

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

“PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE TCCALI DE *TRYPANOSOMA CRUZI* Y ESTUDIO DE SUS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES UTILIZANDO TRIPANOSOMÁTIDOS NO PATOGÉNICOS COMO BIORREACTORES”

Autor: Ferrer, María José. LU: 1045839

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. Mariana Potenza, INGEBI-CONICET

Co-tutor:

Dr. Leandro Göttlein, Universidad Argentina de la Empresa

Marzo 15, 2018



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract.....	6
Abreviaturas.....	7
1. Introducción.....	8
2. Materiales y métodos.....	17
2.1 Cepas de microorganismos utilizadas.....	17
2.1.1 Bacterias.....	17
2.1.2 Parásitos	17
2.2 Plásmidos.....	18
2.3 Medios y soluciones empleados	20
2.3.1 Medios.....	20
2.3.2 Soluciones	21
2.4 Anticuerpos.....	22
2.4.1 Anticuerpos primarios.....	22
2.4.2 Anticuerpos secundarios	22
2.5 Técnicas generales de Biología Molecular	22
2.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR.....	22
2.5.2 Purificación de Ácidos Nucleicos	23
2.5.3 Digestión de ADN con enzimas de restricción	24
2.5.4 Preparación y purificación de vectores recombinantes.....	24
A. Mini-preparación de ADN plasmídico	24
B. Midi-preparación de ADN plasmídico.	25
2.5.5 Electroforesis en geles de agarosa	25
2.5.6 Cuantificación de Ácidos Nucleicos	26
2.5.7 Reacciones de ligación de Ácidos Nucleicos.....	26
2.5.8 Secuenciación automática de ácidos nucleicos	26

2.5.9	Preparación de bacterias competentes.....	27
2.6	Clonado del fragmento que codifica para TcCALI en vectores de clonado.....	27
2.6.1	Armado del vector pZERO-TcCALI y transformación de bacterias DH5 α	27
2.6.2	Análisis de las bacterias transformantes	28
2.7	Clonado del fragmento que codifica para TcCALI en vectores de expresión	28
2.7.1	Armado de los plásmidos pLEXSYS-TcCALI	28
2.7.2	Transformación de bacterias Sure2.....	29
2.7.3	Análisis de bacterias transformantes.....	29
2.8	Generación de cepas de <i>L. tarentolae</i> recombinantes	30
2.8.1	Preparación de los plásmidos transfectantes	30
2.8.2	Transfección y selección de Parásitos.....	30
2.9	Estudio de la sobre-expresión de la proteína TcCALI-6xHis.....	31
2.9.1	Preparación de las muestras	31
2.9.2	Transferencia a membranas de nitrocelulosa y ensayos de Western blot.....	31
2.10	Purificación de la proteína recombinante TcCALI-6xHis en columna de Níquel-Agarosa (Ni-NTA-Agarosa)	32
2.10.1	Preparación de lisados clarificados	32
2.10.2	Optimización de la purificación	33
2.11	Estudio de modificaciones post-traduccionales de la proteína TcCALI.....	33
3.	Resultados.....	35
3.1	Obtención de plásmidos recombinantes para la expresión de TcCALI en <i>L. tarentolae</i>	35
3.2	Expresión y purificación de la TcCALI-6xHis recombinante	42
3.3	Análisis de palmitoilación de TcCALI	49
4.	Discusión	51
	Bibliografía.....	55

Agradecimientos

La presente tesina de Licenciatura es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas, leyendo, opinando, corrigiendo, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco especialmente a la Dra. Mariana Potenza, por haber confiado en mí, introduciéndome al mundo de los tripanosomátidos y por acompañarme en este camino, por la paciencia y la lectura y re-lectura miles de veces de este trabajo. Y a la Dra. María Teresa Téllez, por permitirme ser parte de su laboratorio.

Por último también agradezco al instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. H. Torres” (INGEBI-CONICET), por brindar tanto el espacio físico como los instrumentos para la realización de esta Tesina de Licenciatura.

