de agitación durante 30 s con intervalos de incubación en hielo durante 30 s. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó para analizarse como lisado celular en Dot-Blot.

Las proteínas presentes en el sobrenadante se concentraron con la metodología del ácido tricloroacético (TCA) basado en lo siguiente: 100 µL de TCA al 100% se añadieron a 1mL de medio, la mezcla se homogeneizó con el uso de vortex durante 5 segundos y se incubó en hielo por 1 hr. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 14,000xg durante 10 minutos, para después hacer 2 lavados con 100 µL de acetona cada uno y hacer un spin de 14,000 xg durante 5 minutos entre cada lavado. Al finalizar los lavados se retiró la acetona residual y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Seguido esto, las muestras se disolvieron en 100 µL de TBS 1X para su análisis con Dot-Blot.

17.- Identificación de las quimeras Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K por inmunoensayo Dot-Blot

Para identificar el tiempo donde existía mayor expresión de las proteínas quiméricas de 4 epítomos, Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K, se analizaron las muestras correspondientes a los tiempos t0 (Fracción no inducida), t1 (24 hrs), t2 (48 hrs), t3 (72hrs), t4 (96 hrs) y t5 (120 hrs) tanto del lisado celular como de las proteínas

concentradas del sobrenadante. Para el ensayo de Dot-Blot, 100 μ L de las muestras se absorbieron mediante la aplicación de vacío constante a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m humedecida con TBS 1X situada en una placa de 96 pozos acoplada a un colector de microfiltración "Bio-dot microfiltration minifold" de BioRad. Posterior a la absorción de las muestras, la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau y se lavó con TBS 1X hasta retirar completamente el colorante. Una vez lavada la membrana, esta se bloqueó con leche descremada Difco Skim Milk al 10% en TBS 1X-Tween 20 al 0.1% toda la noche a 4°C con agitación constante.

La membrana bloqueada se lavó cada 10 minutos durante 5 veces, cada una con TBS 1X-Tween 20 al 0.1%. Una vez realizados los lavados, la membrana se incubó a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario α -chagasina de ratón (Anti-Chag M) a una dilución de 1:1000, en una solución de TBS 1X-Tween 20 al 0.1% con leche descremada Difco Skim Milk al 5%. Al finalizar el periodo de incubación, la membrana se lavó nuevamente 5 veces con TBS 1X-Tween 20 al 0.1%. Después, la membrana se incubó 2hrs a 37°C con el anticuerpo secundario α -ratón acoplado a HRP (Anti-M HRP) a una dilución de 1:3000 en una solución de TBS 1X-Tween al 0.05% con leche Difco Skim Milk al 2.5%. Posterior a la incubación, se repitieron los 5 lavados de la membrana con TBS 1X-Tween 20 al 0.1% para finalmente, revelar la membrana por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Femto PLUS.

Para la correcta identificación del tag de histidinas en las proteínas quiméricas de las clonas Q19 V18R-F58R y Q109 V18K-F58K, 300 μ L de las muestras se absorbieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m con el método descrito anteriormente. El procedimiento del inmunoensayo se repitió como lo descrito anteriormente, únicamente cambiando el anticuerpo primario por α -His tag monoclonal del Amino-terminal comercial de Invitrogen a una dilución 1:3000. Como control positivo se utilizó una vez más la quimera Q109 ya producida en *E. coli* y probada anteriormente con el anticuerpo anti-His, y como control negativo, lisozima comercial de huevo a una concentración de 1.25 mg/mL. La inmunodetección por quimioluminiscencia se realizó nuevamente con el kit SuperSignal West Femto PLUS.

18-Purificación de la quimera Q109 V18K-F58K por cromatografía de afinidad a níquel

Una vez identificada la presencia de las proteínas quiméricas en el sobrenadante del cultivo, se procedió a la purificación únicamente de la quimera Q109 V18K-F58K por cromatografía de afinidad a níquel. Los 100 mL del sobrenadante obtenidos se recircularon por una columna de 1mL His-Trap (Cytivia) acoplada al sistema de purificación NGC de Biorad. Posterior a la inyección de la muestra se realizaron 10 lavados con buffer A (PBS 1x 500 mM NaCl, 5mM de Imidazol, y un coctel de inhibidores de proteasas, 1mM de betamercaptoetanol), 7 lavados con 7% de buffer B (PBS 1x 500 mM NaCl, 5mM de Imidazol, y un coctel de inhibidores de proteasas, 1mM de betamercaptoetanol) y finalmente un paso de elución con un gradiente de 7 a 100% de buffer B. Las fracciones correspondientes al lavado con 7% de B, así como del gradiente de buffer B se recuperaron en volúmenes de 1 mL, para posteriormente ser analizados mediante un SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida.

Para identificar nuevamente la presencia de la proteína quimérica se llevaron a cabo dos Western Blot de las fracciones obtenidas de la purificación, utilizando tanto α -Chagasina como α -Histidinas. Inicialmente, las fracciones se resolvieron en un SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida para después transferirse a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m. La transferencia se realizó a 4°C, con un paso inicial de 30 minutos a 40V, seguido de un paso de 1 hr a 100V. Al finalizar la transferencia, la membrana se tiñó nuevamente con rojo de Ponceau y se incubó con los anticuerpos anteriormente mencionados usando la metodología presentada en el ensayo Dot-Blot. Finalmente, la membrana se reveló por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Femto PLUS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.-Mutación *in silico* al núcleo de la chagasina y predicción de la solubilidad.

Gracias al análisis de mutación dirigida en la chagasina, Aggrescan 3D 2.0 plantea distintos sitios de mutación que se prevé, pueden acrecentar el perfil de solubilidad de la proteína (Tabla 5, Figura 9), donde el servidor nos brinda la diferencia energética entre el residuo silvestre y el mutado en kcal/mol (efecto energético), y la comparación de puntuación que indica la diferencia promedio de los puntajes entre la proteína silvestre y la mutada; mientras más bajos sean ambos parámetros, menor propensión tendrá la proteína mutante a agregarse (Pujols *et al.*, 2022). Con esta información se analizaron aquéllas mutaciones que generaban un efecto energético menor, así como una comparación de puntuación baja, por lo que se decidió realizar la sustitución del residuo Valina 18 (V18) por Arginina (R) o Lisina (K); así como de la Fenilalanina 58 (F58) por Arginina (R) o Lysina (K), observando que las dobles mutaciones brindaban un aumento de la solubilidad *in silico* de hasta el 80% con respecto a las mutaciones simples y a la variante silvestre, tal como se muestra en la Tabla 6 y en la Figura 10 . La sustitución de estos aminoácidos hidrofóbicos por hidrofílicos coincide con estudios anteriores donde indican que la exposición de residuos hidrofóbicos en la superficie (Val, Leu, Ile, Phe, Met, etc) de una proteína promueve la agregación de ésta ya que en general, stos residuos tienden a encontrarse hacia el interior de la misma, mientras que los residuos hidrofílicos se presentan expuestos al solvente (Malleshappa *et al.*, 2014)

Tabla 5. Comparación energética de las mutantes de chagasina. Mutaciones seleccionadas se encuentran marcadas en rojo.

Mutante	Efecto energético (kcal/mol)	Comparación de Puntuación
V18R	-0.3147	-0.098
V18K	-0.3777	-0.0883
M1R	-0.1962	-0.0559
M1K	-0.1584	-0.0505
L21R	0.052	-0.0523
Y106K	0.2426	-0.0372
F58K	0.6055	-0.0807
F58R	0.6352	-0.0824
Y106R	0.7933	-0.0734
L21K	0.6734	-0.0555

La solubilidad es una propiedad sumamente importante en las proteínas con objetivos farmacológicos ya que ésta indica si una proteína se encuentra plegada, de manera que adquiere la estructura tridimensional adecuada que le permitirá tener actividad, por el contrario, una proteína mal plegada se agrega, formando cuerpos de inclusión que carecen de actividad (Vihinen, 2020). Además, la solubilidad juega un papel fundamental en la determinación de las propiedades fisicoquímicas, procesamiento y tiempo de vida media de una proteína (Grossman & McClements, 2023).

Con fines prácticos, las mutantes de chagasina se presentarán con la nomenclatura indicada en la Tabla 6.

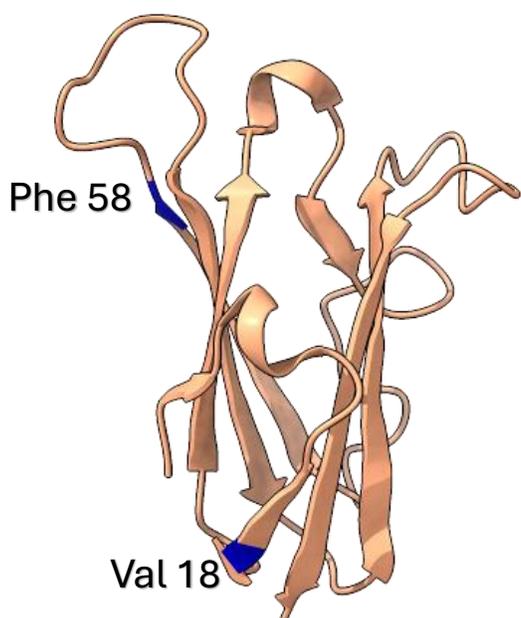


Tabla 6. Valores de pLDDT y solubilidad normalizada de las mutantes de chagasina.

Mutante	pLDDT (%)	Solubilidad normalizada
Chagasina V18R-F58R (Chag RR)	92.4	2.83
Chagasina V18R-F58K (Chag RK)	92.2	2.82
Chagasina V18K-F58R (Chag KR)	92.5	2.81
Chagasina V18K-F58K (Chag KK)	93.8	2.79
Chagasina WT	-	2.0

Figura 9. Aminoácidos a mutar del núcleo de la chagasina

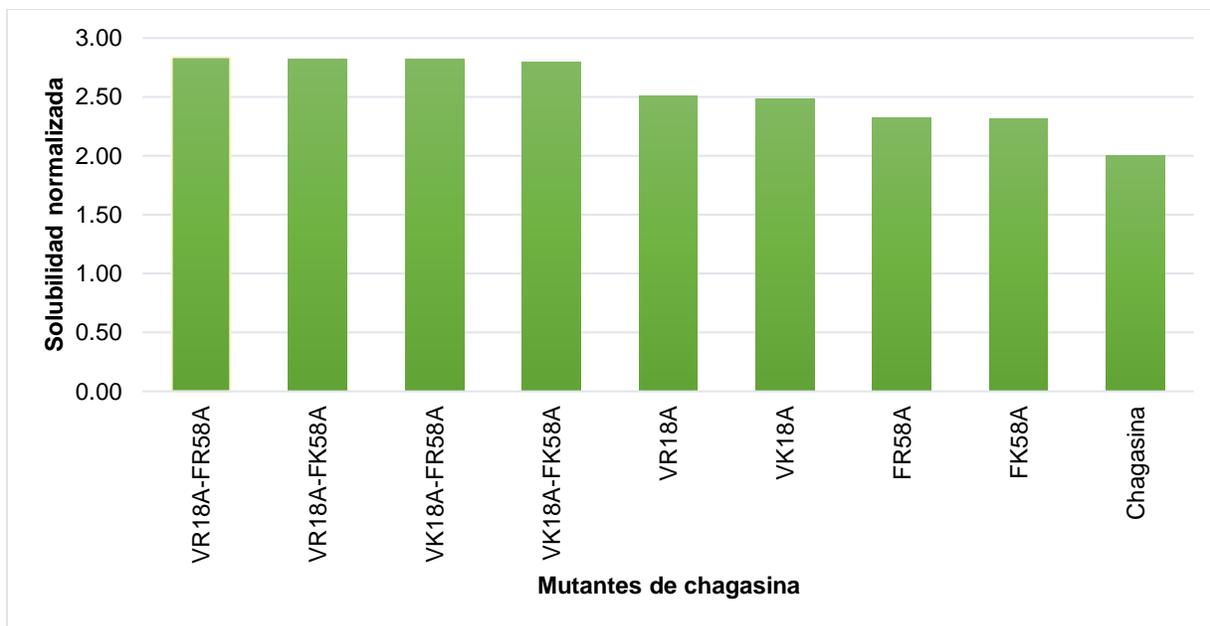


Figura 10. Valores normalizados de solubilidad de la chagasina mutada en distintas posiciones.

2.-Diseño in silico de proteínas quiméricas multiepítipo y predicción de solubilidad.

Para realizar la síntesis de las proteínas quiméricas de chagasina con los epítomos de TSA-1, inicialmente estos se sustituyeron en los giros L2, L4 y L6 respectivamente para generar las secuencias de aminoácidos correspondientes y así, predecir su solubilidad mediante diversos servidores.

Se obtuvieron 60 quimeras de 3 epítomos distintas y 120 quimeras de 4 epítomos de las cuales se predijó su solubilidad (Apéndices. Tablas 20 y 21). Los servidores que predicen la solubilidad de las proteínas quiméricas empleados en este proyecto como lo son ProteinSol y SoDoPe emplean únicamente la secuencia de aminoácidos, mientras que SOLart, CamSol Structural Corrected y Aggrescan 3D utilizan el modelo tridimensional en formato PDB para calcular un puntaje de solubilidad. Protein Sol brinda resultados de 0-1, donde, mientras el valor sea más elevado y cercano a 1, la proteína será soluble. Considera alrededor de 35 características de la proteína y composición de los 20 aminoácidos para determinar la solubilidad (Hebditch, 2017). Por otra parte, SoDoPe se basa en el cálculo de la flexibilidad de la proteína la cual, genera una nueva posición y peso independiente de la longitud para predecir un score de solubilidad basado

únicamente en la composición de la secuencia. En el caso de SOLart, este brinda valores porcentuales donde aquéllos cercanos a 0 indican probabilidad de agregación, mientras que valores cercanos a 130 indican alta probabilidad de solubilidad (Hou, 2020). Asimismo, CamSol Structural Corrected brinda scores variados, donde mayores que 1 denotan proteínas altamente solubles, mientras que scores más bajos a -1 indican baja solubilidad (Pietro *et al.*, 2015). Finalmente, Agresscan 3D se basa en las propiedades termodinámicas presentes en la estructura, específicamente en la energía libre de Gibbs. Mientras más negativa la diferencia, se trata de un estado energéticamente más favorable o estable, por lo tanto, más soluble (Pujols *et al.*, 2022).

Al tomar en cuenta las características anteriormente mencionadas de cada servidor, se decidió eliminar los datos de solubilidad obtenidos con ProteinSol y SoDoPe mostrados en las Tablas 20 y 21, ya que al predecir la solubilidad únicamente con la secuencia, las interacciones moleculares que realmente suceden dentro de la estructura tridimensional de la proteína no se consideran, por lo que si la secuencia de aminoácidos es exactamente la misma entre una quimera y otra, sin importar la posición de los epítomos, los valores calculados por estos servidores serán los mismos, lo que disminuye la confiabilidad en los datos. Se ha reportado que no solo la secuencia de aminoácidos afecta la solubilidad, sino también factores como fuerza iónica, temperatura, pH, propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, hidrofobicidad, aromaticidad, polaridad de los residuos de superficie y las interacciones entre aminoácidos juegan un papel fundamental (Kramer *et al.*, 2012).

A su vez, se decidió no considerar a las quimeras que poseían en su estructura al E4 en cualquiera de sus posiciones ya que la secuencia de aminoácidos de E4 mostrada en la Tabla 1, posee en su mayoría residuos hidrofóbicos como Valina, Isoleucina y Fenilalanina, generó quimeras de chagasina altamente insolubles visibles en las Tablas 20 y 21, por lo que éstas quimeras se descartaron para la posterior selección final. Kyte y Doolittle indican en su escala realizada en 1982, que aminoácidos como la Val, Ile y Phe son los aminoácidos más hidrofóbicos entre los 20 que existen (Kyte & Doolittle, 1982)

Otro aspecto importante que considerar para el diseño de las proteínas quiméricas de chagasina que contengan 4 epítomos fue la selección del linker, el cual es necesario para

la unión de secuencias dentro de una proteína de fusión. Los linkers se clasifican en tres categorías estructurales los cuales son flexibles, rígidos y de corte. Un alto contenido de aminoácidos pequeños y polares como Glicina y Serina producen linkers altamente flexibles (Chen *et al.*, 2013). Por otro lado, los linkers rígidos se caracterizan por tener múltiples residuos de Prolina que generan estructuras de alfa-hélices (Alagheband *et al.*, 2019). Ya que se han reportado anteriormente linkers que contienen secuencialmente Glicina y Serina (Negahdripour *et al.*, 2018), se optó por emplear este linker.

Por otra parte, otra característica que se consideró en el diseño *in silico* de las proteínas quiméricas de 4 epítopos fue la elección del giro que contendría en su estructura a 2 epítopos unidos por el linker anteriormente mencionado. Para poder establecer que en el giro L4 de la chagasina era factible colocar dos epítopos de TSA-1 se recurrió al análisis de cisteín-proteasas provenientes de otras especies del género *Trypanosoma*, donde *Trypanosoma brucei* posee un giro L4 con una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos (Da Silva *et al.*, 2007), lo que dió pauta para que, en el diseño de las proteínas quiméricas de este proyecto, se colocaran dos epítopos en L4. De tal forma, al considerar estos primeros parámetros de selección se obtuvo la información presentada en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Datos de solubilidad normalizados de las quimeras de 3 epítomos.

Quimera	Epítomos			Agresscan 3D	CamSol	Total
Chagasina	L2	L4	L6	1.0000	1.0000	2.0000
Q3E_6	E1	E3	E5	0.7970	1.1261	1.9231
Q3E_11	E1	E5	E3	0.8308	1.0479	1.8787
Q3E_27	E3	E1	E5	0.5956	1.0140	1.6097
Q3E_34	E3	E5	E1	0.7396	0.9535	1.6931
Q3E_50	E5	E1	E3	0.7809	0.8986	1.6795
Q3E_55	E5	E3	E1	0.9584	0.9162	1.8745
Q3E_1	E1	E2	E3	0.6696	0.8817	1.5513
Q3E_4	E1	E3	E2	0.7546	0.9649	1.7195
Q3E_13	E2	E1	E3	0.7346	0.4942	1.2288
Q3E_16	E2	E3	E1	0.8843	0.5118	1.3962
Q3E_25	E3	E1	E2	0.5776	0.8524	1.4301
Q3E_28	E3	E2	E1	0.7471	0.7869	1.5340
Q3E_18	E2	E3	E5	0.8532	0.4341	1.2874
Q3E_23	E2	E5	E3	0.7907	0.3559	1.1466
Q3E_30	E3	E2	E5	0.6129	-0.7080	-0.0951
Q3E_35	E3	E5	E2	0.5887	0.7126	1.3013
Q3E_53	E5	E2	E3	0.6717	0.5926	1.2643
Q3E_56	E5	E3	E2	0.8128	0.6753	1.4882
Q3E_3	E1	E2	E5	0.5894	0.7137	1.3031
Q3E_10	E1	E5	E2	0.6020	0.7183	1.3202
Q3E_15	E2	E1	E5	0.6621	0.3278	0.9899
Q3E_22	E2	E5	E1	0.6539	0.2672	0.9211
Q3E_49	E5	E1	E2	0.5972	0.5690	1.1662
Q3E_52	E5	E1	E2	0.5625	0.5038	1.0663

Tabla 8. Datos de solubilidad normalizados de las quimeras de 4 epítomos

Quimera	Epítomos				Aggrescan 3D	CamSol	Total
	L2	L4	L6	L6			
Chagasina					1.0000	1.0000	2.0000
Q4E_2	E1	E2	E3	E5	0.6938	0.9253	1.6191
Q4E_5	E1	E2	E5	E3	0.7600	0.9927	1.7526
Q4E_8	E1	E3	E2	E5	0.8234	1.0468	1.8702
Q4E_11	E1	E3	E5	E2	0.6861	1.0827	1.7688
Q4E_19	E1	E5	E2	E3	0.8290	0.9877	1.8167
Q4E_21	E1	E5	E3	E2	0.8188	0.9148	1.7336
Q4E_26	E2	E1	E3	E5	0.8528	0.5512	1.4040
Q4E_29	E2	E1	E5	E3	0.7615	0.6397	1.4012
Q4E_32	E2	E3	E1	E5	0.8853	0.5891	1.4744
Q4E_35	E2	E3	E5	E1	1.0121	0.6553	1.6674
Q4E_43	E2	E5	E1	E3	0.6892	0.5151	1.2043
Q4E_45	E2	E5	E3	E1	0.7946	0.4877	1.2822
Q4E_50	E3	E1	E2	E5	0.5819	0.8985	1.4803
Q4E_53	E3	E1	E5	E2	0.6240	0.9774	1.6014
Q4E_56	E3	E2	E1	E5	0.5878	0.8633	1.4511
Q4E_59	E3	E2	E5	E1	0.6592	0.9032	1.5625
Q4E_67	E3	E5	E1	E2	0.6999	0.8528	1.5527
Q4E_69	E3	E5	E2	E1	0.6342	0.9526	1.5867
Q4E_97	E5	E1	E2	E3	0.8489	0.8432	1.6921
Q4E_99	E5	E1	E3	E2	0.8637	0.7797	1.6434
Q4E_103	E5	E2	E1	E3	0.4824	0.7539	1.2364
Q4E_105	E5	E2	E3	E1	0.7412	0.7266	1.4678
Q4E_109	E5	E3	E1	E2	1.0324	0.8175	1.8500
Q4E_111	E5	E3	E2	E1	0.8606	0.8481	1.7087

Ahora bien, dos criterios importantes de selección, además de la solubilidad, se aplicarán posteriormente para discernir más entre los datos: la presencia de E5 en L4 y de E3 en L2. El primer criterio está basado en estudios anteriores donde experimentalmente se observó que la posición de E5 en L4 favorece la solubilidad de la proteína (Cárdenas-Guerra *et al.*, 2024).

El segundo criterio se basó en el análisis de similitud entre los 5 epítomos con respecto a L2. La Figura 11 muestra el alineamiento múltiple de secuencias realizado entre los epítomos y el giro L2 mediante MUSCLE, un algoritmo que permite analizar la identificación de residuos críticos en una secuencia (Edgar, 2004)

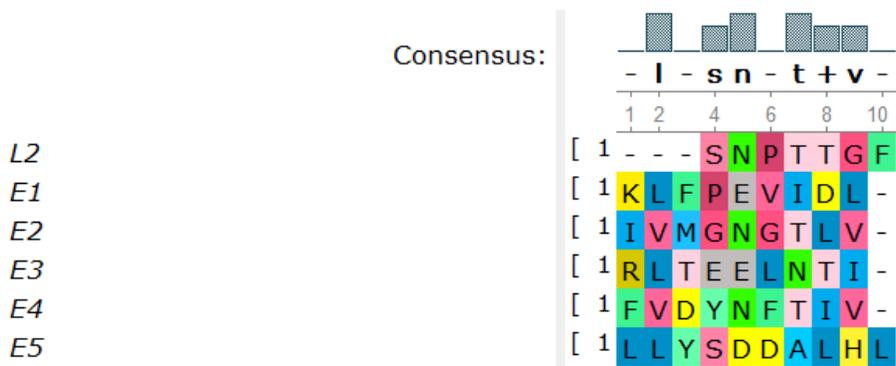


Figura 11 Alineamiento realizado con MUSCLE de los 5 epítomos de TSA-1 con respecto a L2.

Asimismo, Stephenson & Freeland plantean un diagrama de Venn donde agrupan a los aminoácidos con respecto a su carga, polaridad y tamaño (Figura 8B). A su vez, presentan un árbol filogenético donde, los aminoácidos más fisicoquímicamente parecidos entre sí se encuentran compartiendo ramificaciones más cercanas y comparten entre sí un menor número de nodos ya que son filogenéticamente más cercanos (por ejemplo, el Ácido Áspartico (D) con el Ácido Glutámico (E) (Figura 8C). Por otra parte, la matriz consenso mostrada en la Figura 7 permitió realizar un análisis más acertado, brindando valores numéricos a las relaciones entre aminoácidos, siendo los aminoácidos más similares aquéllos donde la intersección entre éstos se muestre en color verde y con un valor cercano a 0, mientras que las intersecciones de color rojo con valores cercanos a 1 representan relaciones entre aminoácidos muy distintos. A partir de esto y con un análisis de aminoácido por aminoácido alineado en la Figura 11 se tomó en cuenta lo siguiente: N, E, D, S, E y Y son a.a hidrofílicos; P, V, G y L son a.a hidrofóbicos, T y N poseen mayor relación de similitud mediante el árbol filogenético y G, L, V e I son a.a hidrofóbicos, por lo que inicialmente se consideraron a los epítomos E3 y E4 posibles candidatos para la sustitución en L2, sin embargo, recordando lo anteriormente mencionado con respecto a la alta hidrofobicidad del E4, se consideró que E3 era el candidato elegido para sustituir en L2. Estudios anteriores también sugieren la sustitución de E3 en L2 con un efecto potencialmente favorable en la proteína (Cárdenas-Guerra *et al.*, 2024).

Tomando en cuenta lo anterior y al normalizar los datos de solubilidad obtenidos tanto con Agresscan 3D 2.0 como con CamSol Structured Corrected (Tablas 7 y 8), estos se

ordenaron del mayor al menor para poder compararlos y así elegir a las 10 quimeras más solubles de 3 y 4 epítotos (Figuras 12 y 13).

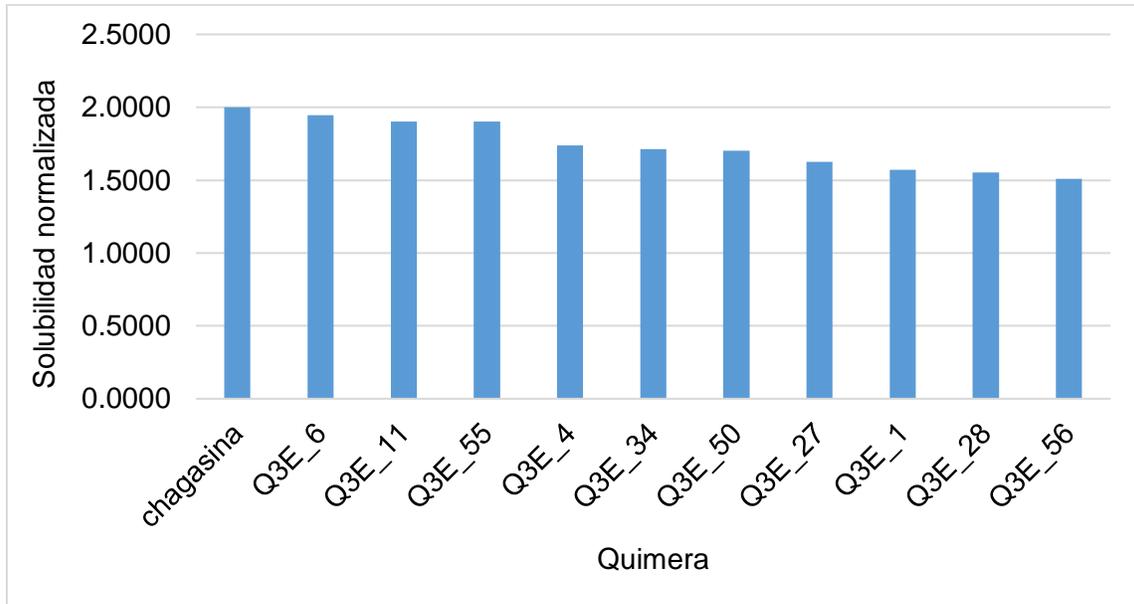


Figura 12. Top 10 de quimeras de 3 epítotos con mayor solubilidad

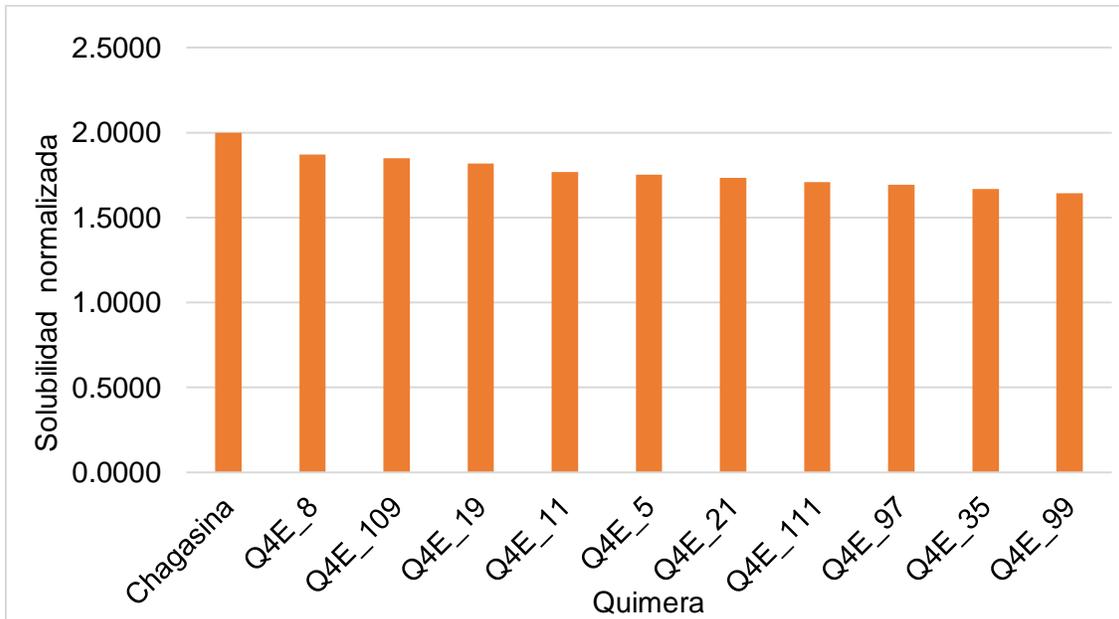


Figura 13. Top 10 de quimeras de 4 epítotos con mayor solubilidad

Al tener estos datos de la primera selección de las proteínas quiméricas, era necesario llevar a cabo la expresión de las mutantes de chagasina para aplicar éstas mutaciones *in silico* a por lo menos 5 proteínas quiméricas de 3 epítomos y 5 proteínas quiméricas de 4 epítomos más solubles y así elegir únicamente a 4 proteínas quiméricas para expresarse en *P. pastoris*.

3.- Subclonación, expresión en *E. coli* y purificación de las mutantes de chagasina

Con la finalidad de corroborar experimentalmente el aumento en la solubilidad *in silico* de las mutantes de chagasina (Tabla 6, Figura 9) y así aplicar las mutaciones a las proteínas quiméricas, se solicitó a Syn Biotechnologies 4 construcciones para llevar a cabo la subclonación en el plásmido pCri8a: puC57-Chag RR, puC57-Chag RK, puC57-Chag KK y puC57-Chag KR. Posterior a la ligación de los insertos con el plásmido pCri8a, 2 colonias de cada mutante se analizaron por PCR de colonia utilizando los oligos correspondientes al promotor y terminador del fago T7 (Apéndices. Figura 40) donde se observa en la Figura 14 la presencia del amplicón esperado con un tamaño de 593 pb.

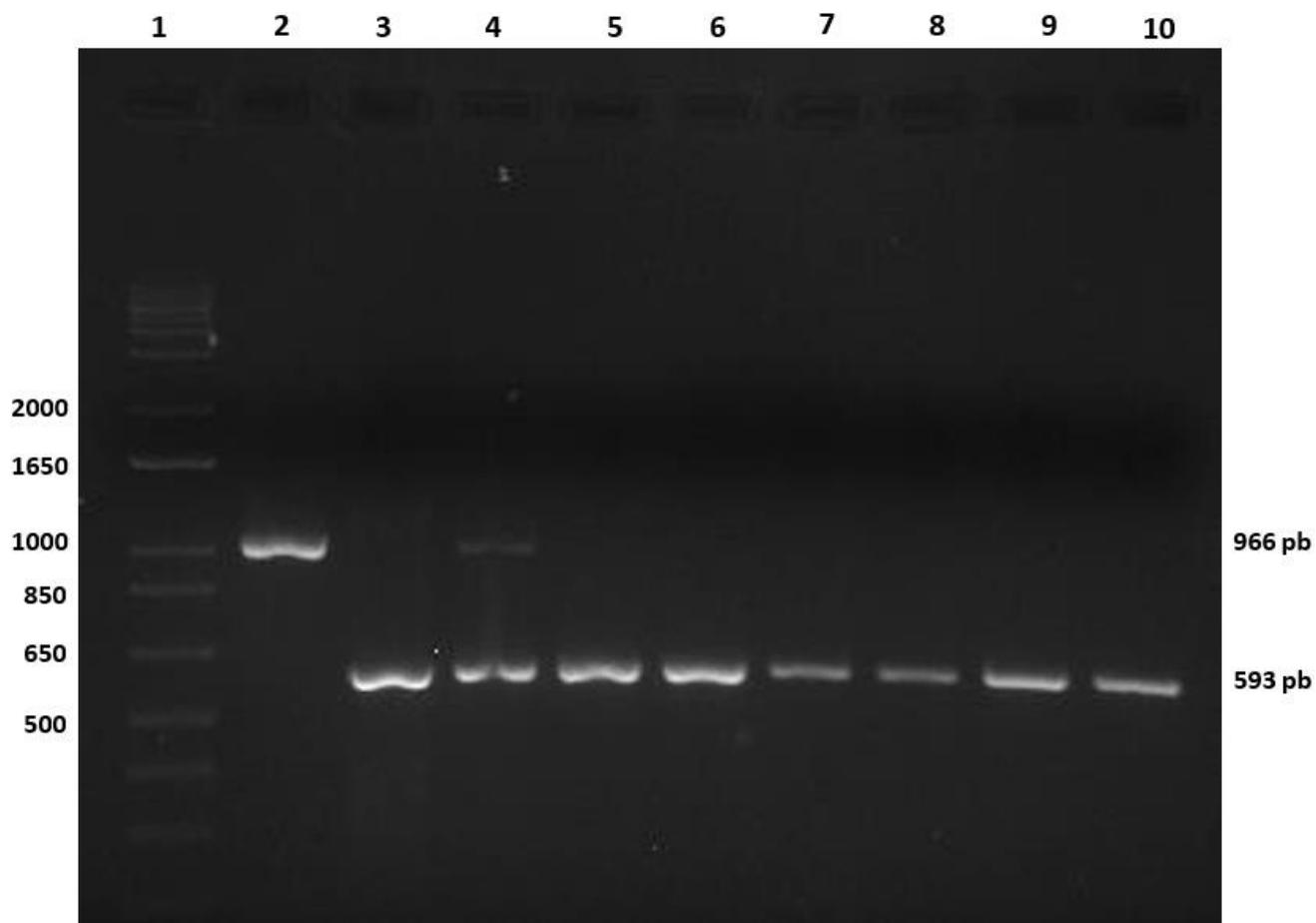


Figura 14. PCR de colonia de las mutantes de chagasina en *E. coli* DH5a.
Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador de PM, Carril 2: Control + (pCri8a-GFP), Carril 3: Clona 1 pCri8a-Chag KK, Carril 4: Clona 2 pCri8a-Chag KK; Carril 5: Clona 1 pCri8a-Chag RK, Carril 6: Clona 2 pCri8a-Chag RK, Carril 7: Clona 1 pCri8a-Chag RR, Carril 8: Clona 2 pCri8a-Chag RR, Carril 9: Clona 1 pCri8a-Chag KR, Carril 10: Clona 2 pCri8a-Chag KR

Una vez verificadas las clonas positivas se analizó la expresión de las mutantes en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. Tal como se muestra en las Figura 15 A y B, las 4 mutantes de chagasina se expresaron de forma soluble en *E. coli* BL21 (DE3) observándose la inducción en la expresión de una banda de aproximadamente 14.2 kDa, datos que se esperaban obtener gracias al análisis *in silico* realizado, sin embargo, mediante este análisis SDS-PAGE no fue posible identificar a primera instancia el aumento en la expresión soluble de cada una de las mutantes con respecto a la Chag WT, por lo que se analizaron por densitometría únicamente las fracciones solubles de cada mutante y de la variante WT.

Se observa en la Figura 16 que las mutantes de Chag KK, Chag RR y Chag RK poseen una intensidad de bandeado superior a la de la Chagasina WT, información que se corrobora con los datos mostrados en la Tabla 9 , siendo la mutante Chag KK aquella que posee mayor intensidad relativa, posteriormente la mutante Chag RR, quedando la Chag WT en cuarto lugar con respecto a su expresión soluble, por lo que puede concluirse que hay mutantes de chagasina que si presentaron mayor expresión soluble, sin embargo, este aumento no puede describirse como significativo ya que la mutante más soluble es únicamente 11% más soluble que la Chag WT de forma experimental, y no 80% más soluble como se planteaba en el análisis *in silico*. Otro dato que nos ayuda a corroborar este aumento en la solubilidad es el p.I de las mutantes obtenidas: se ha demostrado experimentalmente que usando síntesis de proteínas libres de células, la solubilidad de las proteínas se relaciona favorablemente con el contenido de aminoácidos positivos que contienen (Kurotani *et al.*, 2010), siendo las mutantes de chagasina proteínas que tienen sustituciones aminoacídicas de V y F por aminoácidos cargados como K y R, por lo que los p.I de las mutantes aumentan hasta 8.5. A su vez, algunas proteínas con p.I entre 7.0 y 7.5 presentan menor rendimiento en expresión soluble (Tokmakov *et al.*, 2021).

Por otra parte, dado que la densitometría es un análisis cualitativo, es necesario realizar un análisis cuantitativo para poder constatar los datos obtenidos; esto se puede lograr mediante el cálculo de rendimientos con respecto a la cantidad de biomasa obtenida posterior a la inducción.

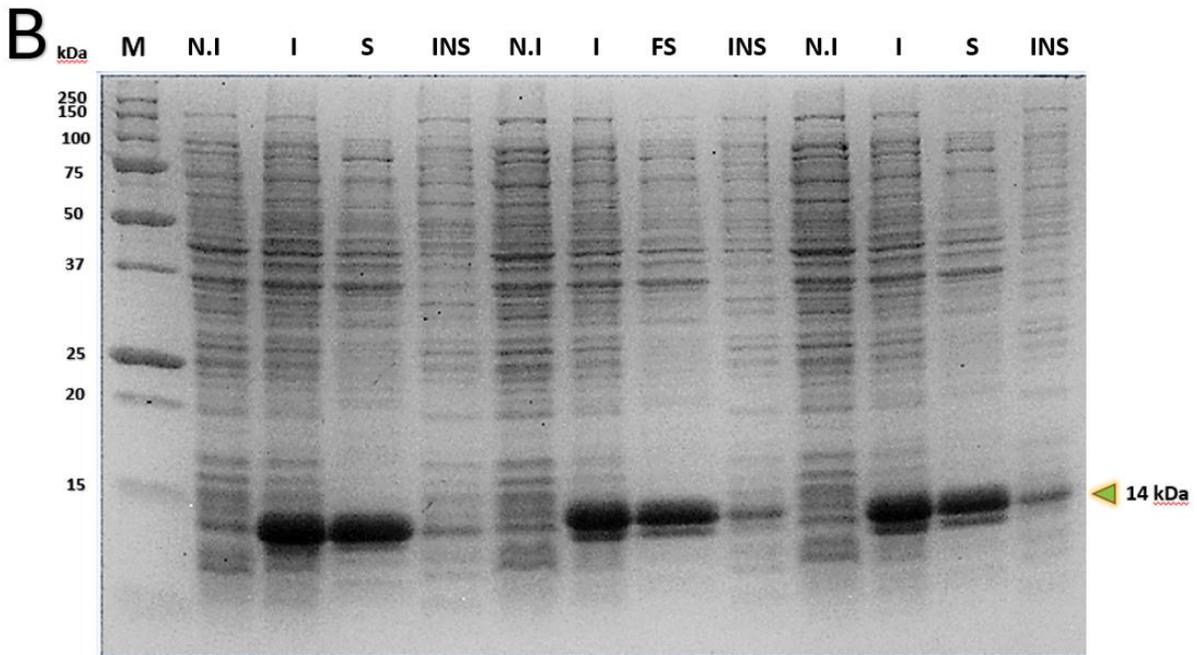
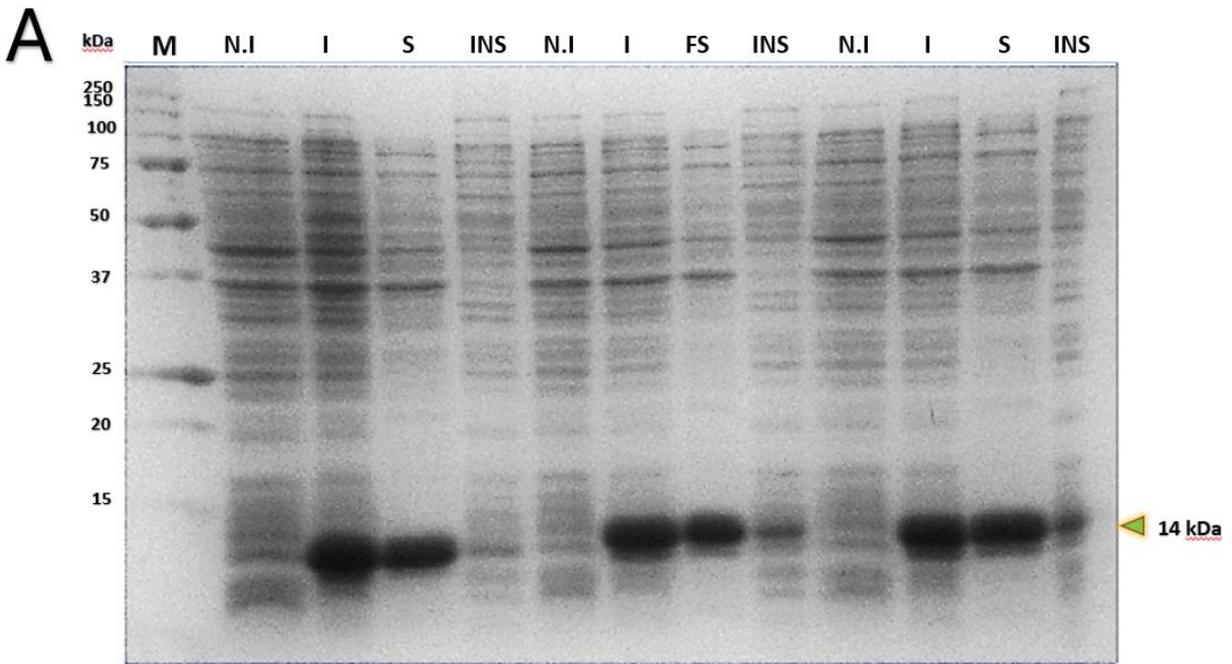


Figura 15. Expresión de las mutantes de chagasina. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida. **A)** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2-5:Chag WT, Carril 6-9:Chag-KK, Carril 10-13:Chag-RK
B) Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2-5:Chag WT, Carril 6-9:Chag-RR, Carril 10-13:Chag-KR

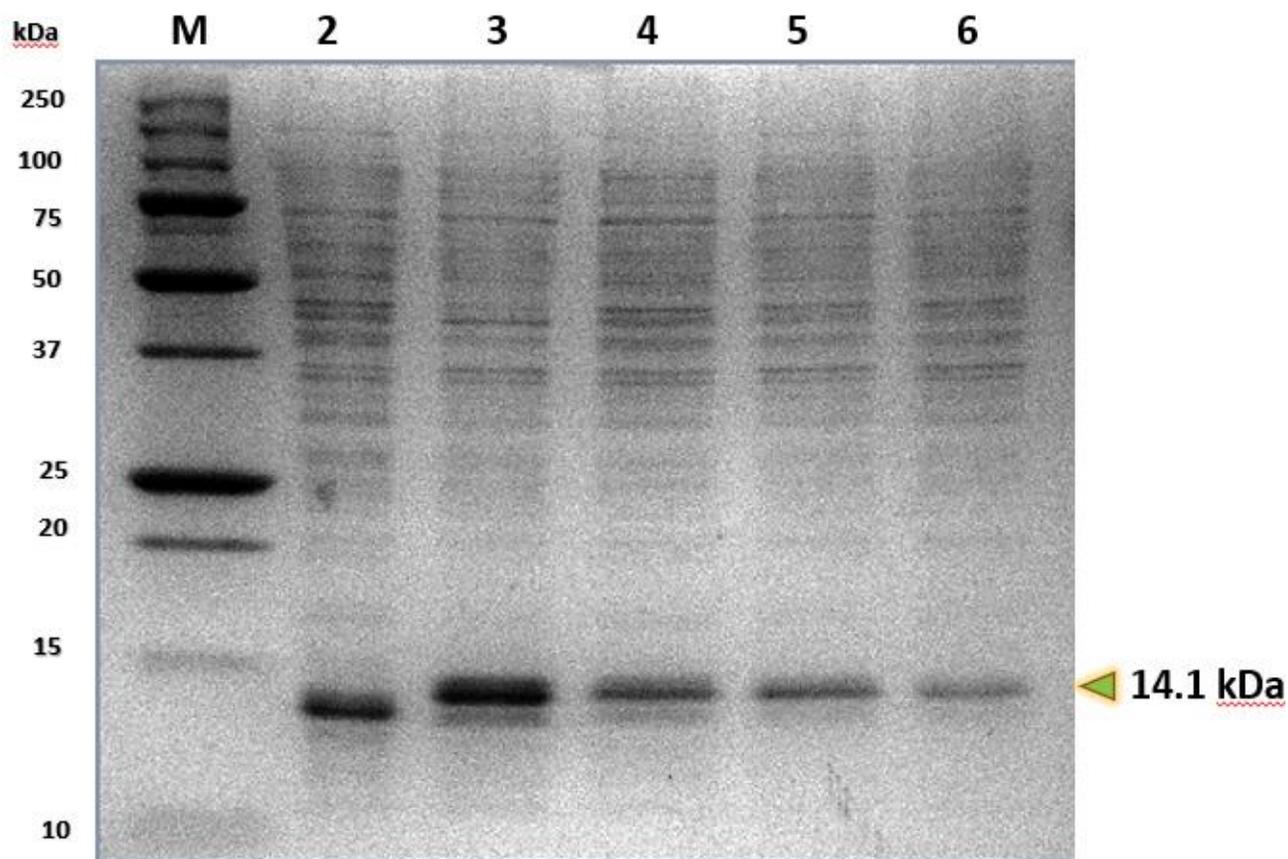


Figura 16. Análisis de densitometría de las mutantes de chagasina. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Chag WT, Carril 3: Chag KK, Carril 4: Chag RR Carril 5: Chag RK Carril 6: Chag KR. Cada carril contiene 4 μ g de proteína.