Resumen

El protozoo *Trypanosoma cruzi*, es el patógeno causal de la enfermedad de Chagas. Este parásito posee un ciclo de vida complejo, que involucra tanto hospedadores vertebrados como invertebrados. Al igual que en otros organismos, en *T. cruzi* las variaciones en los niveles de calcio intracelular juegan un rol fundamental tanto en la diferenciación como en la infección. Aún no existen vacunas que protejan contra la infección de *T. cruzi* y la quimioterapia disponible es limitada. Por lo tanto, la caracterización bioquímica de nuevas proteínas de unión a calcio permite definir rutas o actividades metabólicas propias de este patógeno, que pueden ser utilizadas como nuevos blancos quimioterapéuticos.

El objetivo general de este trabajo de Licenciatura es la construcción de una herramienta que permita estudiar una proteína de función desconocida, denominada TcCALI, expresada en *T. cruzi*. Se ha determinado que TcCALI se expresa en las formas infectivas y no infectivas del *T. cruzi*. Su secuencia muestra dos dominios putativos de unión a calcio y un sitio de palmitoilación. Para el desarrollo de este trabajo, se propuso la sobre-expresión de TcCALI recombinante en un sistema basado en el tripanosomátido no patogénico *L. tarentolae* (Sistema LEXSY). Se propuso también la caracterización de ciertas modificaciones post-traduccionales de la proteína recombinante obtenida. Utilizando técnicas de ingeniería genética, se logró obtener los vectores recombinantes para la expresión de TcCALI fusionada a una etiqueta de 6 histidinas (TcCALI-6xHis). A partir de este material, se obtuvieron cultivos transgénicos de *L. tarentolae* que sobre-expresan de forma inducible o constitutiva TcCALI-6xHis. Se evaluó la utilidad de resinas de Níquel-Agarosa como técnica de purificación por afinidad de TcCALI-His proveniente de extractos proteicos de cultivos *L. tarentolae* recombinantes. Se llevaron a cabo distintas variaciones de un protocolo inicial de purificación, haciendo cada vez más estrictas las condiciones de unión y lavados de la resina. Se utilizó un ensayo comercial para determinar si TcCALI-His expresada en *L. tarentolae* es modificada por la adición de residuos de ácido palmítico a las cisteínas de su secuencia.

Con el desarrollo de este trabajo, se avanzó en la optimización de un sistema de expresión eucariota novedoso, con características que lo distinguen de otros sistemas de producción de proteínas, y se evaluó su aplicación al estudio de propiedades bioquímicas de TcCALI.

Abstract

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causal pathogen of Chagas disease. This parasite has a complex life cycle, which involves both vertebrate and invertebrate hosts. As it occurs in other organisms, the variations in intracellular calcium levels play a fundamental role in *T. cruzi* differentiation and infection. There are no vaccines that protect against *T. cruzi* infection and the available chemotherapy has its limitations. Therefore, the biochemical characterization of novel calcium binding proteins would allow defining unique metabolic routes for this pathogen, which can be used as new chemotherapeutic targets.

The main objective in this work is the establishment of tools which allow studying a protein of unknown function, named TcCALI, expressed in *T. cruzi*. Previously, it was determined that TcCALI is expressed in both *T. cruzi* infective and non-infective forms. TcCALI has two putative calcium binding domains and one palmitoylation site in its amino acid sequence. In this work, it was proposed the use of a non-pathogenic, *L. tarentolae* trypanosomatid cells as bioreactors to over-express recombinant TcCALI (LEXSY system). It was also proposed the analysis of post-translational modifications present on recombinant TcCALI.

Using genetic engineering, it was built recombinant vectors for the expression of TcCALI fused to a 6 histidine tag (TcCALI-6xHis). From these plasmids, transgenic *L. tarentolae* cultures which over-express (constitutive or inducible), TcCALI-6xHis were obtained. The technique based on Nickel-Agarose resin was evaluated as affinity purification of TcCALI-6xHis from protein extracts of transgenic *L. tarentolae*. Different variations of an initial purification protocol were carried out, increasing the ionic strength of binding and washing steps. A commercial assay was used to determine if TcCALI from *L. tarentolae* was modified by the addition of palmitic acid to the cysteine residues of its sequence.