Tabla 9. Porcentaje de bandeo y porcentaje de intensidad relativa de las mutantes, obtenidos mediante densitometría

Mutante	% Bando	% Intensidad relativa
Chag WT	6.6	100.0
Chag KK	7.4	111.8
Chag RK	6.9	104.5
Chag RR	7.2	107.0
Chag KR	5.0	74.4

Tras analizar la verificación del aumento en la expresión soluble de las mutantes de chagasina, se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel. Tal como se observa en la Figura 45 mostrada en los Apéndices, las 3 proteínas purificadas presentan un perfil cromatográfico similar, sin embargo, se presentaron algunas variaciones en la concentración de imidazol a la cual eluyeron las mismas, donde la Chag KR eluyó a 131.3 mM de imidazol, la Chag RK a 123.5 mM de imidazol y Chag KK a 115 mM de imidazol. Estas ligeras variaciones pueden deberse a las interacciones internas existentes entre los aminoácidos sustituidos. El pH utilizado tanto en el Buffer de lisis, como en el buffer A y B fue inicialmente de 9.3 debido a que los puntos isoeléctricos de las proteínas quiméricas se encuentran en 8.5; se sabe que las proteínas muestran menor solubilidad en soluciones que poseen un pH equivalente a su pI, motivo por el cual suelen agregarse (Tokmakov *et al.*, 2021) es por eso por lo que el pH del buffer a seleccionar para la conservación de la proteína debe encontrarse ya sea una unidad arriba o debajo de su pI.

4.-Estabilidad térmica de las mutantes de chagasina

Con las mutantes de chagasina ya purificadas se llevaron a cabo los correspondientes ensayos de termoestabilidad (thermal shift) a diferentes pH y se calcularon las Tm's de cada una de las mutantes y de la Chag WT. Los resultados presentados en la Tabla 10 muestran que ninguna Tm (Temperatura de derretimiento) correspondiente a las mutantes de chagasina es superior a la Chag WT, por lo que son menos termo estables que la proteína silvestre. Recordando que la Tm es la temperatura a la cual existe un 50% de desnaturalización de la proteína, al ser ésta temperatura superior indica que la proteína se desnaturalizó parcialmente a una temperatura mayor, por lo cual es más termo estable (Bruce *et al.*, 2019). Es por esto que, a pesar de que las mutantes son de 4 a 11% más solubles que la Chag WT, no son más termo estables.

Sin embargo, en las Figuras 17, 18, 19, 20 y 21 es posible observar un aumento en la emisión de la fluorescencia de las mutantes con respecto a la Chag WT en los ensayos a pH 9.3, 8.5, 7.5 y 6. Los cambios estructurales de una proteína mediante un ensayo de thermal shift pueden explicarse a través de cambios en la energía libre de Gibbs de la

misma, la cual se basa en componentes entálpicos como puentes de hidrogeno, puentes salinos, etc, y en componentes entrópicos como la rotación de las cadenas, flexibilidad de los giros, etc. (Redhead *et al.*, 2017). Una baja fluorescencia a temperatura ambiente indica que la proteína se encuentra bien plegada, por lo tanto, no existe fuerza impulsora que genere un cambio en la energía libre de Gibbs, ya sea en la entalpía o entropía del sistema (Huynh & Partch, 2015). Sin embargo, al existir un gradiente de temperatura, ésta fuerza impulsora ocasiona cambios en la energía libre de Gibbs. Dicho esto, puede relacionarse la fluorescencia emitida con la energía libre de Gibbs, de tal forma que al aumentar la fluorescencia existe un aumento de la delta G obtenida a partir del estado inicial (conformación nativa) y final (proteína desnaturalizada). Se puede intuir que el aumento de la fluorescencia de las mutantes con respecto a la Chag WT se debe a que éstas mutantes requieren mayor energía para transicionar de su estado nativo a su estado desnaturalizado.

Cuando el ensayo de termal shift se realizó a pH 4.5, puede observarse en la Figura 21 que, al iniciar el experimento, todas las proteínas mostraron una emisión de fluorescencia inicial superior a las emisiones obtenidas a los demás pH. Ya que la fluorescencia está relacionada con la interacción entre el colorante SyproOrange y los residuos hidrofóbicos de la proteína al exterior tras su desnaturalización (Elgert *et al.*, 2019), es posible que las proteínas ya se encontrarán desnaturalizadas antes de iniciar el ensayo, por lo que los datos obtenidos de Tm's a pH 4.5 mostrados en la Tabla 10 no serán considerados, asimismo, la Figura 21 no muestra un aumento de la fluorescencia de forma sigmoideal.

Tabla 10 Tm de las mutantes de chagasina a diferentes pH

Mutante	pH 9.3	pH 8.5	pH 7.5	pH 6.0	pH 4.5
Chag WT	68.9	66.75	63.9	61.06	67.09
Chag KK	63.5	58.95	57.04	52.02	52.29
Chag RK	63.3	58.84	58.58	53.33	64.06
Chag KR	63.8	59.16	58.1	56.30	56.99
Chag RR	-	-	-	-	-

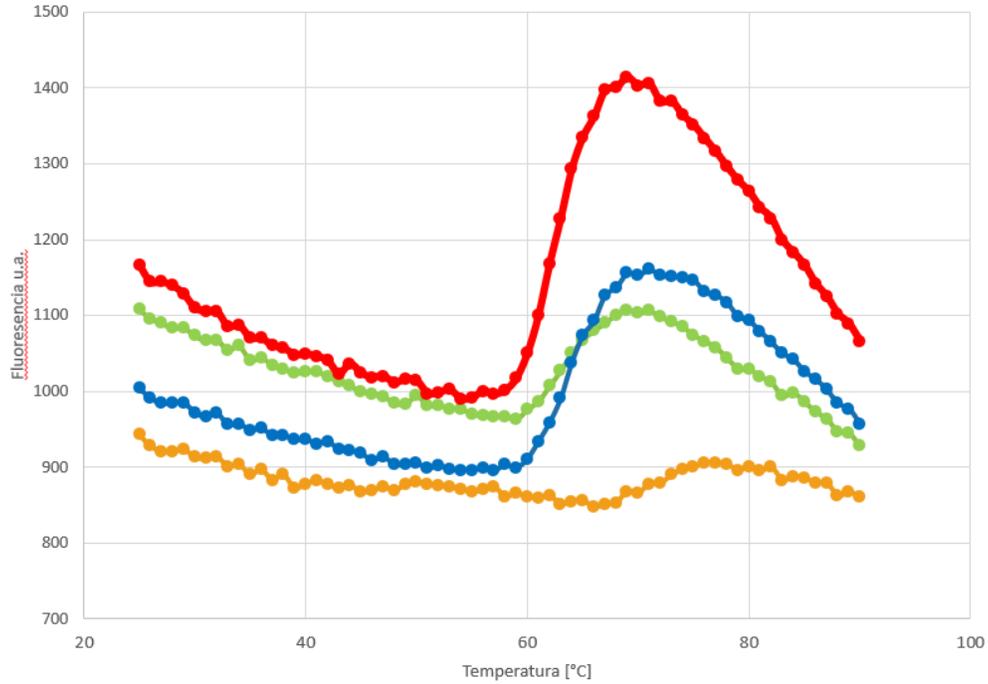


Figura 17 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 9.3. Naranja: Chagasina WT., Rojo: Chag RK, Verde: Chag KK, Azul: Chag KR

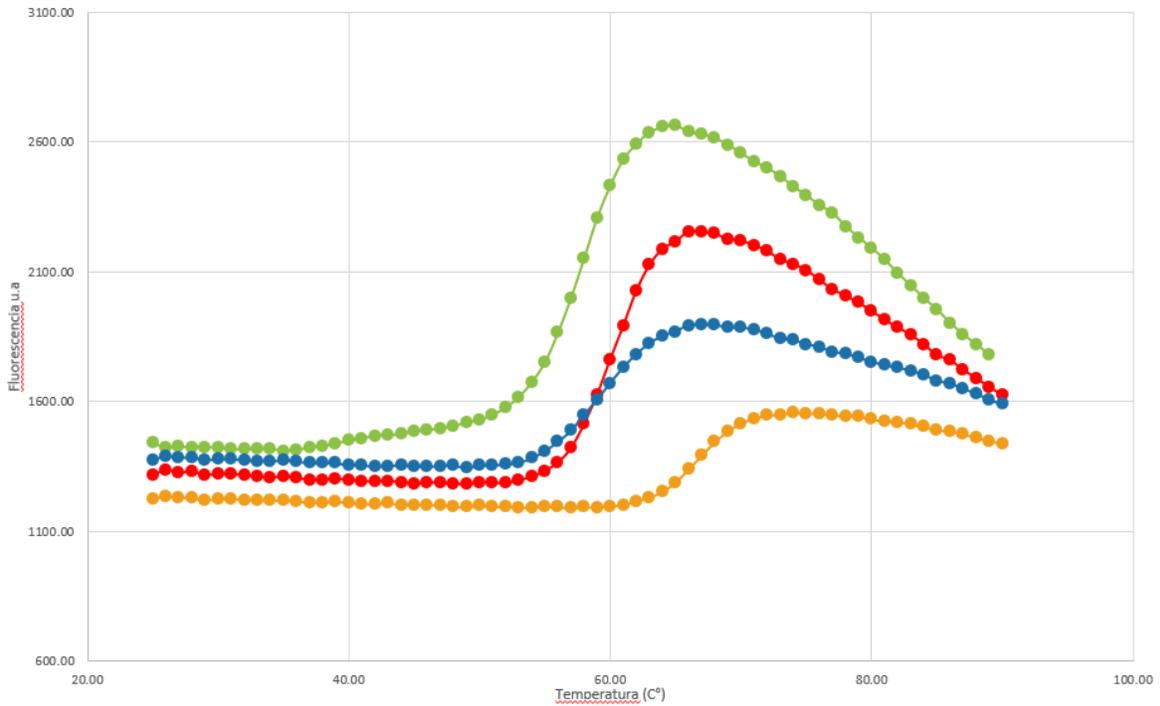


Figura 18 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 8.5. Naranja: Chagasina WT, Rojo: Chag RK, Verde: Chag KK, Azul: Chag KR

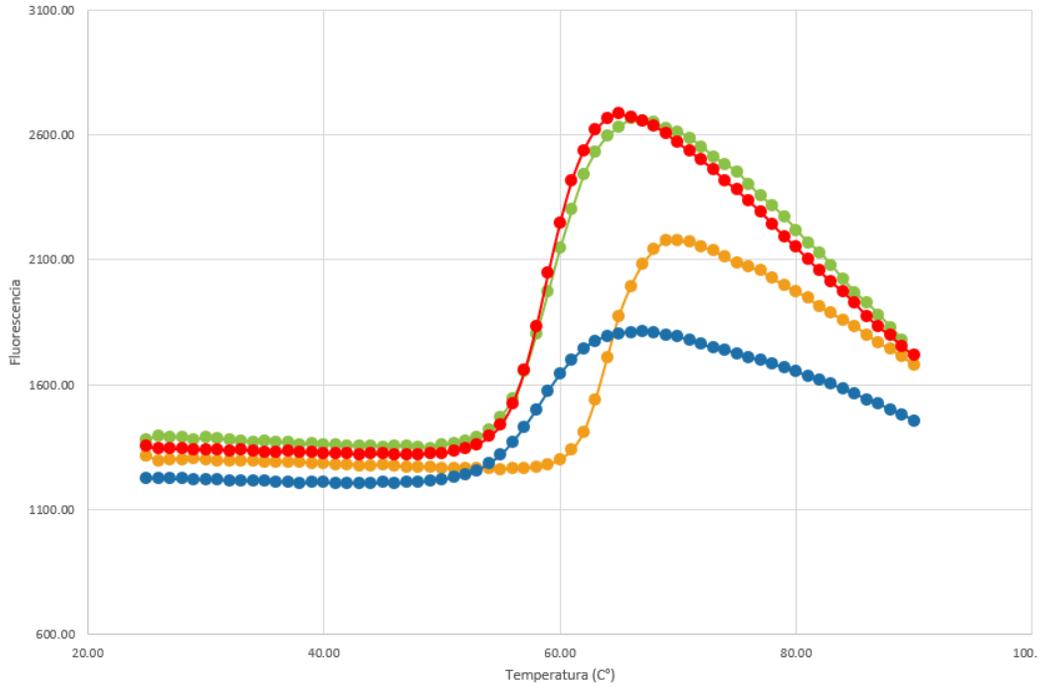


Figura 19 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 7.5. Naranja: Chagasina WT., Rojo: Chag RK, Verde: Chag KK, Azul: Chag KR

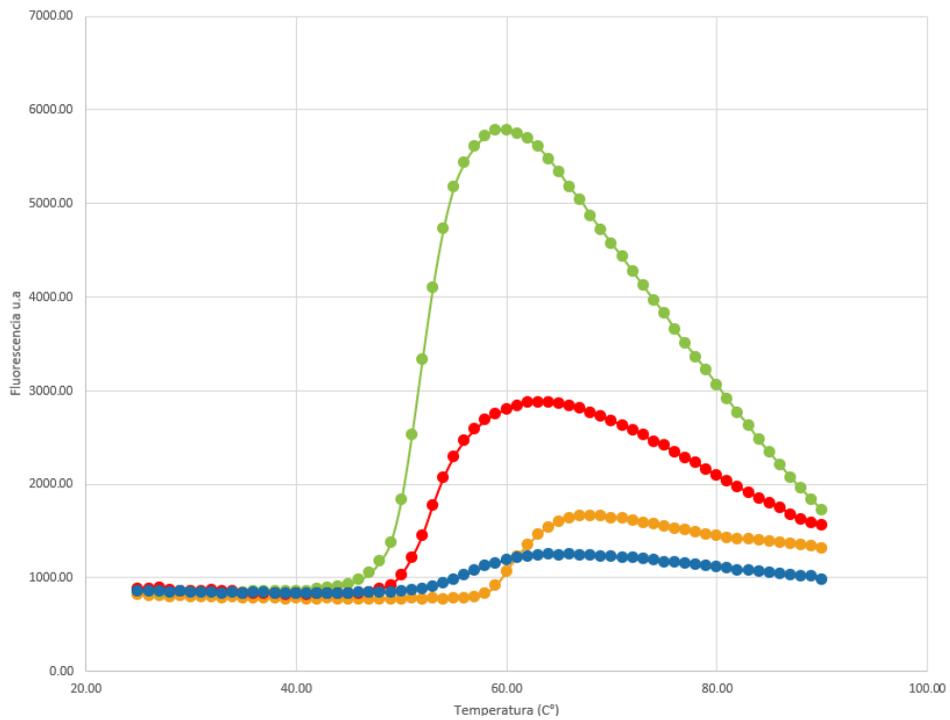


Figura 20 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 6.0. Naranja: Chagasina WT., Rojo: Chag RK, Verde: Chag KK, Azul: Chag KR

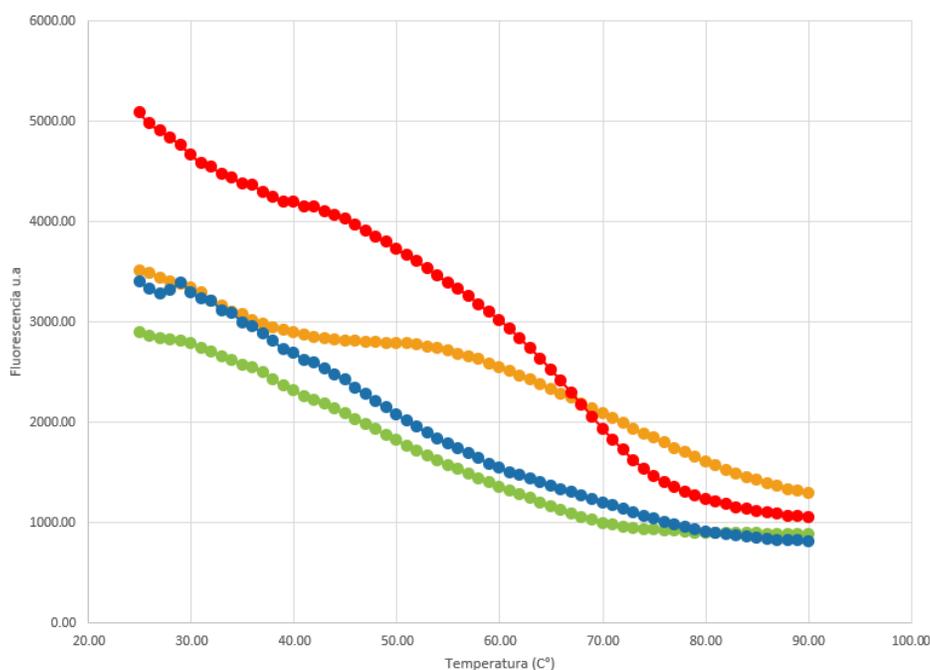


Figura 21 Termo estabilidad de las mutantes de chagasina a pH 4.5. Naranja: Chagasina WT., Rojo: Chag RK, Verde: Chag KK, Azul: Chag KR

4.-Selección de las proteínas quiméricas de chagasina a expresar.

Al observar el incremento en la solubilidad de las mutantes de chagasina de forma experimental, éstas sustituciones se aplicaron en las 4 quimeras más solubles de 3 y 4 epítomos (Tabla 11 y 12). Uno de los parámetros importantes a considerar en la selección final de las quimeras, además de la solubilidad alta al realizar las mutaciones, fue el valor pLDDT (Predicted local distance difference) de los modelos tridimensionales predichos por AlphaFold. Este valor estima la exactitud de la predicción realizada con respecto a una estructura experimental documentada, basada en la prueba de distancias locales. Se considera que la predicción es altamente confiable cuando el valor de pLDDT es mayor a 90, mientras que valores >70 indican una predicción buena, y valores inferiores a 50 indican baja confiabilidad (Tunyasuvunakoo *et al.*, 2021). Dicho esto, tras verificar los valores de pLDDT de las estructuras de las quimeras mutadas tal como se observa en las Tablas 11 y 12, se procedió a elegir aquéllas quimeras que contaban con una alta solubilidad normalizada con respecto a la Chag WT, así como un valor elevado de pLDDT.

Finalmente se seleccionaron 2 quimeras de 3 epítomos: Q3E_6 VK18-FR58 (Q6), Q3E_34 VR18-FK58 (Q34) (Figura 22 A y B) y 2 quimeras de 4 epítomos: Q4E_19 VR18-

FR58 (Q19), Q4E_109 VK18-FK58 (Q109) (Figura 22 C y D). Para fines prácticos la nomenclatura de las quimeras seleccionadas se abrevió tal como se muestra en la Tabla 13, por lo que en el resto del trabajo se hará referencia a éstas de esa forma.

Tabla 11. Solubilidad de quimeras mutadas con 3 epítomos. Quimeras seleccionadas se encuentran marcadas en rojo.

Quimera	Mutación	CamSol	Agresscan 3D	Normalización	pLDDT
Q3E_6	WT	0.611875	-75.67	1.9231	73.6
	VR18-FR58	0.9179	-94.96	2.7169	30.2
	VK18-FK58	0.903	-111.66	2.8702	35.4
	VK18-FR58	0.912	-93.04	2.6852	83.9
	VR18-FK58	0.9085	-110.59	2.8687	36.8
Q3E_11	WT	0.5694	-78.88	1.8787	83.1
	VR18-FR58	0.9174	-105.8804	2.8341	33.5
	VK18-FK58	0.907	-89.4666	2.6373	51
	VK18-FR58	0.9119	-93.064	2.6853	50.9
	VR18-FK58	0.9125	-102.9414	2.7933	30.8
Q3E_55	WT	0.4978	-90.99	1.8745	82.2
	VR18-FR58	0.8034	-98.2753	2.5420	78.3
	VK18-FK58	0.7889	-101.342	2.5485	77.8
	VK18-FR58	0.7989	-94.5391	2.4933	80.4
	VR18-FK58	0.7944	-102.6859	2.5732	81.5
Q3E_34	WT	0.5181	-70.22	1.6931	82.5
	VR18-FR58	0.8661	-89.0594	2.5577	78.1
	VK18-FK58	0.8557	-91.1531	2.5612	81.9
	VK18-FR58	0.8606	-89.6425	2.5539	78.6
	VR18-FK58	0.8612	-85.7115	2.5124	79.9

Tabla 12. Solubilidad de quimeras mutadas con 4 epítomos. Quimeras seleccionadas se encuentran marcadas en rojo.

Quimera	Mutación	Agresscan3D	Camsol	Normalización	pLDDT
Q4E_8	WT	-77.7309	0.5688	1.8702	64.4
	VR18-FR58	-101.7435	0.8582	2.6805	33.4
	VR18-FK58	-102.5507	0.8498	2.6736	31.0
	VK18-FR58	-89.3782	0.8530	2.5371	32.2
	VK18-FK58	-95.0398	0.8446	2.5828	35.2
Q4E_109	WT	-97.4620	0.4442	1.8500	70.1
	VR18-FR58	-105.3550	0.7336	2.4902	75.4
	VR18-FK58	-90.4916	0.7251	2.3137	60.4
	VK18-FR58	-110.5917	0.7284	2.5373	75.1
	VK18-FK58	-91.7385	0.7199	2.3177	68.6
Q4E_19	WT	-78.2568	0.5367	1.8167	78.1
	VR18-FR58	-84.3279	0.8663	2.5068	72.4
	VR18-FK58	-72.4448	0.8617	2.3698	71.9
	VK18-FR58	-75.7219	0.8611	2.4042	74.4
	VK18-FK58	-82.2270	0.8565	2.4661	68.9
Q4E_53	WT	-58.9068	0.5311	1.6014	75.6
	VR18-FR58	-117.1860	0.8219	2.7807	27.6
	VR18-FK58	-98.0212	0.8142	2.5592	47.4
	VK18-FR58	-91.9196	0.8167	2.4977	55.3
	VK18-FK58	-128.2322	0.8090	2.8765	54.6

Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas de las quimeras seleccionadas.