Along this work, a novel eukaryotic expression system was evaluated and optimized, as well as its application to the study of the biochemical properties of TcCALI.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

LAC: Lactosa

µg: microgramos

µl: microlitros

SDS: dodecilsulfato sódico.

dNTPs: mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP

dATP: deoxiribonucleotido adenina trifosfato

dTTP: deoxiribonucleotido timina trifosfato

dGTP: deoxiribonucleotido guanina trifosfato

dCTP: deoxiribonucleotido citosina trifosfato

kDa: kilo Dalton

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

NaCl: cloruro de sodio

APS: persulfato amónico

1. Introducción

El desarrollo de esta tesis se enmarca dentro de una línea de trabajo previamente establecida, que abarca el estudio y caracterización de una proteína de función desconocida denominada TcCALI, expresada en el parásito *Trypanosoma cruzi*.

El *T. cruzi* es el patógeno causal de la enfermedad de Chagas, una zoonosis que afecta a 6-7 millones de personas en todo el mundo, mayormente en América Latina, donde es endémica (*Organización Mundial de la Salud, 2017*). En Argentina, la consecuencia más severa de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica, que se desarrolla en el 30% de los infectados.

El *T. cruzi* posee un ciclo de vida complejo que involucra tanto a los hospedadores vertebrados como a los invertebrados (Fig. 1), en tres etapas de desarrollo bien definidas: la forma amastigote no flagelada (se encuentra dentro de las células hospedadoras de los vertebrados) y las formas flageladas epimastigote (se encuentra en el intestino del hospedador) y tripomastigote (altamente infeccioso y se originan de los amastigotes al final del ciclo intracelular después de su liberación en el espacio intercelular y en el torrente sanguíneo) (*Teixeira et al. 2012*). Las mismas difieren en el hospedador que ocupan y en sus características replicativas y de localización.

Los parásitos circulantes en la sangre del hospedador vertebrado se encuentran principalmente en el estadio tripomastigote sanguíneo, forma no reproductiva, alargada y con el kinetoplasto posterior al núcleo. El ciclo comienza cuando un insecto Triatoma (vulgarmente llamado Vinchuca), se alimenta del hospedador infectado, estas formas parasitarias son ingeridas con la sangre y atraviesan todo el sistema digestivo del insecto. En el estómago se diferencian a epimastigotes, formas proliferativas que se multiplican activamente y luego de migrar hacia el intestino medio, se unen a la membrana perimicrobiliar (*García et al. 2010*). En este estadio se diferencian posteriormente a tripomastigotes metacíclicos, formas no replicativas infecciosas que luego, en el intestino posterior y recto, entran en contacto con las heces y se liberan mediante defecación. La contaminación con las heces del insecto en la región de la mordida, por contacto con las mucosas o epitelio del mamífero, llevan a la infección.