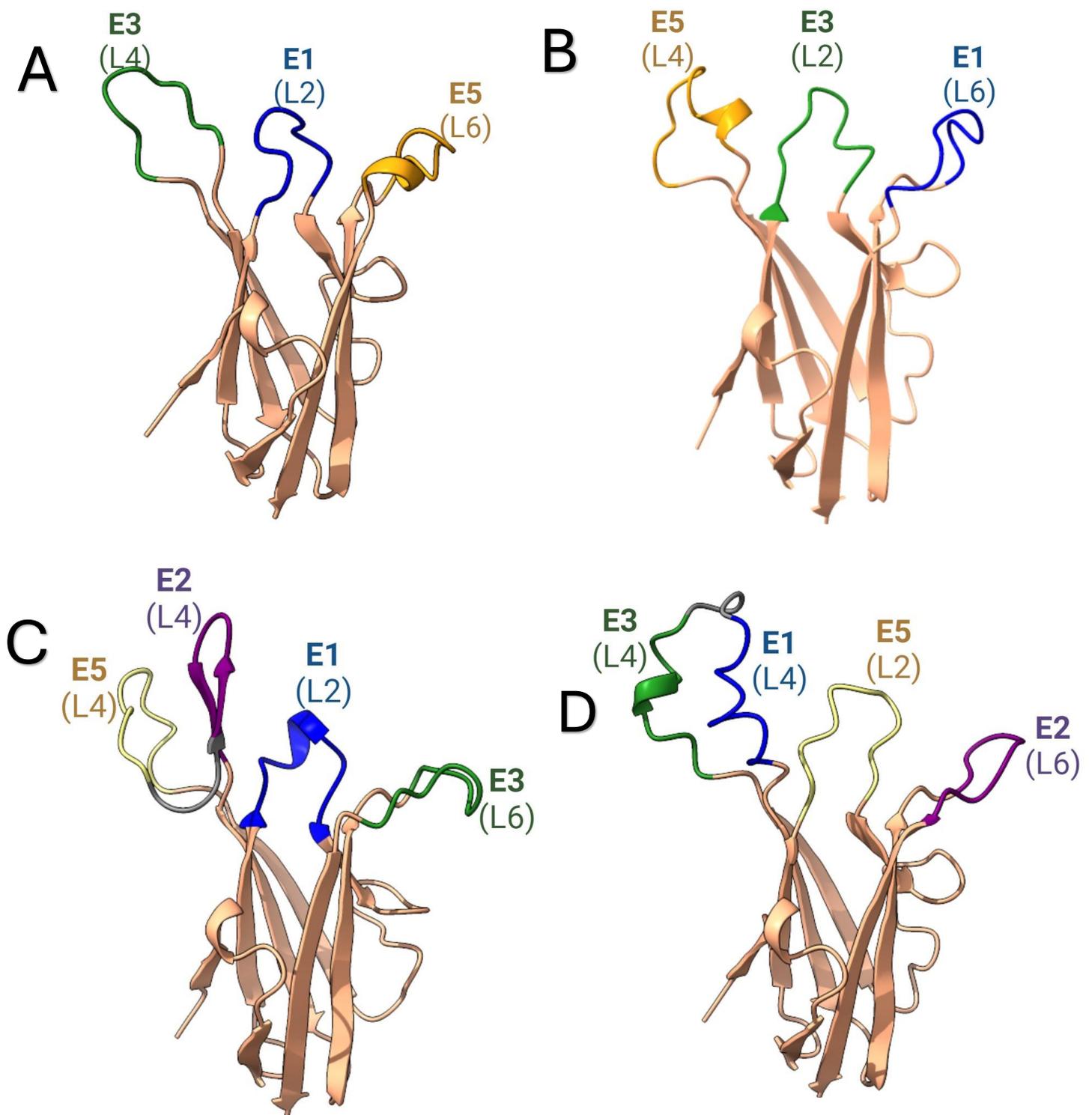
Quimera	Abreviación	p.I	Peso molecular (kDa)
Q3E_6_VK18-FR58	Q6	8.5	13.17402
Q3E_34_VR18-FK58	Q34	8.5	13.17402
Q4E_19_VR18-FR58	Q19	8.5	14.37
Q4E_109_VK18-FK58	Q109	8.5	14.319

Tabla 14. Secuencia de quimeras de 3 epítomos seleccionadas para síntesis. Secuencia de E1 se muestra en azul, E2 en morado, E3 en verde y E5 en amarillo.

Quimera	Epítomos			Longitud (pb)	Secuencia de aminoácidos
	L2	L4	L6		
Q6	E1	E3	E5	396	MSHKVTKAHNGATLTVAKGELVEIQLPKL FPEVID LAWYFEGG T KESPNE SMFTVENKYRPP R L TEELNT I G GGTEHFHVT V KAA G THAVNLT Y MRP LLYS DDALHL SERFTVY L KAN
Q34	E3	E5	E1	396	MSHKVTKAHNGATLTVARGELVEIQLP R L TEELNT I A WYFEGG T KESPNE SMFTVENKYKPP LLYS DDALHL GGTEHFHVT V KAA G THAVNLT Y MRP KL FPEVIDL SERFTVY L KAN

Tabla 15. Quimeras de 4 epítomos seleccionadas para síntesis. Secuencia de E1 se muestra en azul, E2 en morado, E3 en verde y E5 en amarillo.

Quimera	Epítomos				Secuencia de aminoácidos
	L2	L4-1	L4-2	L6	
Q19	E1	E5	E2	E3	MSHKVTKAHNGATLTVARGELVEIQLP KLFPE VID LAWYFEGG T KESPNE S MFTVENKYRPP L LYS DDALHL GS G S I VM G NGTLVGGTEHFHVT VKAAGTHAVNLT Y MRP R L TEELNT I S ERFTVY L K AN
Q109	E5	E3	E1	E2	MSHKVTKAHNGATLTVAKGELVEIQLP LLYS D DALHL LAWYFEGG T KESPNE S MFTVENKYKPP R L TEELNT I G SGS KLFPEVIDL GGTEHFHVT V K AAGTHAVNLT Y MRP I VM G NGTLV S ERFTVY L K AN



**Figura 22. Estructura 3D de las quimeras predichas con AlphaFold. A) Q6 B) Q34
C) Q19 D) Q109**

5.-Subclonación de las proteínas quiméricas de chagasina en pCri16a

Los insertos correspondientes a las quimeras Q6, Q19, Q34 y Q109, así como del plásmido digerido pCri16a se cuantificaron por espectrofotometría a 260nm (Apéndices. Tabla 16). Estos datos se emplearon para realizar la ligación de los insertos con el plásmido pCri16, donde únicamente una clona de cada construcción se sometió a extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Apéndices. Tabla 17) y a su vez, a un análisis de restricción. Cada clona seleccionada de las 4 construcciones presenta el patrón de bandeo esperado, donde existe la presencia de una banda de aproximadamente 3700 pb que corresponde al tamaño del plásmido pCri16a digerido, así como de una banda de 396 pb para las quimeras de 3 epítomos (Q6 y Q34) y de 404 pb para las quimeras de 4 epítomos (Q19 y Q109) (Figura 23), lo que indica la adecuada subclonación de las quimeras en el plásmido pCri16a.

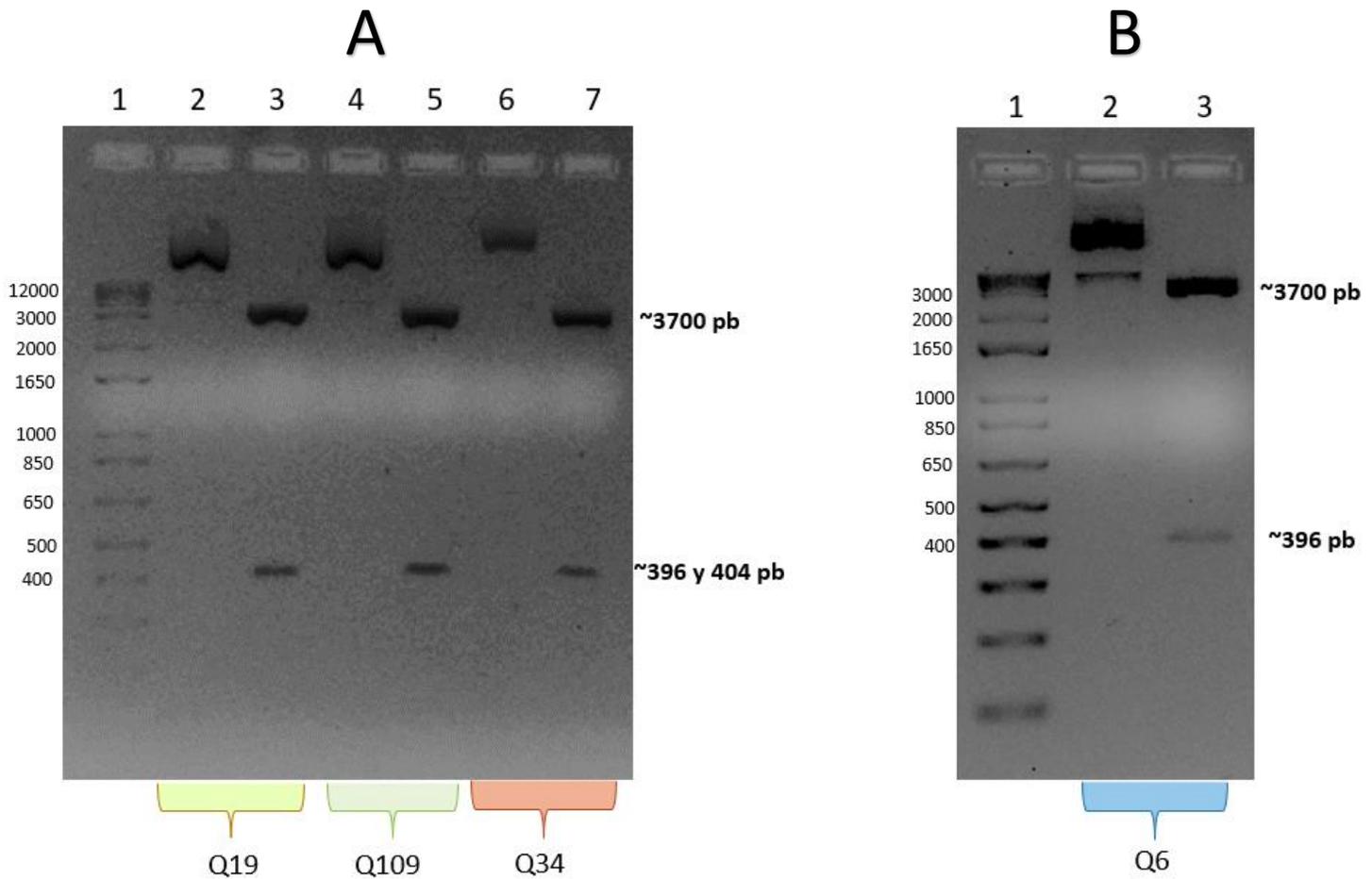


Figura 23. Verificación de clonas transformantes con las construcciones pCri16a-Q6, pCri16a-Q34, pCri16a-Q19 y pCri16-Q109 en *E. coli* DH5a. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la doble digestión con las enzimas NcoI y XhoI de 500ng de pDNA purificado de cada colonia analizada. A) Clonas Q19, Q109 y Q34 Carril 1: Marcador de PM 1kb Ladder Invitrogen, Carril 2: pCri16a-Q19 sin digerir, Carril 3: pCri16a-Q19 digerido, Carril 4: pCri16a-Q109 sin digerir; Carril 5: pCri16a-Q109 digerido, Carril 6: pCri16a-Q34 sin digerir, Carril 7: pCri16a-Q34 digerido. B) Clona Q6. Carril 1: Marcador de PM 1kb Ladder Invitrogen, Carril 2: pCri16a-Q6 sin digerir, Carril 3: pCri16a-Q6 digerido.

6.-Transformación de la levadura *P. pastoris* y verificación de clonas transformantes

Seguido de la transformación de *P. pastoris* por electroporación, 10 clonas se resembraron en medio YPDS con una concentración de 100 µg/mL de zeocina (Figura 24) para verificar la presencia del gen de resistencia al antibiótico y por lo tanto de las construcciones. La morfología colonial de la levadura presente en las placas se define como colonias rosadas/crema, circulares, suaves y de aspecto húmedo.

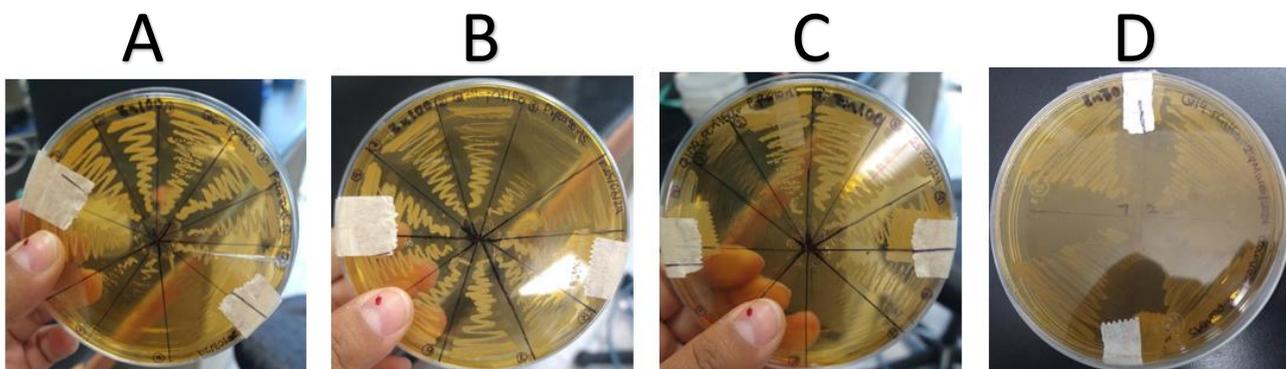


Figura 24. Crecimiento de clonas transformantes de *P. pastoris*. A) *pCri16a-Q6*. B) *pCri16a-Q34*. C) *pCri16a-Q109*. D) *pCri16a-Q19*

Para la primera PCR de colonia que se realizó, se utilizó como primer forward al oligo alpha-factor 5', y como primer reverse al oligo AOX1 3' (Apéndices. Tabla 19). El fragmento esperado de esta reacción corresponde a un amplicón de 581pb (Apéndices. Figura 42) el cual está presente en todas las clonas de cada construcción analizadas (Figura 25), por lo que podría establecerse una correcta integración del cassette de expresión. Sin embargo, para asegurar esta aseveración, se llevó a cabo una segunda PCR, donde se utilizó como primer forward al oligo AOX1 5', y como primer reverse al oligo AOX1 3' (Apéndices. Tabla 19). En esta reacción, el tamaño esperado del amplicón es de 870pb (Apéndices. Figura 41); tal como se observa en la Figura 26, nuevamente todas las clonas seleccionadas amplificaron un fragmento del tamaño esperado, excepto una clona de *pCri16a-Q109*. Una tercera reacción de amplificación realizó empleando oligos específicos que flanquean la secuencia de las quimeras (Apéndices. Tabla 19), donde se presenta una banda de 405 pb (Apéndices. Figura 43), correspondiente al tamaño de los genes que codifican para las quimeras de 4 epítomos (Figura 27).

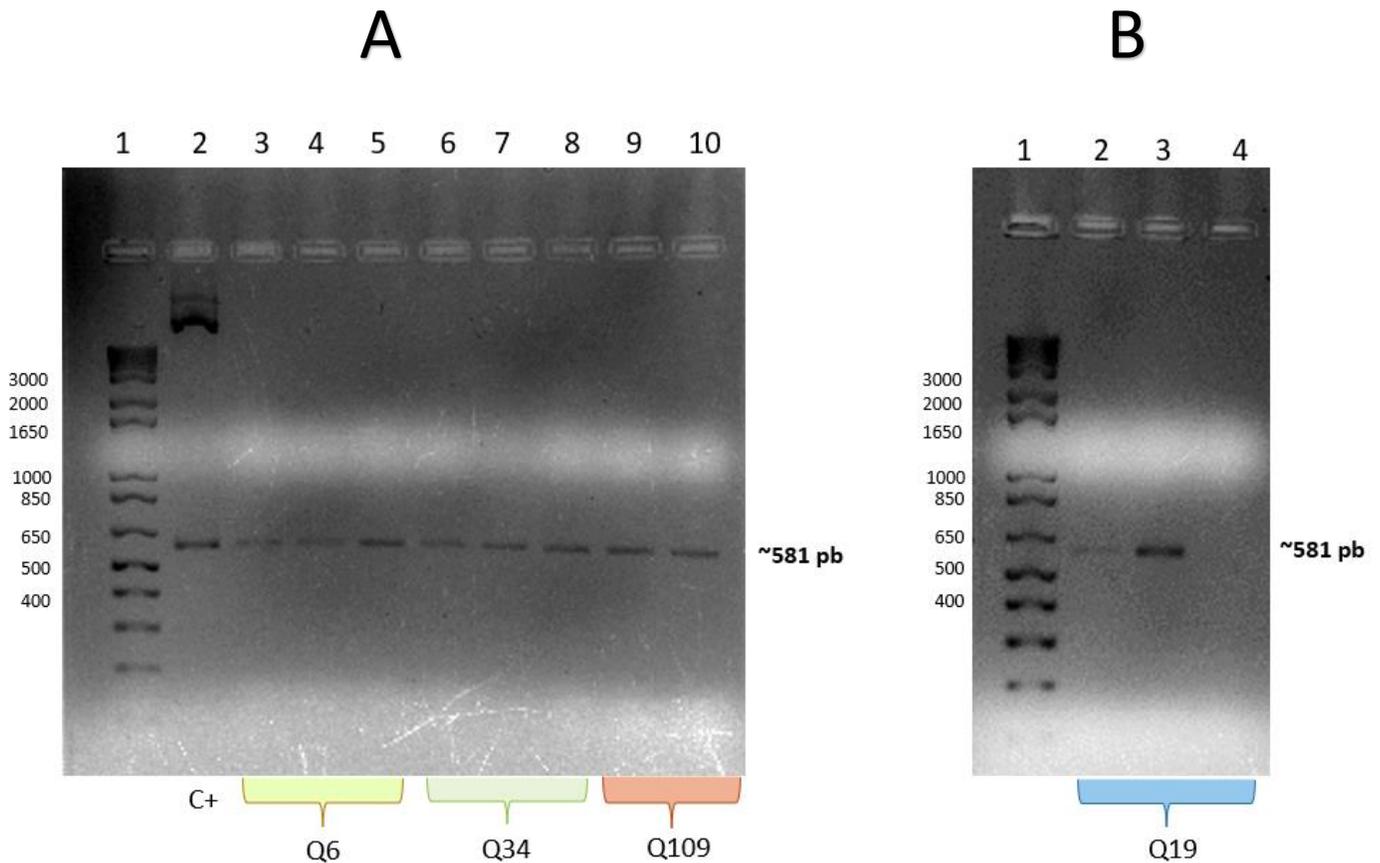


Figura 25. Verificación de clonas transformantes de *P. pastoris*, utilizando los oligos Alpha-factor 5' y AOX1 3'. Las clonas de *P. pastoris* seleccionadas se lisaron y el DNA obtenido se utilizó como templado para una reacción de PCR punto final. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **A) Clonas Q6, Q34 y Q19** Carril 1: Marcador de PM 1kb Ladder de Invitrogen, Carril 2: Control + (pCri16a-Q109 puro), Carril 3: Clona 3 pCri16a-Q6, Carril 4: Clona 5 pCri16a-Q6; Carril 5: Clona 8 pCri16a-Q6, Carril 6: Clona 3 pCri16a-Q34, Carril 7: Clona 5 pCri16a-Q34, Carril 8: Clona 8 pCri16a-Q6, Carril 9: Clona 3 pCri16a-Q109, Carril 10: Clona 3 pCri16a-Q109. **B) Clonas Q109** Carril 1: Marcador de PM 1kb Ladder de Invitrogen, Carril 2: Clona 3 pCri16a-Q19, Carril 3: Clona 5 pCri16a-Q19, Carril 4: Clona 8 pCri16a-Q19.

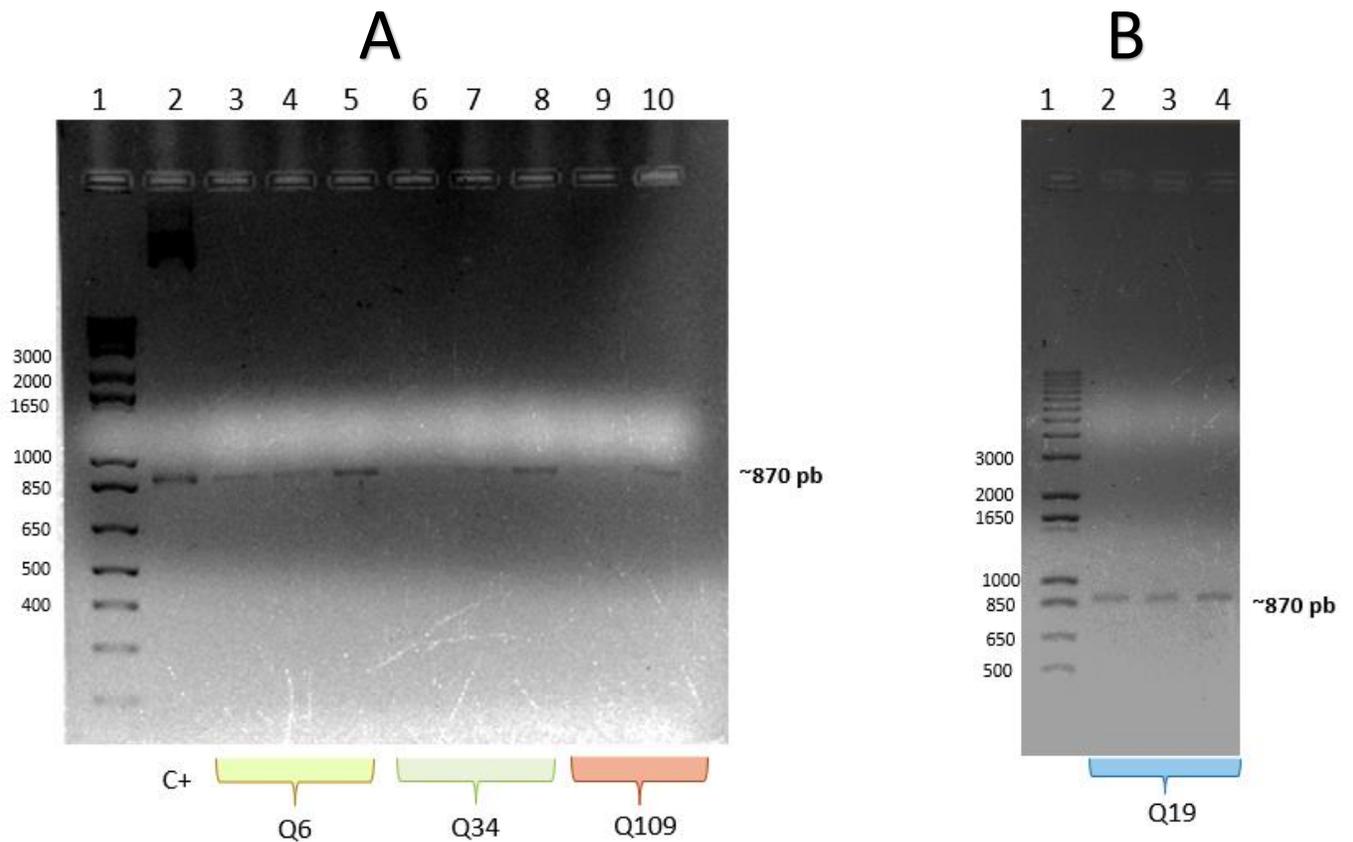


Figura 26. Verificación de clonas transformantes de *P. pastoris* utilizando los oligos AOX1 5' y AOX1 3'. Las clonas de *P. pastoris* seleccionadas se lisaron y el DNA obtenido se utilizó como templado para una reacción de PCR punto final. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **A) Clonas Q6, Q34 y Q109** Carril 1: Marcador de PM 1kb Ladder de Invitrogen, Carril 2: Control + (pCri16a-Q109 puro), Carril 3: Clona 3 pCri16a-Q6, Carril 4: Clona 5 pCri16a-Q6; Carril 5: Clona 8 pCri16a-Q6, Carril 6: Clona 3 pCri16a-Q34, Carril 7: Clona 5 pCri16a-Q34, Carril 8: Clona 8 pCri16a-Q6, Carril 9: Clona 3 pCri16a-Q109, Carril 10: Clona 3 pCri16a-Q109. **B) Clonas Q19** Carril 1: Marcador de PM 1kb Ladder de Invitrogen, Carril 2: Clona 3 pCri16a-Q19., Carril 3: Clona 5 pCri16a-Q19, Carril 4: Clona 8 pCri16a-Q19.