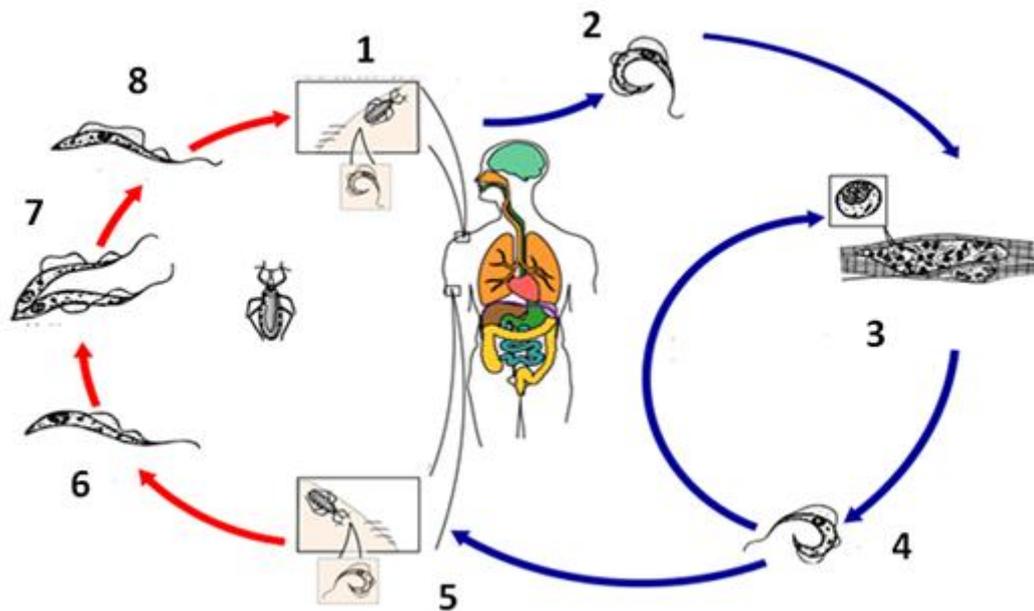


Figura 1: ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El insecto se alimenta de sangre y deposita tripomastigotes metacíclicos en las heces que ingresan al hospedador (1). Estos invaden células en el sitio de la picadura y se diferencian a amastigotes (2). Los amastigotes se dividen por fisión binaria (3) y algunos se diferencian a tripomastigotes, pasando al torrente sanguíneo (4), donde pueden infectar nuevas células y volver a (3). Un insecto ingiere sangre con tripomastigotes (5), que se transforman en epimastigotes (6) y se dividen en la sección media del intestino (7). Los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en la sección final del intestino (8). Extraída de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

No se dispone aún de vacunas que protejan contra la infección con el parásito *T. cruzi*. La prevención de la enfermedad de Chagas se basa en el control del insecto vector que transmite el parásito al hospedador humano (en Argentina estos se conocen vulgarmente como vinchucas). Una vez establecida la infección por *T. cruzi*, la quimioterapia es la estrategia de tratamiento más importante. La limitación principal de las drogas actualmente utilizadas es su baja actividad antiparasitaria en la forma crónica de la enfermedad (Urbina, 2009), así como los efectos adversos que pueden derivar en la interrupción del tratamiento (Rassi et al. 2010). La investigación básica puede contribuir al desarrollo de drogas más eficientes y seguras, mediante el estudio de procesos biológicos esenciales para la supervivencia del parásito.

Al igual que en otros organismos, en *T. cruzi* las variaciones en los niveles de calcio intracelular juegan un rol fundamental en procesos claves como la diferenciación hacia distintas formas y la infección a células de mamífero (Hashimoto *et al.* 2015). Sin embargo, poco se conoce acerca de las proteínas que decodifican y traducen estas señales mediante su asociación con este ión (Clapham, 2007). Por lo tanto, la caracterización funcional de nuevas proteínas de unión a calcio no sólo incrementa el conocimiento de la biología del parásito, sino que también permite definir nuevas rutas o actividades metabólicas propias de este patógeno.

Uno de los proyectos del laboratorio propone dilucidar cuál es la función de una proteína hipotética de 103 aminoácidos con dominios de unión a calcio de *T. cruzi*, denominada TcCALI (Fig. 2). Esta proteína se expresa en las formas infectivas y no infectivas del parásito, pero su función biológica es desconocida (Queiroz *et al.* 2014). Entre otras estrategias, se plantea caracterizar bioquímicamente TcCALI. El análisis de la secuencia de TcCALI muestra dos dominios putativos de unión a calcio y un sitio de palmitoilación.

Los dos dominios de unión a Ca^{2+} del tipo *EF-hand* se encuentran ampliamente distribuidos en las proteínas que se asocian al ión calcio. Esta asociación puede funcionar como reserva de calcio por parte de la proteína, o también como un mecanismo para regular la función de la misma (Denessiouk *et al.* 2014). TcCALI posee dos dominios del tipo *EF-hand* según homología de su secuencia, pero dicha característica no ha sido demostrada experimentalmente.

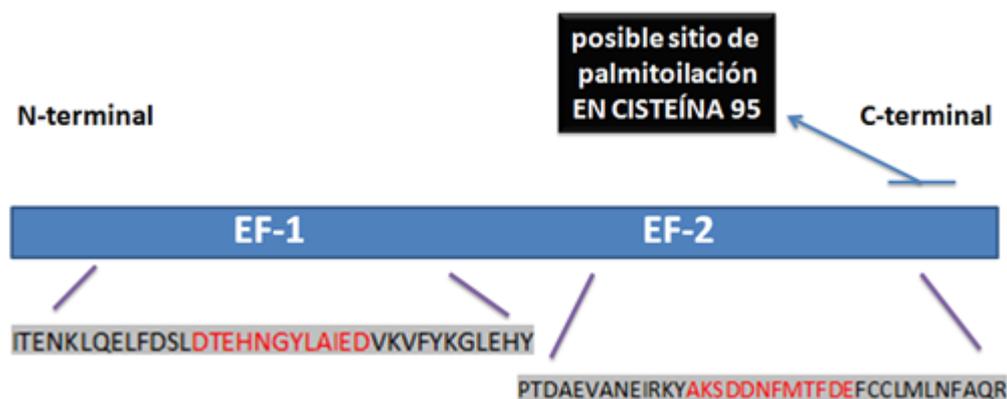


Figura 2: Esquema de la proteína TcCALI y sus principales características. Se describe la secuencia de los aminoácidos que conforman dos dominios de unión a calcio de su secuencia (EF-1 y EF-2), así como también el sitio putativo de palmitoilación.

Por otro lado, según predicción de programas de bioinformática, la secuencia TcCALI posee dos residuos de cisteína adyacentes en las posiciones 95 y 96 de su secuencia (Potenza *et al.* 2015; Potenza *et al.* 2016, presentaciones Reunión Científica). La palmitoilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales enzimáticas reversibles más importantes que se produce en todos los eucariotas. Esto se debe principalmente a su importante papel en la regulación del transporte, modificación de la estructura y determinación de la función de las proteínas (funcionamiento), al afectar su asociación con las membranas y la estabilidad (Tabaczar *et al.* 2017). Esta modificación consiste en la unión covalente, potencialmente reversible, de un ácido palmítico (de 16 átomos de carbono) a un residuo/s de cisteína específico de proteínas a través de un enlace tioéster (Fig. 3). Este proceso se denomina S-palmitoilación.