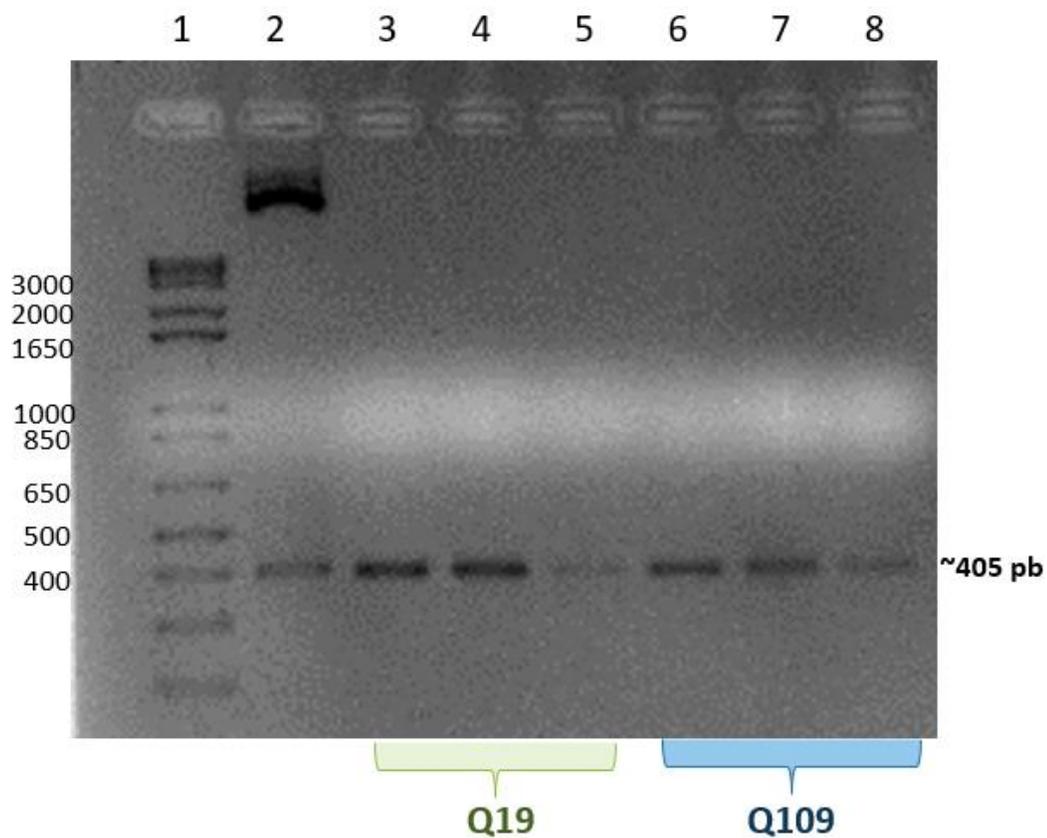


Figura 27. Verificación de clonas transformantes de *P. pastoris* utilizando los oligos de la secuencia Q109 5' y Q109 3'. Las clonas de *P. pastoris* seleccionadas se lisaron y el DNA obtenido se utilizó como templado para una reacción de PCR punto final. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Panel a) Carril 1: Marcador de PM 1kb Ladder de Invitrogen, Carril 2: Control + (pCri16a-Q109 puro), Carril 3-5: pCri16a-Q19, Carril 6-8: pCri16a-Q109.

La transformación de levaduras como *P. pastoris* es considerado como un paso crucial para la expresión de proteínas recombinantes debido a la importancia de generar células con DNA exógeno integrado al genoma. Los métodos de transformación comúnmente utilizados para levaduras son transformación por electroporación y método químico, siendo el primero el más usado debido a su fácil aplicación, así como su alta eficiencia de transformación (McDondal *et al.*, 2002). Para este proyecto el método de transformación seleccionado fue electroporación, de forma que se obtuvieron clonas positivas de todas las construcciones, las cuales amplificaron a los tamaños esperados de cada PCR realizada (Figuras 25, 26 y 27).

Por otra parte, es importante mencionar que la correcta ejecución del método de transformación, así como de una efectiva transformación de las células recae en otros parámetros importantes. Uno de ellos es la calidad y concentración del DNA. Se sabe que la integración del DNA recombinante al genoma de la levadura se realiza por fenómenos de recombinación homóloga, sin embargo, en *P. pastoris*, ésta vía es significativamente deficiente en la integración de genes por lo que la mayoría de los cassettes de DNA se integran de forma aleatoria dentro del genoma (Zha *et al.*, 2023); es por eso que autores sugieren concentraciones mayores a 3 µg para asegurar la integración correcta del DNA.

7.-Resistencia a zeocina de las clonas transformantes y selección para expresión.

La identificación de clonas que poseen múltiples copias del gen de interés integrado dentro del genoma de la levadura es importante, lo cual es posible conocer de forma cualitativa al someter a las células a altas concentraciones de zeocina. Algunas de las clonas transformantes de las construcciones pCri16a-Q19 y pCri16a-Q109 se sembraron con 300 y 500 µg/mL de zeocina, existiendo un crecimiento evidente a cada concentración empleada (Figura 28 A y B) y presentándose un amplicón del tamaño esperado al realizar PCR de colonia. Cabe señalar que, de forma cualitativa, puede observarse una mayor intensidad de las bandas presentes en la Figura 29 A y en los carriles marcados en rojo en la Figura 29 B, donde las únicas clonas analizadas fueron aquéllas que inicialmente habían crecido a una concentración de zeocina de 500 µg/mL.

Se infiere que éste aumento en la intensidad de bandeo está relacionado con el aumento de número de copias del gen presente en el genoma. Autores han indicado que la presencia de múltiples copias del cassette de expresión es un factor importante para incrementar la producción de una proteína en *P. pastoris* (Shirvani *et al.*, 2020 y Vassileva *et al.*, 2001), sin embargo, para la expresión de proteínas extracelulares, maximizar el número de copias en ocasiones puede resultar en una disminución en el rendimiento debido a problemas en la traducción y plegamiento de grandes cantidades de la proteína de interés (Cos *et al.*, 2006). Un ensayo de tipo PCR tiempo real brinda la información necesaria para conocer el número de copias que presentan las clonas de forma cuantitativa, por lo que se sugiere optar por ese experimento para brindar conclusiones más contundentes.

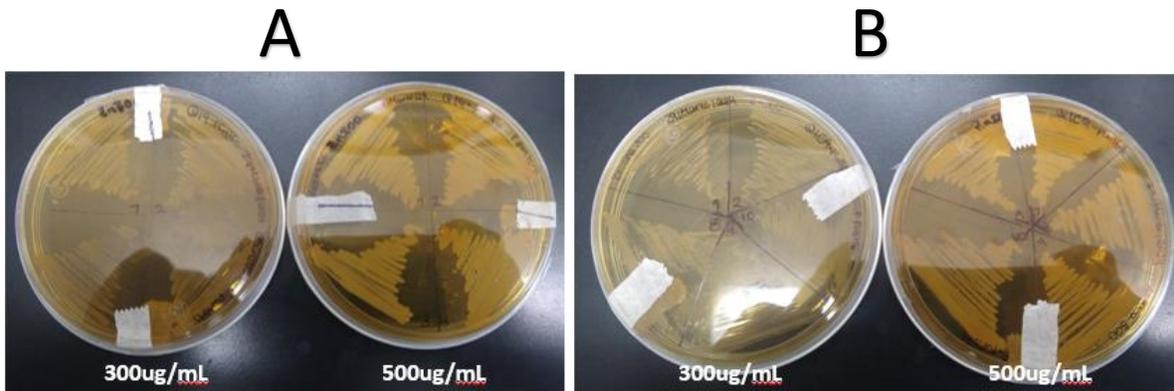


Figura 28. Crecimiento de clonas seleccionadas de *P. pastoris* a diferentes concentraciones de zeocina. A) pCri16a-Q19. B) pCri16a-Q109.

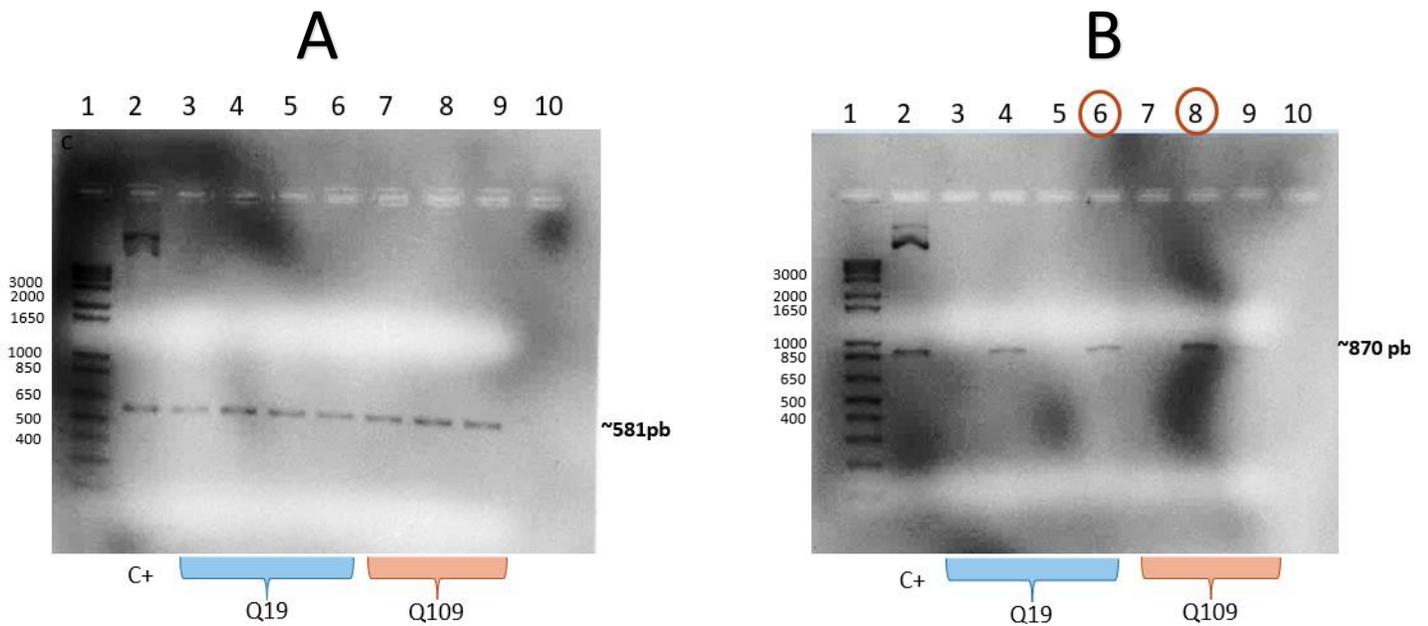


Figura 29. Verificación de clonas transformantes de *P. pastoris* que crecieron a 500 $\mu\text{g/mL}$ de zeocina. A) Amplificación con oligos Alpha-factor 5' y AOX1 3'. B) Amplificación con oligos AOX1 5' y AOX1 3'

8.-Determinación del fenotipo de las transformantes de *P. pastoris*

Ya que la cepa Superman5 GlycoSwitch puede presentar variaciones en su fenotipo al transformarse, la identificación de éste es importante ya que nos indica el metabolismo del metanol que presenta la levadura, esto al evaluar su capacidad de crecer en los medios MDH y MMH. La alcohol oxidasa (AOX) es la primera enzima que participa en la vía de asimilación del metanol, la cual oxida este compuesto para formar formaldehído. En *P. pastoris*, existen 2 genes que codifican para la alcohol oxidasa: AOX1 y AOX2, donde el primero es responsable de alrededor del 90% de la producción de la enzima y el segundo únicamente del 10% (Cos *et al.*, 2006). La transcripción de genes y traducción de proteínas recombinantes está regulada por el promotor AOX1, el cual se induce a través de la adición de metanol al medio como única fuente de carbono, y que además se ha demostrado, posee características de ser altamente regulable e inducible (Chang *et al.*, 2018). Sin embargo, dado que el metanol se metaboliza a peróxido de hidrógeno, un compuesto que induce la muerte celular, se han diseñado cepas que presentan un metabolismo diferente del metanol, generando así 3 fenotipos distintos: *Mut*⁺ (Methanol Utilization Plus) que tiene intactos ambos genes que codifican para la alcohol oxidasa (AOX1 y AOX2) por lo que es capaz de metabolizar rápidamente el metanol, *Mut*^S (Methanol Utilization Slow) donde AOX1 está silenciado y puede crecer lentamente en metanol, y *Mut*⁻ (Methanol Utilization Minus) donde tanto AOX1 y AOX2 se encuentran silenciados, haciendo incapaz a la levadura de crecer en metanol como única fuente de carbono (Krainer *et al.*, 2012). Cepas como X-33 y GS115 han sido descritas como *Mut*⁺, mientras que cepas como KM71 y KM71H son *Mut*^S (Karbalaei *et al.*, 2020).

En la Figura 30, donde las clonas se sembraron en MDH con dextrosa como fuente primaria de carbono, se identificó un crecimiento homogéneo de las células tanto de las clonas recombinantes como de las cepas control X-33 (*Control positivo, Mut*⁺) y KM71 (*Control negativo, Mut*^S), lo cual es un indicativo del metabolismo primario de monosacárido. Sin embargo, cuando las clonas recombinantes fueron crecidas en MMH con metanol como única fuente de carbono (Figura 31), muestran un crecimiento similar a la cepa X-33, observando un evidente retraso en el crecimiento del control negativo, KM71. Estos resultados son concluyentes con los presentados por Burrowes y colabores en 2005 (Burrowes *et al.*, 2005), los cuales han utilizado anteriormente éstas

cepas como controles para identificar el fenotipo de clonas recombinantes. Basándonos en esto, las clonas transformantes de las construcciones pCri16a-Q6 y pCri16a-Q109 se identificaron como *Mut*⁺, al tener un crecimiento similar a *P. pastoris* X-33 en MMH. Entre las ventajas que poseen las cepas *Mut*⁺ en la producción de proteínas recombinantes destacan una velocidad de crecimiento elevada a comparación de las cepas *Mut*^S y mayores productividades (Krainer *et al.*, 2012.). Estudios reportados por Singh y colaboradores en 2020 indicaron un aumento en la expresión de 5 a 10 veces mayor de la beta galactosidasa con una cepa *Mut*⁺, a comparación de las cepas *Mut*⁻ y *Mut*^S (Singh *et al.*, 2020).

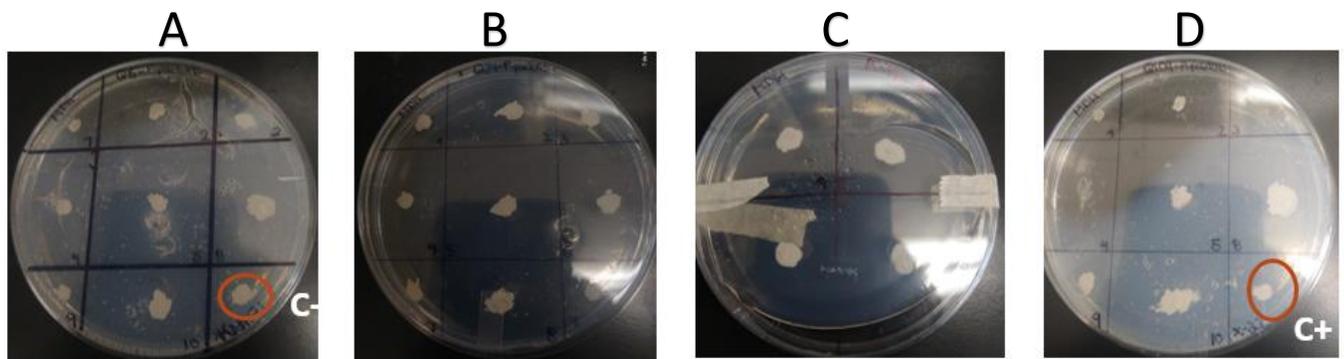


Figura 30. Clonas sembradas en Medio Mínimo con Dextrosa e Histidina (MDH).
A) pCri16a-Q6 y *P. pastoris* KM71H *Mut*^S. **B)** pCri16a-Q34. **C)** pCri16a-Q19. **D)** pCri16a-Q109 y *P. pastoris* X-33 *Mut*⁺

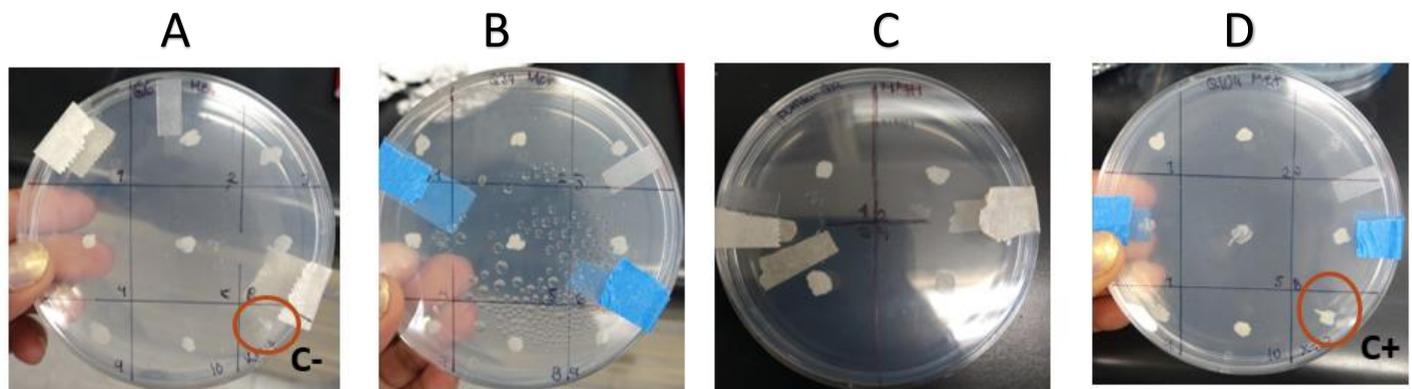


Figura 31. Clonas sembradas en Medio Mínimo con Metanol e Histidina (MMH).
A) pCri16a-Q6 y *P. pastoris* KM71H *Mut*^S. **B)** pCri16a-Q34. **C)** pCri16a-Q19. **D)** pCri16a-Q109 y *P. pastoris* X-33 *Mut*⁺

9.-Identificación de las proteínas quiméricas Q19 y Q109 por inmunoensayo Dot-Blot

La expresión de proteínas recombinantes en la levadura *P. pastoris* es un proceso dependiente de múltiples factores los cuales afectan la producción de las proteínas. En este trabajo inicialmente se planteó la expresión de las proteínas quiméricas de 4 epítomos, Q19 y Q109 debido a que se espera, generen una mayor respuesta inmunológica. Posterior a la selección de clonas e inducción de las proteínas quiméricas Q19 y Q109, se analizó la localización de estas tanto en el lisado celular como en el sobrenadante mediante un inmunoensayo Dot-Blot con anticuerpo α -Chagasina. Como se observa en la Figura 32, ambas proteínas se detectaron en el sobrenadante desde el inicio de la inducción (24 hrs), hasta el final (120 hrs), más no en el lisado celular, por lo que se producen de forma extracelular gracias al factor de secreción alpha de *Sacharommyces cerevisiae*. Asimismo, es notable el incremento en la expresión de la Q19 con el paso de los días, caso contrario a la Q109. Estudios anteriores han identificado la degradación de proteínas de bajo peso molecular en *P. pastoris* debido a proteasas generadas por la levadura (Ahmad *et al.*, 2014).

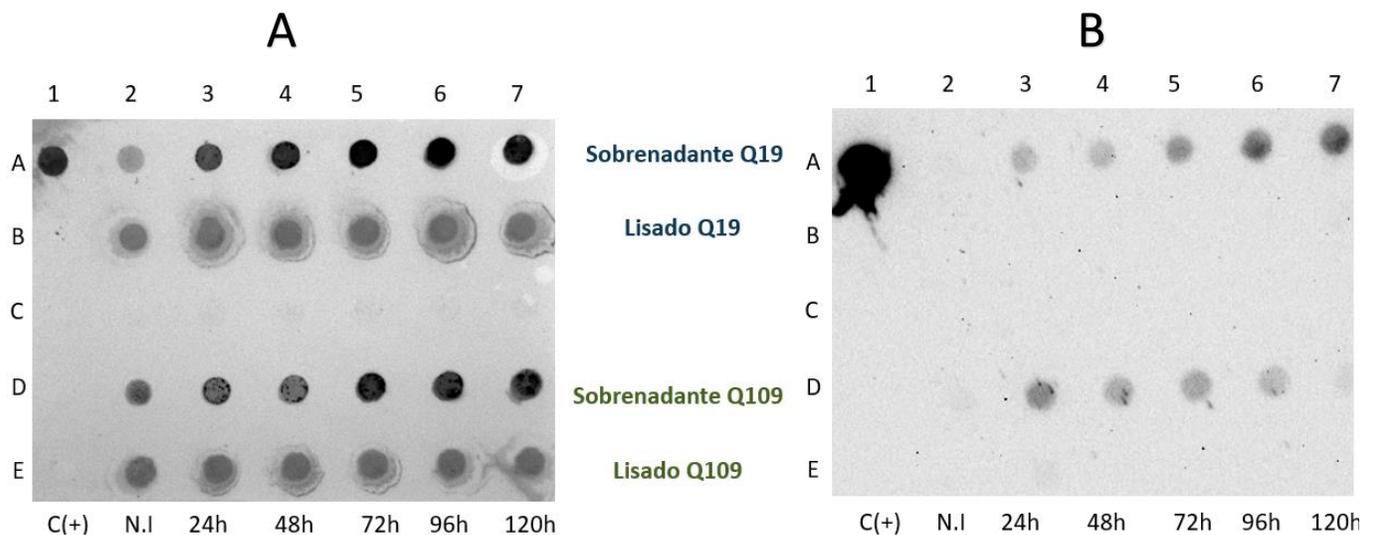


Figura 32. Dot Blot de la expresión de las quimeras en el lisado y sobrenadante de *P. pastoris*. Ab: α -chagasina. C(+): Q109 *E. coli*. A) Tinción con rojo de Ponceau. B) Membrana revelada.

Una vez identificada la forma de expresión de las proteínas quiméricas se detectó la presencia del tag de histidinas en las clonas seleccionadas mediante Dot-Blot con anticuerpo α -6x Histidinas del amino terminal. Sin embargo, tal como se muestra en las Figuras 32, 33 y 34, el reconocimiento de las proteínas quiméricas en el medio se observó únicamente con una sensibilidad de femtomoles, lo que indica un bajo rendimiento en la producción a nivel matraz. Bajo condiciones normales y no totalmente controladas, la producción de proteínas en *P. pastoris* es baja, secretando proteínas con títulos bajos (Pan *et al.*, 2022).

Otras alternativas para obtener mejores rendimientos en la expresión de proteínas en *P. pastoris* recae en el uso de promotores constitutivos como pGAP, así como el escalamiento de la producción a nivel bioreactor. Zhang y colaboradores expresaron de forma recombinante una hialuronidasa en *P. pastoris*, obteniendo mejores rendimientos en un cultivo de reactor de 2L, utilizando un plásmido constitutivo (Zhang *et al.*, 2024).

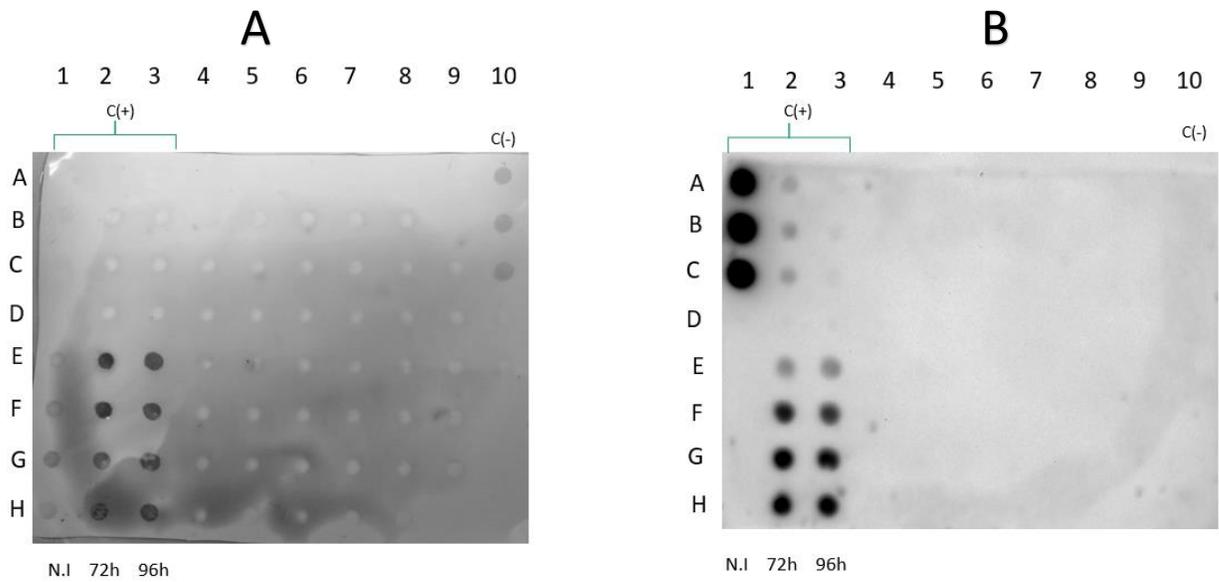


Figura 33. Dot Blot de la expresión de las clonas de la construcción Q109 en *P. pastoris*. Ab: α -6x Histidinas. C(+): Q109 *E. coli*. C(-): Lisozima comercial. A) Membrana teñida con rojo de Ponceau. B) Membrana revelada.

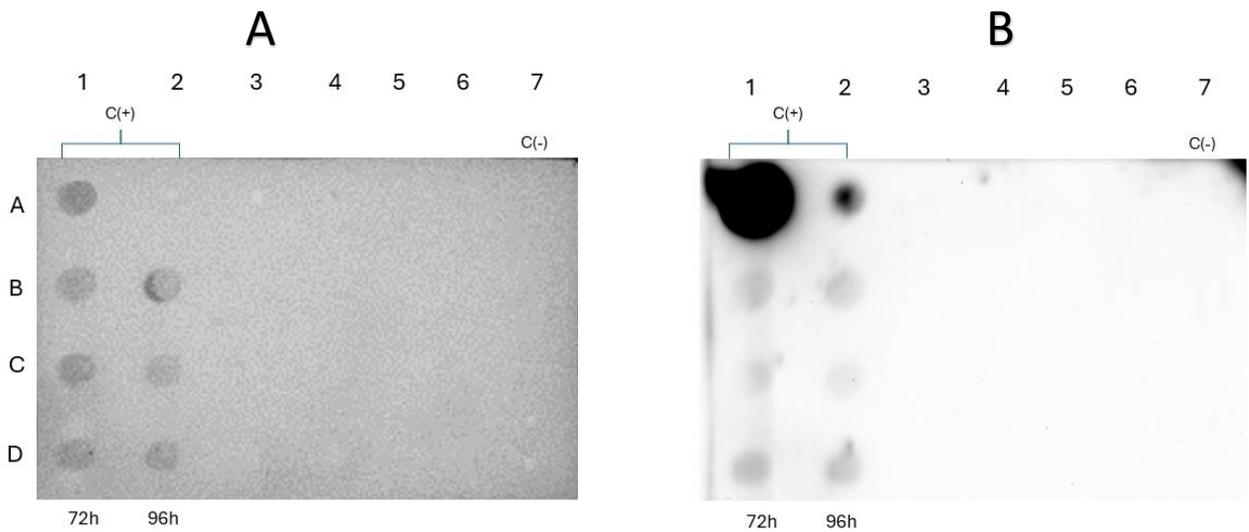


Figura 34. Dot Blot de la expresión de las clonas de la construcción Q19 en *P. pastoris*. Ab: α -6x Histidinas. C(+): Q109 *E. coli*, C(-): Lisozima comercial. A) Membrana teñida con rojo de Ponceau. B) Membrana revelada.

10.- Purificación de la quimera Q109 e identificación por inmuno ensayo.

Al expresar las proteínas quiméricas en matraz de 100 mL, únicamente la Q109 fue purificada por cromatografía de afinidad a níquel. La Figura 35 muestra el perfil cromatográfico obtenido, presentándose un primer pico de elución en el lavado con 7% de Buffer B (81.5 mM de Imidazol) correspondiente a las proteínas contaminantes presentes en el medio, así como un segundo pico durante el gradiente de Buffer B en aproximadamente 30% de Buffer B (185 mM de Imidazol) que corresponde a la proteína purificada, donde se observa en la Figura 36 la presencia de una banda de aproximadamente 14.3 kDa la cual coincide a su vez con el peso esperado de la proteína quimérica y que se encuentra a un peso superior al control, que en este caso fue la Chag WT presente en el carril 10. Esto es importante de mencionar ya que al tener la proteína el peso teórico esperado indica que no se encuentra glicosilada, por lo que el uso de la cepa Superman 5 Glycoswitch evitó el hiperglicosilamiento de la molécula, factor importante para proteínas recombinantes producidas en levaduras y con usos farmacéuticos. Esto también se sustenta con los resultados obtenidos en las Figura 37 A y B, donde la proteína purificada se sometió nuevamente a un inmunoensayo Western-Blot, presentándose una señal correspondiente a una banda de aproximadamente 14.3kDa, por lo que la proteína fue correctamente purificada a pesar de encontrarse en muy poca cantidad en el medio.

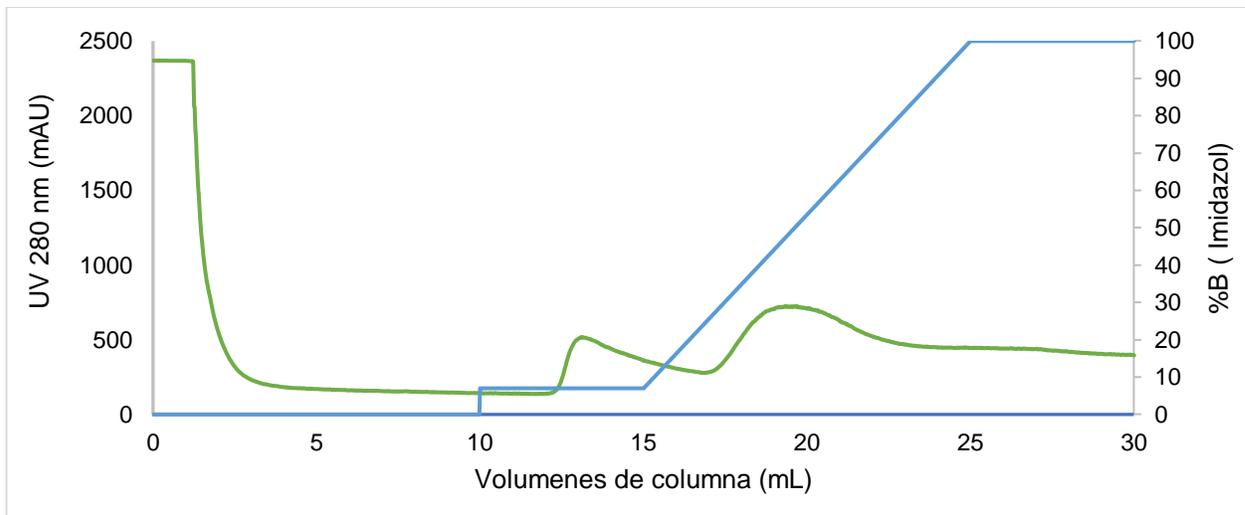


Figura 35. Perfil cromatográfico de la purificación de la proteína quimérica Q109 de *P. pastoris*. La purificación se llevó a cabo en el sistema NGC de Biorad. Se muestra únicamente el perfil de elución al aplicarse a la columna de afinidad a níquel un gradiente de imidazol. Línea verde: absorbancia a 280 nm (mAu); Línea azul: porcentaje de buffer B.

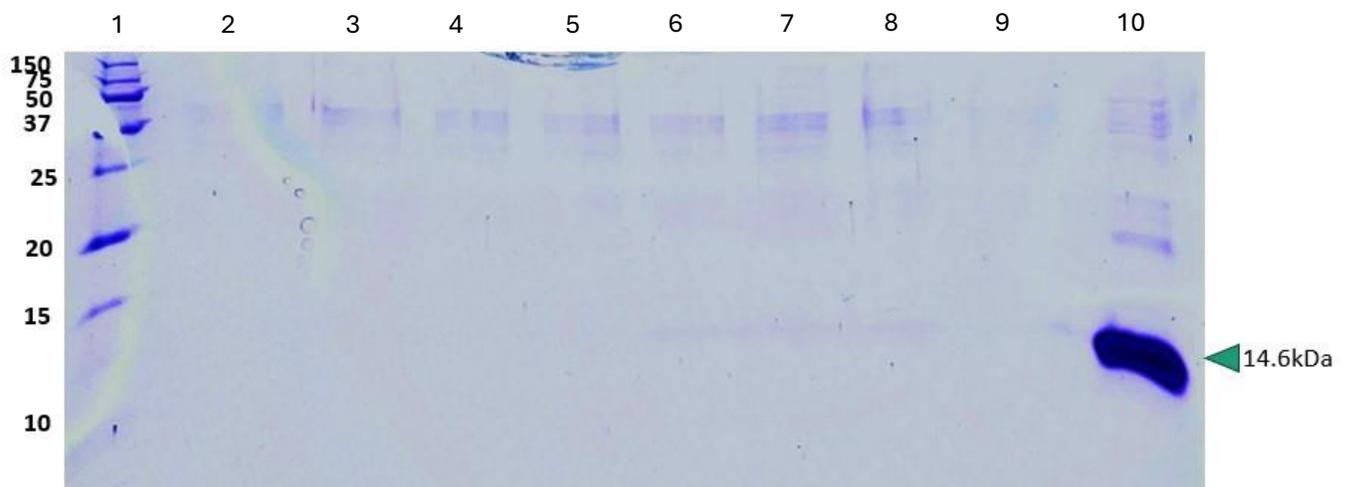


Figura 36. Purificación de la proteína quimérica Q109 por afinidad a níquel. Análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la elución de la proteína. Poliacrilamida al 15%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2-5: Fracciones recolectadas de la elución a 81.5 mM de Imidazol. Carril 6-9: Fracciones recolectadas de la elución a 185 mM de Imidazol. Carril 10: C(+) Chagasina WT.

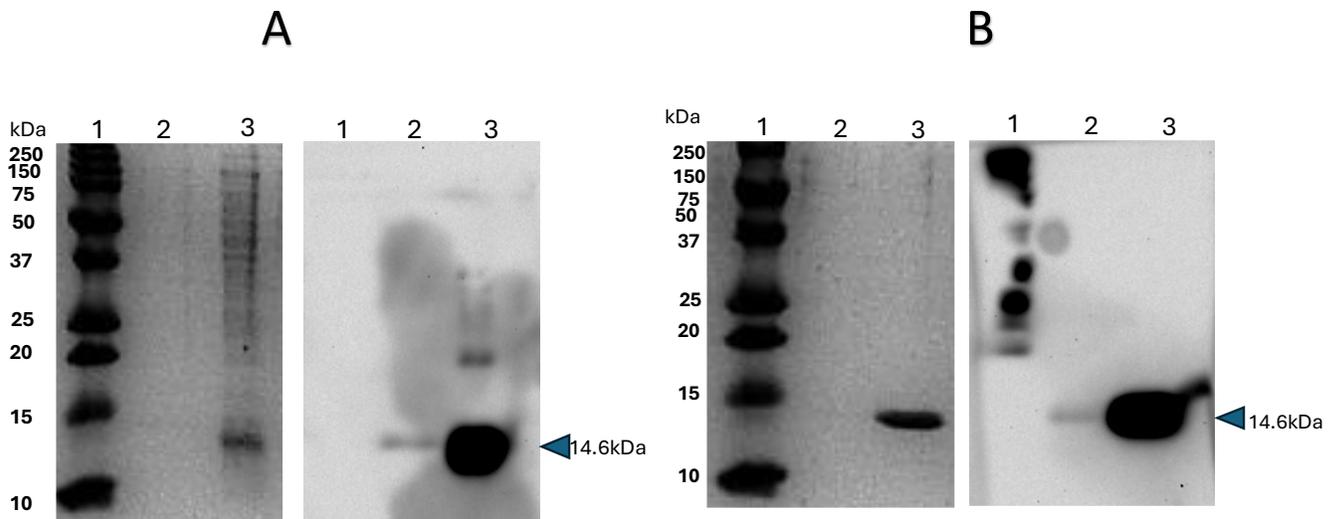


Figura 37. Inmunodetección de la proteína quimérica Q109 purificada.

A) Ab: α -chagasina. Izquierda: SDS-PAGE espejo. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Q109 purificada de *Pichia pastoris*. Carril 3: 4 μ g de Chagasina WT. Derecha: Membrada revelada. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Q109 purificada de *Pichia pastoris*. Carril 3: 4 μ g de Chagasina WT **B) Ab: α -6x Histidinas.** Izquierda: SDS-PAGE espejo. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Q109 purificada de *Pichia pastoris*. Carril 3: 4 μ g de Q109 purificada de *E. coli*. Derecha: Membrada revelada. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Q109 purificada de *Pichia pastoris*. Carril 3: 4 μ g de Q109 purificada de *E. coli*.

CONCLUSION

Se transformó *P. pastoris* con las secuencias de las 4 proteínas quiméricas de chagasina seleccionadas con la mayor solubilidad estimada con los servidores Aggrescan3D y CamSol: Q6 y Q34 de 3 epítomos de TSA-1; Q19 y Q109 de 4 epítomos de TSA-1, donde 2 quimeras recombinantes mutadas de 4 epítomos, Q19 y Q109, se expresaron en la levadura de forma soluble, detectándose por inmunoensayo en el medio de cultivo, indicando así su secreción, cumpliendo satisfactoriamente con el objetivo general planteado en este proyecto.

PERSPECTIVAS

Con la finalidad de complementar el presente proyecto se proponen las siguientes actividades experimentales:

- Realizar un screening en las condiciones (temperatura, agitación y aireación) para la expresión de las proteínas quiméricas en *P. pastoris* a nivel matraz.
- Estandarizar y llevar a cabo la expresión de las proteínas quiméricas de 4 epítomos en biorreactor de 2 L, para su posterior purificación.
- Realizar los exámenes preclínicos correspondientes, inmunizando modelos murinos para comparar la respuesta inmunológica con la inmunización de TSA-1 completa.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Haberland, S. Munoz, G. Wallukat, et al. (2013) Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med*, 51, pp. 271-294 <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2012-0316>
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Jun;98(12):5301-17. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5. Epub 2014 Apr 18. PMID: 24743983; PMCID: PMC4047484.
- Alagheband, B., Payandeh, Z., Khalili, S & Zakeri, A (2019). Immunoinformatics: In Silico Approaches and Computational Design of a Multiepitope, Immunogenic Protein. *International Reviews of Immunology*.
- Álvarez-Hernández, D.-A., Franyuti-Kelly, G.-A., Díaz-López-Silva, R., González-Chávez, A.-M., González-Hermosillo-Cornejo, D., & Vázquez-López, R. (2018). Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 81(3), 154–164. doi:10.1016/j.hgmx.2016.09.010
- Alves, M. J. M., & Colli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival. *IUBMB Life*, 59(4), 274–279. doi:10.1080/15216540701200084
- Bikash, K (2020) Solubility-Weighted Index: fast and accurate prediction of protein solubility, *Bioinformatics*, Volume 36, Issue 18, 4691–4698, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa578>
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science*. 21;242(4877):423-6. doi: 10.1126/science.3140379. Erratum in: *Science* 1989 Apr 28;244(4903):409. PMID: 3140379
- Bretthauer RK, Castellino FJ (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem*;30(3):193-200. PMID: 10574687.
- Bruce, D., Cardew, E., Freitag-Pohl, S., & Pohl, E. (2019). How to Stabilize Protein: Stability Screens for Thermal Shift Assays and Nano Differential Scanning Fluorimetry in the Virus-X Project. *Journal of Visualized Experiments*, 144. <https://doi.org/10.3791/58666>
- Burrowes OJ, Diamond G, Lee TC. (2005) Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system. *J Biomed Biotechnol*. (4):374-84. doi: 10.1155/JBB.2005.374. PMID: 16489270; PMCID: PMC1361485.
- Buscaglia C.A., Campo V.A., Frasc A.C.C., Di Noia J.M.(2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: Host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol*; 4:229–236. doi: 10.1038/nrmicro1351.
- Capelli, R., Marchetti, F., Tiana, G., and Colombo, G. (2017) SAGE: A Fast Computational Tool for Linear Epitope Grafting onto a Foreign Protein Scaffold, *J Chem Inf Model* 57, 6-10
- Cárdenas-Guerra RE, Montes-Flores O, Nava-Pintor EE, Reséndiz-Cardiel G, Flores-Pucheta CI, Rodríguez-Gavaldón YI, Arroyo R, Bottazzi ME, Hotez PJ, Ortega-López J. (2024) Chagasin from *Trypanosoma cruzi* as a molecular scaffold to express epitopes of TSA-1 as soluble recombinant chimeras. *Protein Expr Purif*;218:106458. doi: 10.1016/j.pep.2024.106458. PMID: 38423156.
- Centers for Disease Control and Prevention (2022). About Chagas Disease. Recuperado el 15/07/23 de https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html

- Cerny, N., Bivona, A. E., Sanchez Alberti, A., Trinitario, S. N., Morales, C., Cardoso Landaburu, A. Malchiodi, E. L. (2020). Cruzipain and Its Physiological Inhibitor, Chagasin, as a DNA-Based Therapeutic Vaccine Against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.565142
- Chen X, Zaro JL, Shen W-C. (2013) Fusion protein linkers:property, design and functionality. *Adv Drug DelivRe* ;65(10):1357–1369. doi:10.1016/j.addr.2012.09.039.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J.L., Valero, F., (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review.*Microbial. Cell Factories* 5 (1), 17.
- Cruz, O (2014). Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries.
- Da Fonseca, L. M., Da Costa, K. M., Chaves, V. S., Freire-De-Lima, C. G., Morrot, A., Mendonca-Previato, L., et al. (2019). Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma Cruzi* Trans-Sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. *Front. Immunol.* 10, 164. doi: 10.3389/fimmu.2019.00164
- De Baere T, Claeys G, Swinne D, Verschraegen G, Muylaert A, Massonet C, Vaneechoutte M. (2002) Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2). *BMC Microbiol.* 5;2:21. doi: 10.1186/1471-2180-2-21. PMID: 12139769; PMCID: PMC117793.
- De la Cruz, A; Monteon, V & Solis, R (2017). A brief of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal Parasitol Research.* doi: 10.1155/2017/3751403
- De la Cruz, J. J., Villanueva-Lizama, L., Dzul-Huchim, V., Ramirez-Sierra, M. J., Martinez-Vega, P., Rosado-Vallado, M., Ortega-Lopez, J., Flores-Pucheta, C. I., Gillespie, P., Zhan, B., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J., and Dumonteil, E. (2019) Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immuno-therapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *Hum Vaccin Immunother* 15, 210-219.
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*;32(5):1792-7. doi: 10.1093/nar/gkh340. PMID: 15034147; PMCID: PMC390337.
- Elgert, C., Rühle, A., Sandner, P., & Behrends, S. (2019). Thermal shift assay: Strengths and weaknesses of the method to investigate the ligand-induced thermostabilization of soluble guanylyl cyclase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113065. doi:10.1016/j.jpba.2019.113065
- Escolano, J; Marín, C; Rosales, M; Medina, E; Martín, R (2022) An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: Intervention points for an effective treatment. *Infectious Diseases.* <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.2c00123>
- Farsiani, H., Mosavat, A., Soleimanpour, S., Sadeghian, H., Eydgahi, M. R. A., Ghazvini, K., Rezaee, S. A. (2016). Fc-based delivery system enhances immunogenicity of a tuberculosis subunit vaccine candidate consisting of the ESAT-6: CFP-10 complex. *Molecular BioSystems*, 12(7), 2189–2201.
- Figueiredo da Silva, A. A., Vieira, L. de C., Krieger, M. A., Goldenberg, S., Zanchin, N. I. T., & Guimarães, B. G. (2007). Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Structural Biology*, 157(2), 416–423. doi:10.1016/j.jsb.2006.07.017
- Freire-de-Lima L., Fonseca L.M., Oeltmann T., Mendoca-Previato L., Previato J.O. (2015) The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology.* ;25:1142–1149. doi: 10.1093/glycob/cwv057.

- García-Huertas, P., & Cardona-Castro, N. (2021). *Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112020. doi:10.1016/j.biopha.2021.112020
- George RA. and Heringa J. (2002) An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Engineering* 15, 871-879.
- Huynh K, Partch CL.(2015) Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr Protoc Protein Sci.* 2;79:28.9.1-28.9.14. doi: 10.1002/0471140864.ps2809s79. PMID: 25640896; PMCID: PMC4332540.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Karbalaee, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris* : A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.29583
- Knight, J. M., Zingales, B., Bottazzi, M. E., Hotez, P., and Zhan, B. (2014) Limited antigenic variation in the *Trypanosoma cruzi* candidate vaccine antigen TSA-1, *Parasite Immunol* 36, 708-712.
- Kowalska, P. Kowalski, M. Torres. (2011) Chagas Disease-American trypanosomiasis. *Pol Ann Med*, 18 pp. 156-167
- Krainer, F. W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., & Glieder, A. (2012). *Recombinant protein expression in Pichia pastoris strains with an engineered methanol utilization pathway*. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 22. doi:10.1186/1475-2859-11-22
- Kramer RM, Shende VR, Motl N, Pace CN, Scholtz JM. (2012) Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophys J*;102(8):1907-15. doi: 10.1016/j.bpj.2012.01.060. PMID: 22768947; PMCID: PMC3328702.
- Kurotani A., Takagi T., Toyama M., Shirouzu M., Yokoyama S., Fukami Y., et al. (2010). Comprehensive Bioinformatics Analysis of Cell-Free Protein Synthesis: Identification of Multiple Protein Properties that Correlate with Successful Expression. *FASEB j.* 24 (4), 1095–1104. 10.1096/fj.09-139527
- Kyte J, Doolittle RF.(1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*;157(1):105-32. doi: 10.1016/0022-2836(82)90515-0. PMID: 7108955.
- Linder S, Schliwa M, Kube-Granderrath E. (1996) Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques*;20(6):980-2. doi: 10.2144/96206bm08. PMID: 8780867
- Lutz Grossmann, David Julian McClements (2023) ,Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins, *Food Hydrocolloids*, Volume 137, 108416, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108416>.
- Maldonado, E; Morales, S; Urbina, F & Solari, A (2022). Vaccine Design against Chagas Disease Focused on the Use of Nucleic Acids. *Vaccines*. doi: 10.3390/vaccines10040587
- Malleshappa Gowder S, Chatterjee J, Chaudhuri T, Paul K.(2014) Prediction and analysis of surface hydrophobic residues in tertiary structure of proteins. *ScientificWorldJournal*. 9;2014:971258. doi: 10.1155/2014/971258. PMID: 24672404; PMCID: PMC3930195.
- Matos, M. N., Alberti, A. S., Morales, C., Cazorla, S. I., & Malchiodi, E. L.(2016). A prime-boost immunization with Tc52 N-terminal domain DNA and the recombinant protein expressed in *Pichia pastoris* protects against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 34(28),3243–3251

- Max Hebditch (2017) Protein–Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence, *Bioinformatics*, Volume 33, Issue 19, Pages 3098–3100, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345>
- Monteiro A.C.S., Abrahamson M., Lima A.P.C.A., Vannier-Santos M.A., Scharfstein J (2001). Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine proteases inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.* 14:3933–3942
- Mucci, J., Risso, M. G., Leguizamon, M. S., Frasc, A. C., Campetella, O. (2006). The Trans-Sialidase From *Trypanosoma Cruzi* Triggers Apoptosis by Target Cell Sialylation. *Cell Microbiol.* 8, 1086–1095. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00689.x
- Negahdaripour M, Nezafat N, Eslami M, Ghoshoon MB, Shoolian E, Najafipour S, Morowvat MH, Dehshahri A, Erfani N, Ghasemi Y. (2018) Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine. *Infect Genet Evol*;58:96-109. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.008. Epub 2017 Dec 16. PMID: 29253673.
- Olivo Freitas, C., Sy, H., Gharamti, A. (2022) Chronic Chagas Disease—the Potential Role of Reinfections in Cardiomyopathy Pathogenesis. *Curr Heart Fail Rep* 19, 279–289 <https://doi.org/10.1007/s11897-022-00568-9>
- Pan Y, Yang J, Wu J, Yang L, Fang H. (2022) Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins. *Front Microbiol.* 24;13:1059777. doi: 10.3389/fmicb.2022.1059777. PMID: 36504810; PMCID: PMC9730254.
- Pech-Canul, Á. de la C., Monteón, V., & Solís-Oviedo, R.-L. (2017). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*, 1–13. doi:10.1155/2017/3751403
- Pereira, D & de Souza, W(2018). The Kinetoplast of Trypanosomatids:From early studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning*.
- Pietro Sormanni, Francesco A. Aprile, Michele Vendruscolo (2015) The CamSol Method of Rational Design of Protein Mutants with Enhanced Solubility,*Journal of Molecular Biology*,Volume 427, Issue 2,Pages 478-490
- Pollet J, Chen WH, Versteeg L, Keegan B, Zhan B, Wei J, Liu Z, Lee J, Kundu R, Adhikari R, Poveda C, Villar MJ, de Araujo Leao AC, Altieri Rivera J, Momin Z, Gillespie PM, Kimata JT, Strych U, Hotez PJ, Bottazzi ME. (2021) SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice. *Hum Vaccin Immunother*;17(8):2356-2366. doi: 10.1080/21645515.2021.1901545. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33847226; PMCID: PMC8054496.
- Pujols J, Iglesias V, Santos J, Kuriata A, Kmiecik S, Ventura S. (2022) A3D 2.0 Update for the Prediction and Optimization of Protein Solubility. *Methods Mol Biol*;2406:65-84. doi: 10.1007/978-1-0716-1859-2_3. PMID: 35089550.
- Q. Hou, J.M. Kwasigroch, M. Rومان, F. Pucci (2020), *SOLart : a structure-based method to predict protein solubility*, *Bioinformatics* 36, 1445-1452.
- Radoman, B., Grünwald-Gruber, C., Schmelzer, B., Zavec, D., Gasser, B., Altmann, F., & Mattanovich, D. (2020). The Degree and Length of O -Glycosylation of Recombinant Proteins Produced in *Pichia pastoris* Depends on the Nature of the Protein and the Process Type. *Biotechnology Journal*, 16(3), 2000266. doi:10.1002/biot.202000266
- Redhead, M., Satchell, R., McCarthy, C., Pollack, S., & Unitt, J. (2017). Thermal Shift as an Entropy-Driven Effect. *Biochemistry*, 56(47), 6187–6199. doi:10.1021/acs.biochem.7b00860
- Ruef, Barbara (1992) Structure and expression of the TSA gene family in *Trypanosoma cruzi*. Jean. University of California, Irvine ProQuest Dissertations Publishing. 9306191.

- Ruiz, K (2020). Vigilancia entomológica de la enfermedad de Chagas. Secretaría de Salud. Recuperado el 15/07/23 de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/vigilancia-entomologica-de-la-enfermedad-de-chagas?state=published>
- Salmon, D., Aido-Machado, R., Diehl, A., Leidert, M., Schmetzer, O., Lima, A.P.C.A., Scharfstein, J., Oschkinat, H., Pires, J.R., 2006. Solution structure and backbone dynamics of the Trypanosoma cruzi cysteine protease inhibitor chagasin. *J. Mol. Biol.* 357 (5), 1511–1521.
- Samarachith, P & Tarleton, R(2014). The Trypanosoma cruzi Flagellum Is Discarded via Asymmetric Cell Division following Invasion and Provides Early Targets for Protective CD8+ T Cells. *Cell & Host Microbe*. ISSN:1931-3128
- Santos, C. C. (2005). Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of Trypanosoma cruzi, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 118(5), 901–915. doi:10.1242/jcs.01677
- Schaub, G & Meiser, C (2011). Xenodiagnosis. *Nature Helps*. DOI:10.1007/978-3-642-19382-8_12
- Shirvani, R., Barshan-tashnizi, M., & Shahali, M. (2020). *An investigation into gene copy number determination in transgenic yeast; The importance of selecting a reliable real-time PCR standard. Biologicals*. doi:10.1016/j.biologicals.2020.04.001
- Singh, A., & Narang, A. (2020). The Mut+ strain of Komagataella phaffii (Pichia pastoris) expresses PAOX1 5 and 10 times faster than Muts and Mut– strains: evidence that formaldehyde or/and formate are true inducers of PAOX1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18), 7801–7814. doi:10.1007/s00253-020-10793-8
- Spiegel, H., Schinkel, H., Kastilan, R., Dahm, P., Boes, A., Scheuermayer, M., Schillberg, S. (2015). Optimization of a multi-stage, multi-subunit malaria vaccine candidate for the production in Pichia pastoris by the identification and removal of protease cleavage sites. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(4), 659–667.
- Stephenson JD, Freeland SJ.(2013) Unearthing the root of amino acid similarity. *J Mol Evol*;77(4):159-69. doi: 10.1007/s00239-013-9565-0. Epub 2013 Jun 7. PMID: 23743923; PMCID: PMC6763418.
- Tokmakov AA, Kurotani A, Sato KI.(2021) Protein pl and Intracellular Localization. *Front Mol Biosci*;8:775736. doi: 10.3389/fmolb.2021.775736. PMID: 34912847; PMCID: PMC8667598.
- Tripathi, L., Mani, S., Raut, R., Poddar, A., Tyagi, P., Arora, U, Khanna, N.(2015). Pichia pastoris-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 100
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z. et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* 596, 590–596 <https://doi.org/10.1038>
- Türkanoglu Özçelik A, Yılmaz S, Inan M. (2019) Pichia pastoris Promoters. *Methods Mol Biol.*;1923:97-112. doi: 10.1007/978-1-4939-9024-5_3. PMID: 30737736.
- Valdez, F; Padilla, A; Wang,W & Tarleton, R(2018). Spontaneous dormancy protects Trypanosoma cruzi during extended drug exposure. *American Chemical Society*. <https://doi.org/10.7554/elife.34039.001>
- Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. (2001) Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *Protein Expr Purif*;21:71–80. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1335>
- Vihinen M. (2020) Solubility of proteins. *ADMET DMPK*;8(4):391-399. doi: 10.5599/admet.831. PMID: 35300195; PMCID: PMC8915590.

- World Health Organization(2023). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Recuperado el 13/07/23 de [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Wrightsman RA, Dawson BD, Fouts DL, Manning JE (1994). Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J Immunol.* 1;153(7):3148-54. PMID: 7522250.
- Zha, Jian, Dan Liu, Juan Ren, Zhijun Liu, and Xia Wu. (2023). Advances in Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* Strains as Powerful Cell Factories" *Journal of Fungi* 9, no. 10: 1027. <https://doi.org/10.3390/jof9101027>
- Zhang, YS., Gong, JS., Jiang, JY.(2024) Engineering protein translocation and unfolded protein response enhanced human PH-20 secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **108**, 54 <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12878-6>

Tabla 18. Reacciones de linealización de las construcciones con la enzima PmeI

Construcción	pDNA (μL)	Buffer BSA(μL)	Buffer 4(μL)	PmeI (μL)	Agua (μL)
pCri16a-Q6	7.4	0.5	1.0	0.5	0.6
pCri16a-Q34	7.5	0.5	1.0	0.5	0.5
pCri16a-Q19	6.6	0.5	1	0.5	1.5
pCri16a-Q109	10	0.6	1.2	0.5	0.0

Tabla 19 Secuencia de los oligos utilizados para PCR

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)	Tm (C°)
Promotor T7 5' (Forward)	5'TAATACGACTCACTATAGGGG 3'	21	51
Terminador T7 3' (Reverse)	5'CCAAGGGGTTATGCTAGTTA 3'	20	53
Alpha-factor 5' Forward	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGCT-3'	22	59
AOX1 5' Forward	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'	21	56
AOX1 3' Reverse	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'	21	56
Q109 Forward (Q109 Fw)	5'-GCCATGGCGAGCCACAA-3'	17	59
Q109 Reverse (Q109 Rv)	5'-ATGCTCGAGGTTGGCCTTC-3'	19	59

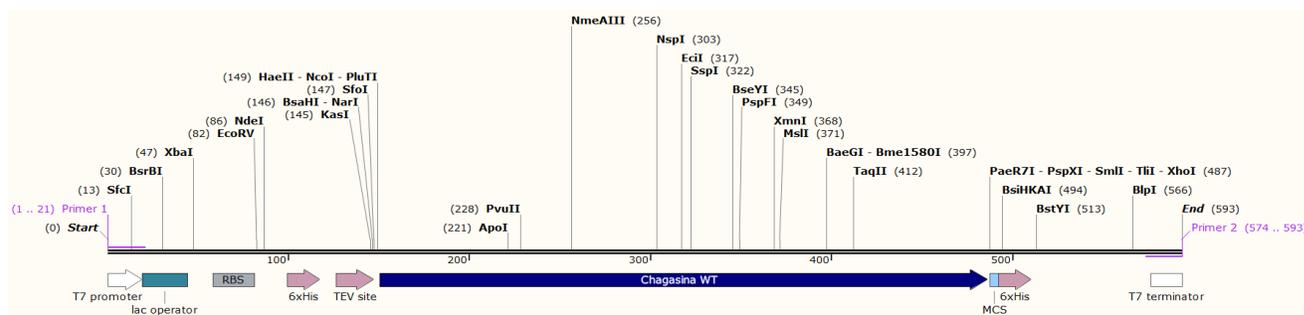


Figura 40 Amplicón generado con los oligos Promotor T7 5' y Terminador T7 3'. Modelado con SnapGene

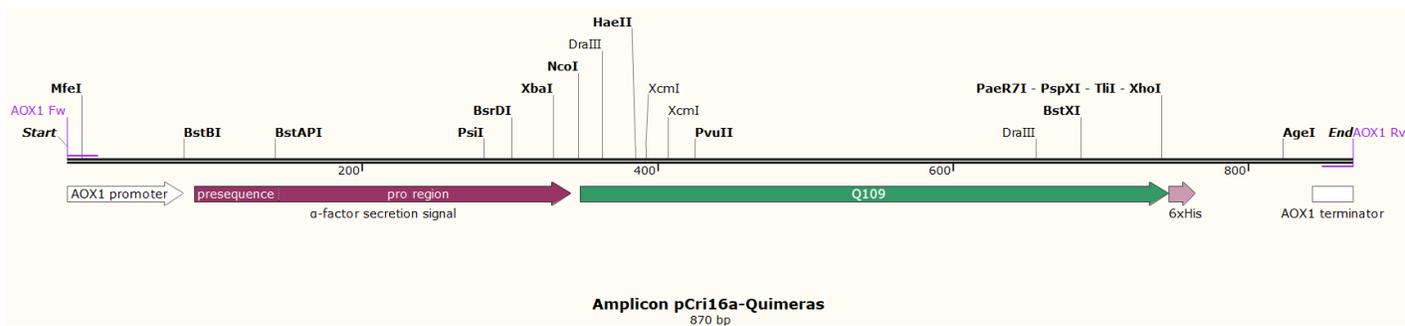


Figura 41. Amplicón generado con los oligos AOX1 5' y AOX1 3'. Modelado con SnapGene

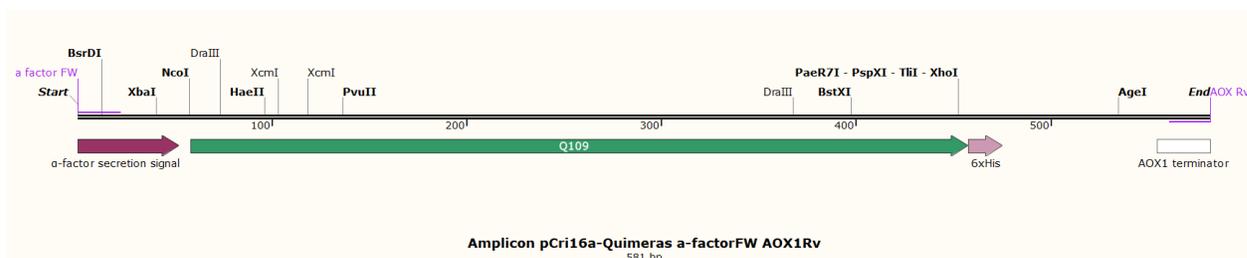


Figura 42 Amplicón generado con los oligos Alpha-factor 5' y AOX1 3'. Modelado con SnapGene

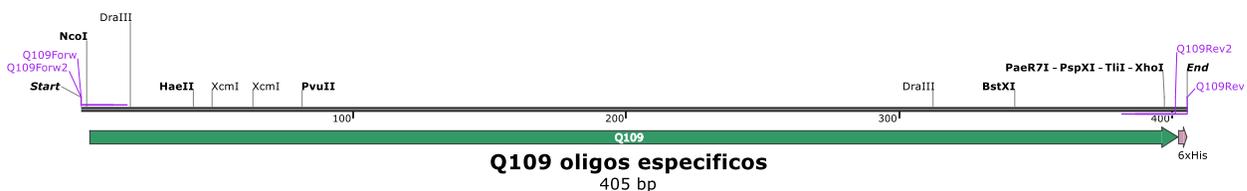


Figura 43 Amplicón generado con los oligos Q109 Fw y Q109 Rv'. Modelado con SnapGene

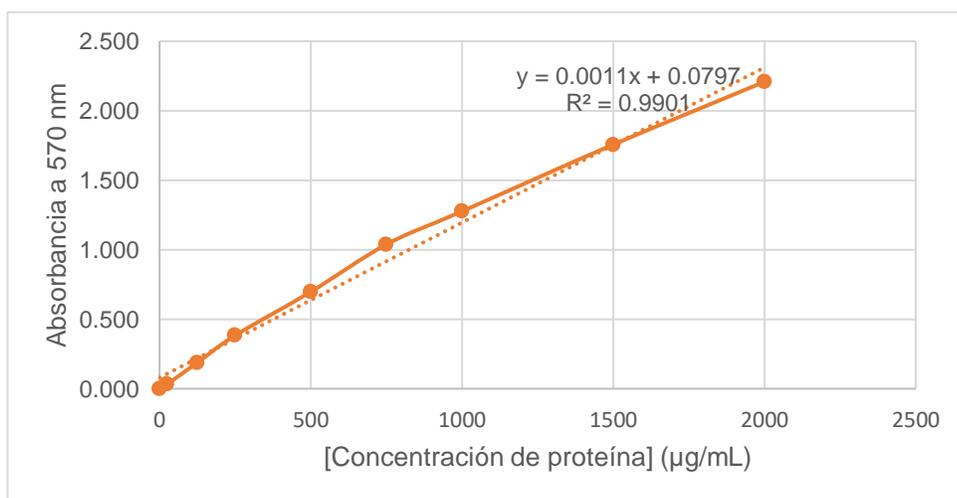


Figura 44. Curva estándar para cuantificación de proteína mediante metodología del ácido bicinconínico (BCA)

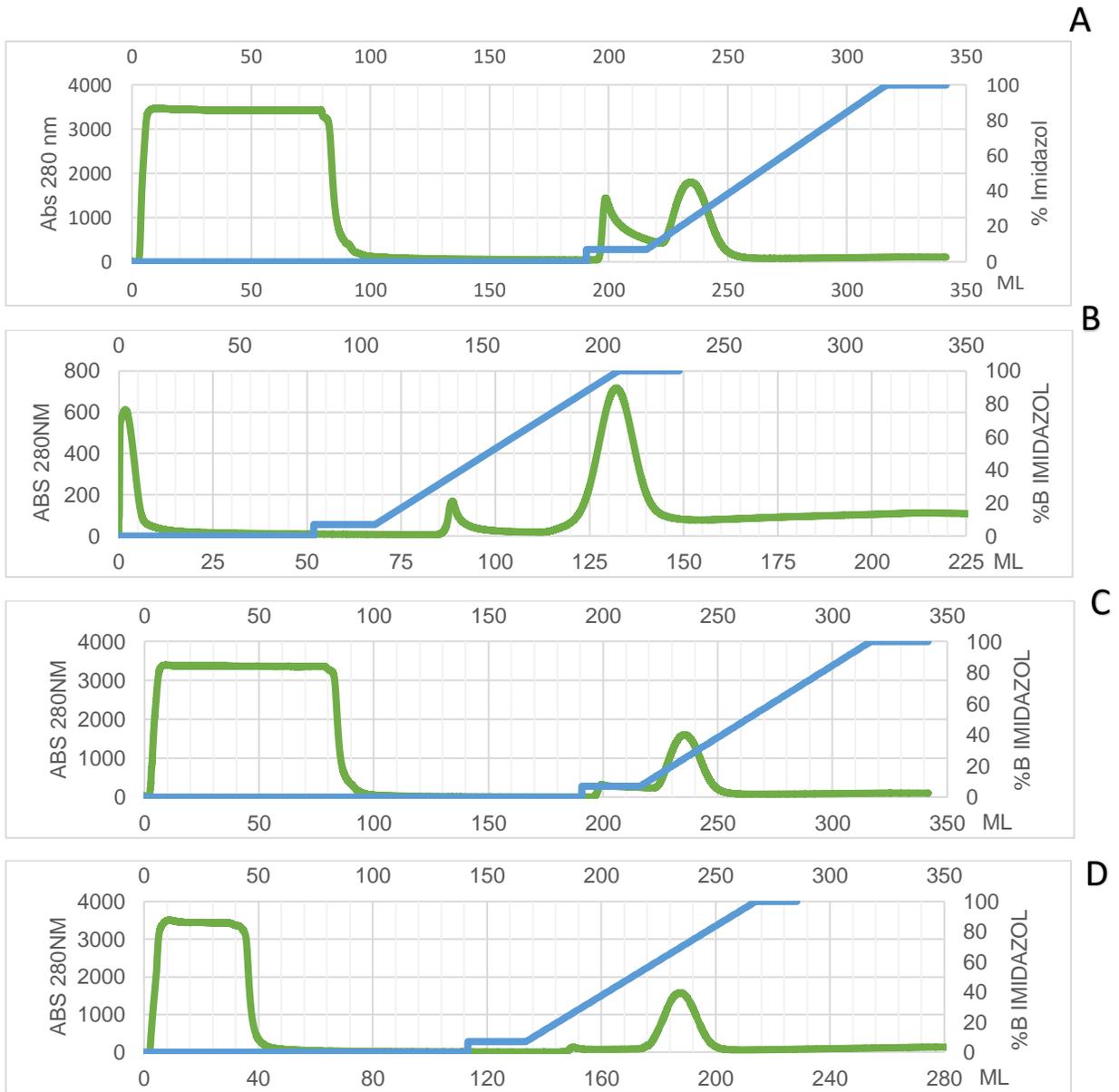


Figura 45 Cromatogramas obtenidos de la purificación de las mutantes de chagasina. A) Chag KK. B) Chag RR, C) Chag RK y D) Chag KR

Tabla 20. Quimeras de 3 epítomos y valores correspondientes de solubilidad.

Quimera	Epítomos			Solubilidad				
				SoDOPE	ProteinSol	SOLart	Aggrescan	Camsol
chagasina	L2	L4	L6	0.8017	0.604	83.2	-92.40	0.543378
Q3E_1	E1	E2	E3	0.7471	0.557	85.6	-63.57	0.4791
Q3E_2	E1	E2	E4	0.6433	0.549	85.6	-44.84	-0.1843
Q3E_3	E1	E2	E5	0.6794	0.523	88.9	-55.96	0.3878
Q3E_4	E1	E3	E2	0.7471	0.557	86.4	-71.64	0.5243
Q3E_5	E1	E3	E4	0.7205	0.579	86.0	-70.76	0.0408
Q3E_6	E1	E3	E5	0.7512	0.567	86.8	-75.67	0.6119
Q3E_7	E1	E4	E2	0.6433	0.549	85.8	-28.29	-0.2259
Q3E_8	E1	E4	E3	0.7205	0.579	86.1	-48.21	-0.0460
Q3E_9	E1	E4	E5	0.6492	0.574	87.9	-46.76	-0.1350
Q3E_10	E1	E5	E2	0.6794	0.523	86.9	-57.15	0.3903
Q3E_11	E1	E5	E3	0.7512	0.567	85.5	-78.88	0.5694
Q3E_12	E1	E5	E4	0.6492	0.574	86.0	-36.21	-0.0911
Q3E_13	E2	E1	E3	0.7471	0.557	86.0	-69.75	0.2685
Q3E_14	E2	E1	E4	0.6433	0.549	86.2	-47.87	-0.3949
Q3E_15	E2	E1	E5	0.6794	0.523	86.9	-62.86	0.1781
Q3E_16	E2	E3	E1	0.7471	0.557	82.9	-83.9654	0.2781
Q3E_17	E2	E3	E4	0.6837	0.557	83.0	-54.94	-0.3369
Q3E_18	E2	E3	E5	0.7172	0.544	85.5	-81.0076	0.2359
Q3E_19	E2	E4	E1	0.6433	0.549	86.5	-56.21	-0.4721
Q3E_20	E2	E4	E3	0.6837	0.557	83.7	-52.46	-0.4236
Q3E_21	E2	E4	E5	0.6085	0.565	85.1	-43.64	-0.5110
Q3E_22	E2	E5	E1	0.6794	0.523	85.9	-62.08	0.1452
Q3E_23	E2	E5	E3	0.7172	0.544	86.4	-75.0754	0.1934
Q3E_24	E2	E5	E4	0.6085	0.565	84.3	-37.42	-0.4671
Q3E_25	E3	E1	E2	0.7471	0.557	84.7	-54.84	0.4632
Q3E_26	E3	E1	E4	0.7205	0.579	84.9	-64.97	-0.0202
Q3E_27	E3	E1	E5	0.7512	0.567	86.8	-56.55	0.5510
Q3E_28	E3	E2	E1	0.7471	0.557	87.5	-70.93	0.4276

Tabla 20. Quimeras de 3 epítomos y valores correspondientes de solubilidad (Continuación).

Quimera	Epítomos			Solubilidad				
	L2	L4	L6	SoDOPE	ProteinSol	SOLart	Aggrescan	Camsol
Q3E_29	E3	E2	E4	0.6837	0.557	83.0	-43.62	-0.1873
Q3E_30	E3	E2	E5	0.7172	0.544	83.7	-58.19	-0.3847
Q3E_31	E3	E4	E1	0.7205	0.579	86.4	-52.88	-0.0974
Q3E_32	E3	E4	E2	0.6837	0.557	83.6	-34.82	-0.2289
Q3E_33	E3	E4	E5	0.689	0.585	86.4	-55.07	-0.1380
Q3E_34	E3	E5	E1	0.7512	0.567	86.4	-70.22	0.5181
Q3E_35	E3	E5	E2	0.7172	0.544	83.0	-55.89	0.3872
Q3E_36	E3	E5	E4	0.689	0.585	82.9	-66.13	-0.0941
Q3E_37	E4	E1	E2	0.6433	0.549	85.4	-38.19	-0.4761
Q3E_38	E4	E1	E3	0.7205	0.579	85.9	-58.19	-0.2962
Q3E_39	E4	E1	E5	0.6492	0.574	89.0	-58.3	-0.3814
Q3E_40	E4	E2	E1	0.6433	0.549	84.2	-43.9	-0.5117
Q3E_41	E4	E2	E3	0.6837	0.557	83.3	-54.83	-0.4632
Q3E_42	E4	E2	E5	0.6085	0.565	85.1	-36.69	-0.5504
Q3E_43	E4	E3	E1	0.7205	0.579	84.3	-71.08	-0.2866
Q3E_44	E4	E3	E2	0.6837	0.557	81.9	-69.45	-0.4181
Q3E_45	E4	E3	E5	0.689	0.585	85.5	-67.97	-0.3264
Q3E_46	E4	E5	E1	0.6492	0.574	86.3	-55.91	-0.4171
Q3E_47	E4	E5	E2	0.6085	0.565	86.3	-43.35	-0.5479
Q3E_48	E4	E5	E3	0.689	0.585	84.1	-55.61	-0.3688
Q3E_49	E5	E1	E2	0.6794	0.523	87.4	-56.70	0.3092
Q3E_50	E5	E1	E3	0.7512	0.567	87.5	-74.13	0.4883
Q3E_51	E5	E1	E4	0.6492	0.574	87.5	-54.22	-0.1722
Q3E_52	E5	E2	E1	0.6794	0.523	88.2	-53.41	0.2738
Q3E_53	E5	E2	E3	0.7172	0.544	85.9	-63.77	0.3220
Q3E_54	E5	E2	E4	0.6085	0.565	84.2	-41.07	-0.3385
Q3E_55	E5	E3	E1	0.7512	0.567	82.8	-90.99	0.4978
Q3E_56	E5	E3	E2	0.7172	0.544	83.3	-77.17	0.3670
Q3E_57	E5	E3	E4	0.689	0.585	84.9	-64.53	-0.1144
Q3E_58	E5	E4	E1	0.6492	0.574	87.9	-43.51	-0.2490
Q3E_59	E5	E4	E2	0.6085	0.565	81.4	-28.23	-0.3799
Q3E_60	E5	E4	E3	0.689	0.585	84.2	-49.32	-0.2008

Tabla 21 Quimeras de 4 epítomos y valores correspondientes de solubilidad.

Quimera	Epítomos				Solubilidad				
	L2	L4-1	L4-2	L6	SoDOPE	Protein sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
chagasina	L2	L4	L4	L6	0.8017	0.604	83.2	-92.40	0.5434
Q4E_1	E1	E2	E3	E4	0.6632	0.571	84.6	-68.2711	-0.0378
Q4E_2	E1	E2	E3	E5	0.6947	0.531	85.2	-65.4961	0.5028
Q4E_3	E1	E2	E4	E3	0.6632	0.571	84.5	-38.4500	-0.0943
Q4E_4	E1	E2	E4	E5	0.5943	0.574	87.0	-46.4386	-0.1788
Q4E_5	E1	E2	E5	E3	0.6947	0.531	84.2	-71.7400	0.5394
Q4E_6	E1	E2	E5	E4	0.5943	0.574	84.2	-39.1207	-0.0860
Q4E_7	E1	E3	E2	E4	0.6632	0.571	85.1	-58.1869	0.0284
Q4E_8	E1	E3	E2	E5	0.6947	0.531	87.9	-77.7309	0.5688
Q4E_9	E1	E3	E4	E2	0.6632	0.571	85.9	-46.8014	-0.0396
Q4E_10	E1	E3	E4	E5	0.6683	0.571	86.4	-56.7463	0.0451
Q4E_11	E1	E3	E5	E2	0.6947	0.531	84.4	-64.7694	0.5883
Q4E_12	E1	E3	E5	E4	0.6683	0.531	87.8	-76.8770	0.1324
Q4E_13	E1	E4	E2	E3	0.6632	0.571	85.3	-46.8797	-0.0800
Q4E_14	E1	E4	E2	E5	0.5943	0.574	84.7	-34.1399	-0.1645
Q4E_15	E1	E4	E3	E2	0.6632	0.571	82.9	-39.6214	-0.0828
Q4E_16	E1	E4	E3	E5	0.6683	0.571	86.6	-82.6115	0.0022
Q4E_17	E1	E4	E5	E2	0.5943	0.574	86.1	-41.3483	-0.1395
Q4E_18	E1	E4	E5	E3	0.6683	0.571	86.7	-58.0989	0.3000
Q4E_19	E1	E5	E2	E3	0.6947	0.531	84.3	-78.2568	0.5367
Q4E_20	E1	E5	E2	E4	0.5943	0.574	86.1	-41.9018	-0.0886
Q4E_21	E1	E5	E3	E2	0.6947	0.531	86.0	-77.2955	0.4971
Q4E_22	E1	E5	E3	E4	0.6683	0.571	87.6	-83.6856	0.0413
Q4E_23	E1	E5	E4	E2	0.5943	0.574	87.7	-40.8537	-0.1497
Q4E_24	E1	E5	E4	E3	0.6683	0.571	87.5	-62.1811	0.0198
Q4E_25	E2	E1	E3	E4	0.6632	0.571	82.3	-56.9406	-0.2419
Q4E_26	E2	E1	E3	E5	0.6947	0.531	85.4	-80.5033	0.2995

Tabla 21. Quimeras de 4 epítomos y valores correspondientes de solubilidad (Continuación).

Quimera	Epítomos				Solubilidad				
	L2	L4-1	L4-2	L6	SoDOPE	Protein sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Q4E_27	E2	E1	E4	E3	0.6632	0.571	85.7	-64.4914	-0.2696
Q4E_28	E2	E1	E4	E5	0.5943	0.574	84.4	-52.5448	-0.3534
Q4E_29	E2	E1	E5	E3	0.6947	0.531	86.0	-71.8839	0.3476
Q4E_30	E2	E1	E5	E4	0.5943	0.574	83.5	-40.2908	-0.2777
Q4E_31	E2	E3	E1	E4	0.6632	0.571	85.4	-80.0613	-0.2213
Q4E_32	E2	E3	E1	E5	0.6947	0.531	82.9	-83.5715	0.3201
Q4E_33	E2	E3	E4	E1	0.6632	0.571	85.4	-53.0364	-0.2727
Q4E_34	E2	E3	E4	E5	0.6326	0.587	84.9	-49.3377	-0.3562
Q4E_35	E2	E3	E5	E1	0.6947	0.531	85.0	-95.5416	0.3561
Q4E_36	E2	E3	E5	E4	0.6326	0.587	81.8	-71.6112	-0.2235
Q4E_37	E2	E4	E1	E3	0.6632	0.571	86.4	-58.4770	-0.3009
Q4E_38	E2	E4	E1	E5	0.5943	0.574	82.8	-48.1515	-0.3846
Q4E_39	E2	E4	E3	E1	0.6632	0.571	85.2	-75.6981	-0.3158
Q4E_40	E2	E4	E3	E5	0.6326	0.587	86.5	-61.6032	-0.3537
Q4E_41	E2	E4	E5	E1	0.5943	0.574	87.4	-47.1097	-0.3710
Q4E_42	E2	E4	E5	E3	0.6326	0.587	86.7	-50.4887	-0.3259
Q4E_43	E2	E5	E1	E3	0.6947	0.531	86.8	-65.0569	0.2799
Q4E_44	E2	E5	E1	E4	0.5943	0.574	85.9	-54.5033	-0.3455
Q4E_45	E2	E5	E3	E1	0.6947	0.531	87.1	-75.0057	0.2650
Q4E_46	E2	E5	E3	E4	0.6326	0.587	85.7	-63.4398	-0.3146
Q4E_47	E2	E5	E4	E1	0.5943	0.574	84.8	-51.3006	-0.3818
Q4E_48	E2	E5	E4	E3	0.6326	0.587	86.2	-66.1627	-0.3361
Q4E_49	E3	E1	E2	E4	0.6632	0.571	84.4	-48.4	-0.0230
Q4E_50	E3	E1	E2	E5	0.6947	0.531	85.2	-54.9307	0.4882
Q4E_51	E3	E1	E4	E2	0.6632	0.571	84.6	-45.47	-0.0853
Q4E_52	E3	E1	E4	E5	0.6683	0.571	85.5	-49.90	-0.0003
Q4E_53	E3	E1	E5	E2	0.6947	0.531	85.1	-58.9068	0.5311

Tabla 21. Quimeras de 4 epítomos y valores correspondientes de solubilidad (Continuación).

Quimera	Epítomos				Solubilidad				
	L2	L4-1	L4-2	L6	SoDOPE	Protein sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Q4E_54	E3	E1	E5	E4	0.6683	0.571	86.6	-60.6761	0.0753
Q4E_55	E3	E2	E1	E4	0.6632	0.571	83.5	-48.6484	-0.0717
Q4E_56	E3	E2	E1	E5	0.6947	0.531	83.8	-55.4917	0.4691
Q4E_57	E3	E2	E4	E1	0.6632	0.571	84.1	-31.7908	-0.1431
Q4E_58	E3	E2	E4	E5	0.6326	0.587	83.7	-32.7582	-0.1817
Q4E_59	E3	E2	E5	E1	0.6947	0.531	84.8	-62.2301	0.4908
Q4E_60	E3	E2	E5	E4	0.6326	0.587	84.2	-40.7835	-0.0888
Q4E_61	E3	E4	E1	E2	0.6632	0.571	85.6	-37.8387	-0.1166
Q4E_62	E3	E4	E1	E5	0.6683	0.571	87.8	-51.0025	-0.0314
Q4E_63	E3	E4	E2	E1	0.6632	0.571	83.8	-49.1318	-0.1278
Q4E_64	E3	E4	E2	E5	0.6326	0.587	84.6	-37.7850	-0.1674
Q4E_65	E3	E4	E5	E1	0.6683	0.571	86.3	-57.2459	-0.0185
Q4E_66	E3	E4	E5	E2	0.6326	0.587	84.3	-40.1624	-0.1424
Q4E_67	E3	E5	E1	E2	0.6947	0.531	85.3	-66.0700	0.4634
Q4E_68	E3	E5	E1	E4	0.6683	0.571	86.5	-59.4992	0.0076
Q4E_69	E3	E5	E2	E1	0.6947	0.531	86.3	-59.8649	0.5176
Q4E_70	E3	E5	E2	E4	0.6326	0.587	82.4	-40.9568	-0.0915
Q4E_71	E3	E5	E4	E1	0.6683	0.571	85.7	-56.1563	-0.0287
Q4E_72	E3	E5	E4	E2	0.6326	0.587	84.1	-44.6139	-0.1526
Q4E_73	E4	E1	E2	E3	0.6632	0.571	86.2	-52.0805	-0.2842
Q4E_74	E4	E1	E2	E5	0.5943	0.574	85.6	-44.4203	-0.3679
Q4E_75	E4	E1	E3	E2	0.6632	0.571	84.1	-56.4077	-0.3188
Q4E_76	E4	E1	E3	E5	0.6683	0.571	85.5	-60.2544	-0.2328
Q4E_77	E4	E1	E5	E2	0.5943	0.574	85.3	-20.3367	-0.3543
Q4E_78	E4	E1	E5	E3	0.6683	0.571	87.3	-57.6967	-0.1847
Q4E_79	E4	E2	E1	E3	0.6632	0.571	82.7	-54.4330	-0.3329
Q4E_80	E4	E2	E1	E5	0.5943	0.574	85.2	-42.0983	-0.4164

Tabla 21. Quimeras de 4 epítomos y valores correspondientes de solubilidad (Continuación).

Quimera	Epítomos				Solubilidad				
	L2	L4-1	L4-2	L6	SoDOPE	Protein sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Q4E_81	E4	E2	E3	E1	0.6632	0.571	81.8	-55.5272	-0.3478
Q4E_82	E4	E2	E3	E5	0.6326	0.587	83.9	-54.6000	-0.3856
Q4E_83	E4	E2	E5	E1	0.5943	0.574	84.9	-54.0898	-0.3947
Q4E_84	E4	E2	E5	E3	0.6326	0.587	84.7	-54.2528	-0.3490
Q4E_85	E4	E3	E1	E2	0.6632	0.571	85.6	-63.2630	-0.2982
Q4E_86	E4	E3	E1	E5	0.6683	0.571	86.7	-70.2607	-0.2123
Q4E_87	E4	E3	E2	E1	0.6632	0.571	83.6	-64.5014	-0.2815
Q4E_88	E4	E3	E2	E5	0.6326	0.587	85.3	-50.6716	-0.3196
Q4E_89	E4	E3	E5	E1	0.6683	0.571	86.0	-77.3987	-0.1762
Q4E_90	E4	E3	E5	E2	0.6326	0.587	83.9	-69.9522	-0.3001
Q4E_91	E4	E5	E1	E2	0.5943	0.574	84.8	-39.8019	-0.4221
Q4E_92	E4	E5	E1	E3	0.6683	0.571	86.3	-58.8214	-0.2525
Q4E_93	E4	E5	E2	E1	0.5943	0.574	86.1	-41.6940	-0.3973
Q4E_94	E4	E5	E2	E3	0.6326	0.587	83.0	-45.9603	-0.3517
Q4E_95	E4	E5	E3	E1	0.6683	0.571	86.8	-64.2262	-0.2674
Q4E_96	E4	E5	E3	E2	0.6326	0.587	85.5	-57.1043	-0.3913
Q4E_97	E5	E1	E2	E3	0.6947	0.531	84.3	-80.1384	0.4582
Q4E_98	E5	E1	E2	E4	0.5943	0.574	86.2	-54.2222	-0.1672
Q4E_99	E5	E1	E3	E2	0.6947	0.531	84.5	-81.5368	0.4236
Q4E_100	E5	E1	E3	E4	0.6683	0.571	87.9	-69.3072	-0.0322
Q4E_101	E5	E1	E4	E2	0.5552	0.574	82.2	-45.5412	-0.2293
Q4E_102	E5	E1	E4	E3	0.6683	0.571	85.6	-63.4069	-0.0597
Q4E_103	E5	E2	E1	E3	0.6947	0.531	82.2	-45.5412	0.4097
Q4E_104	E5	E2	E1	E4	0.5943	0.574	82.5	-37.8448	-0.2157
Q4E_105	E5	E2	E3	E1	0.6947	0.531	84.3	-69.9661	0.3948
Q4E_106	E5	E2	E3	E4	0.6326	0.587	82.8	-55.3265	-0.1849
Q4E_107	E5	E2	E4	E1	0.5943	0.574	85.3	-39.1827	-0.2869

Tabla 21. Quimeras de 4 epítomos y valores correspondientes de solubilidad (Continuación).

Quimera	Epítomos				Solubilidad				
	L2	L4-1	L4-2	L6	SoDOPE	Protein sol	SOLart	Aggrescan	CamSol
Q4E_108	E5	E2	E4	E3	0.6326	0.587	85.0	-53.2138	-0.2412
Q4E_109	E5	E3	E1	E2	0.6947	0.531	87.6	-97.4620	0.4442
Q4E_110	E5	E3	E1	E4	0.6683	0.571	87.9	-71.5171	-0.0116
Q4E_111	E5	E3	E2	E1	0.6947	0.531	82.7	-81.2409	0.4609
Q4E_112	E5	E3	E2	E4	0.6326	0.587	84.9	-65.2890	-0.1189
Q4E_113	E5	E3	E4	E1	0.6683	0.571	83.6	-73.6139	-0.0628
Q4E_114	E5	E3	E4	E2	0.6326	0.587	84.3	-46.6514	-0.1867
Q4E_115	E5	E4	E1	E2	0.5923	0.574	86.3	-32.2725	-0.2605
Q4E_116	E5	E4	E1	E3	0.6683	0.571	88.2	-41.0706	-0.0909
Q4E_117	E5	E4	E2	E1	0.5943	0.574	85.0	-35.0355	-0.2726
Q4E_118	E5	E4	E2	E3	0.6326	0.587	86.0	-45.1895	-0.2269
Q4E_119	E5	E4	E3	E1	0.6683	0.571	85.4	-79.0654	-0.1058
Q4E_120	E5	E4	E3	E2	0.6326	0.587	84.0	-46.1391	-0.2297

METODOLOGÍAS GENERALES

Medios de cultivo utilizados para *E. coli*

LB bajo en sales

- 1.-Pesar 10g de peptona, 5g de extracto de levadura y 5g de NaCl.
- 2.-Disolver los componentes en 800 mL de agua MiliQ
- 3.-Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5N y aforar a 1L con agua MiliQ.
- 4.-Esterilizar por calor húmedo, 121°C, 15 minutos, 15 libras de presión. Dejar enfriar y agregar zeocina a 50 µg/mL. Vaciar el medio en placas Petri y conservar a 4°C.

LB

- 1.-Pesar 10g de peptona, 5g de extracto de levadura y 10 g de NaCl.
- 2.-Disolver los componentes en 800 mL de agua MiliQ
- 3.-Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 5N y aforar a 1L con agua MiliQ.
- 4.-Esterilizar por calor húmedo, 121°C, 15 minutos, 15 libras de presión.

2xTY

- 1.-Pesar 16g de peptona, 10g de extracto de levadura y 5 g de NaCl.
- 2.-Disolver los componentes en 800 mL de agua MiliQ
- 3.-Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N y aforar a 1L con agua MiliQ.
- 4.-Esterilizar por calor húmedo, 121°C, 15 minutos, 15 libras de presión.

Medios de cultivo utilizados para *P. pastoris*

YPD

- 1.-Pesar 10g de extracto de levadura, 20g de extracto de peptona y 20g de glucosa.
- 2.-Disolver los componentes en 800 mL de agua MiliQ y aforar a 1L .
- 3.-Esterilizar por calor húmedo, 121°C, 15 minutos, 15 libras de presión. Dejar enfriar y agregar zeocina a la concentración deseada. Vaciar el medio en placas Petri y conservar a 4°C.

YPDS

- 1.-Pesar 10g de extracto de levadura, 20g de extracto de peptona, 20g de glucosa y 182.2g de sorbitol (1M)
- 2.-Disolver los componentes en 800 mL de agua MiliQ y aforar a 1L .
- 3.-Esterilizar por calor húmedo, 121°C, 15 minutos, 15 libras de presión. Dejar enfriar y agregar zeocina a la concentración deseada. Vaciar el medio en placas Petri y conservar a 4°C.

MDH

- 1.-Esterilizar por calor húmedo 800 mL con 20g de dextrosa.
- 2.-Enfriar a alrededor de 60°C y agregar:
 - 100 mL de 10X YNB (Yeast Nitrogen Base)
 - 2 mL de 500X Biotina
 - 10 mL de 100X Histidina
- 3.-Mezclar y conservar a 4°C

MMH

- 1.-Esterilizar por calor húmedo 800 mL
- 2.-Enfriar a alrededor de 60°C y agregar:
 - 100 mL de 10X YNB (Yeast Nitrogen Base)
 - 2 mL de 500X Biotina
 - 10 mL de 100X Histidina
 - 100mL de 10X Metanol.
- 3.-Mezclar y conservar a 4°C

BMGY

Para 100 mL: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 1% glicerol, 100 mM de Buffer de fosfatos pH 6.0, 1.34% de YNB sin aminoácidos, 4×10^{-5} % de Biotina. Preparar el medio sin Buffer de fosfatos ni biotina, esterilizar por calor húmedo, agregar los componentes y esterilizar por filtración a 0.22 μ m

BMMY

Misma composición que el medio BMGY, solo cambiar el glicerol al 1% por metanol al 0.5%.

Preparación de células competentes de *P. pastoris* para electroporación.

- 1.-Inocular un tubo de 5mL de medio YPD con una colonia proveniente de una placa con *P. pastoris* WT. Incubar 8hrs a 30°C, 200 rpm. Este servirá como preinóculo.
- 2.-Inocular un matraz de 250mL de YPD con 0.5mL del preinóculo. Incubar de 16-18hrs, 30°C, 200 rpm hasta que la D.O sea de 1.3 a 1.5.
- 3.-Centrifugar el medio a 1500g x 5 minutos a 4°C y cosechar las células. De aquí en adelante, todo se debe mantener en hielo.
- 4.-Resuspender el pellet en 250mL de agua fría estéril y centrifugar nuevamente. Desechar el sobrenadante.
- 5.-Repetir el paso 4 con 125mL de agua fría estéril y centrifugar nuevamente.

6.-Resuspender el pellet en 20mL de sorbitol 1M frío y centrifugar. Resuspender en 0.5 mL de sorbitol 1M y alicuotar en viales de 80 μ L. **Mantener las células en hielo y usarlas ese día.**

PCR de colonia para clonas de *P. pastoris*

1 ciclo de 94° C por 2 min (precalentamiento); 25 ciclos de 94° C por 1min (desnaturalización), 55° C por 1 min (alineamiento), 72° C por 1 min (extensión) y 1 ciclo de 72° C por 7 minutos. Finalmente, los productos de PCR se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Buffers

Buffer de transferencia

Tris-HCl 25 mM, 0.2 M de glicina y 20% de metano. pH 8.3. Esterilizar por filtración a 0.22 μ m y resguardar en frasco ambar.

PBS 10 pH 7.4

1.27M de NaCl, 27 mM de KCl, 100 mM de Na_2HPO_4 , 18 mM de KH_2HPO_4 . Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar por calor húmedo.

TBS 1X pH 7.5

Pesar 4.8g de Trizma-base, 58.4g de NaCl, ajustar el pH a 7.5 con HCl, aforar a 2L y filtrar por 0.22 μ m

Buffer de lisis (Buffer A)

50Mm Tris-HCl pH 9.3, 0.5M NaCl, 5 mM de Imidazol, Glicerol 5%, 1 mM de beta mercaptoetanol y un coctel de inhibidores de proteasas

Buffer B

50Mm Tris-HCl pH 9.3, 0.5M NaCl, 500 mM de Imidazol, Glicerol 5%, 1 mM de beta mercaptoetanol y un coctel de inhibidores de proteasas.