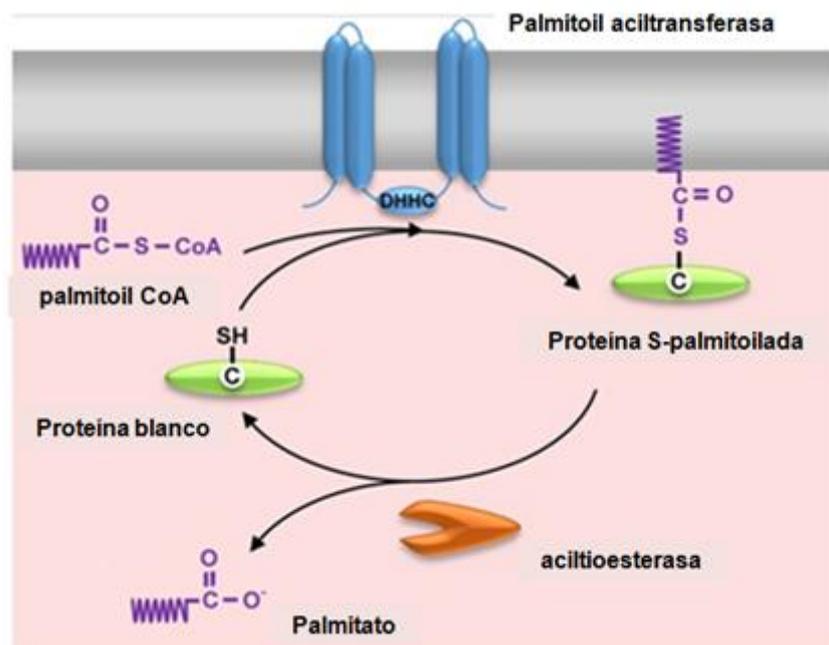


Figura 3: Esquema representativo de S-palmitoilación de una proteína. El ácido palmítico se transfiere al grupo tiol de la cisteína en la proteína blanco mediante las palmitoil aciltransferasas. Después de la S-palmitoilación, las proteínas citosólicas obtienen un extremo hidrofóbico que le permite anclarse en la membrana. Las proteínas se depalmitoilan por acción de aciltioesterasas y se translocan al citosol. Adaptado de Sobocińska *et al.* 2018.

Los sustratos de S-palmitoilación pueden ser proteínas solubles o de membrana. En el primer caso, esta modificación le permite a las proteínas la asociación con membranas específicas afectando así la localización y la función (Cuiffo & Ren, 2010). En cambio, la

palmitoilación de proteínas de membrana afecta la conformación proteica, la localización, y la interacción con dominios lipídicos y otras proteínas. Como consecuencia, altera la función proteica como las propiedades de transporte, adhesión, señalización o propiedades fusogénicas (Blaskovic *et al.* 2014).

Para llevar a cabo la determinación experimental de las características de TcCALI predichas *in silico*, se requiere de la proteína en forma pura y en cantidades del orden de los miligramos. Una forma de obtener este material es por medio de la sobre-expresión en un sistema heterólogo. Gracias al conocimiento y capacidades adquiridas en las últimas décadas sobre la manipulación genética de distintos organismos, se dispone de un número considerable de sistemas para la producción de proteínas y péptidos recombinantes (Berlec y Strukelj, 2013; Merlin *et al.* 2014). Estos sistemas incluyen la producción de moléculas recombinantes en organismos procariotas (p ej. *Escherichia coli*), eucariotas (células de mamífero, plantas, levaduras, animales transgénicos, etc.), así como también en sistemas libres de células (Zemella *et al.* 2015). Los sistemas de expresión procariota tales como *E. coli* es uno de los más convenientes debido a su alto rendimiento de producción y una fácil manipulación de cultivo. Sin embargo, carecen de componentes esenciales para el plegamiento y la modificación de proteínas post-traduccionales y, por lo tanto, tienen sus limitaciones (Baeshen *et al.* 2015). Por otro lado, los sistemas de expresión eucariota alternativos basados en células de mamíferos o insectos requieren largos ciclos de desarrollo y producen bajos rendimientos de proteínas, dando como resultado costos que son magnitudes superiores a las de las proteínas producidas por *E. coli*. Existen también sistemas de expresión en levaduras (Ahmad *et al.* 2014) o plantas (Yao *et al.* 2015), que aunque disponen de la maquinaria para llevar a cabo estas modificaciones post-traduccionales, el perfil de glicosilación difiere del de las demás células eucariotas.

Dado que el desarrollo de este trabajo requiere de la disposición de un sistema de expresión que posea las modificaciones post-traduccionales propias de esta familia de organismos, se decidió emplear un sistema de expresión de proteínas basado en el tripanosomátido no patógeno *Leishmania tarentolae*.

L. tarentolae es un organismo eucariota flagelado, unicelular, de alrededor de 5 x 15 µm de tamaño (Fig. 4) que parasita únicamente lagartijas comunes como *Tarentola annularis* o *Tarentola mauritanica*. Este microorganismo es hospedador en el sistema de expresión

LEXSY, plataforma ofrecida por la empresa Jena Bioscience. Una de las ventajas de utilizar este sistema es que *L. tarentolae* posee una maquinaria de modificación post-traduccional necesaria para que la proteína de interés sea expresada de forma activa y con las modificaciones post-traduccionales propias de un eucariota. Además, *L. tarentolae* es de fácil manipulación (crece en medio líquido) y al ser un organismo no patogénico para humanos su uso está completamente aprobado en laboratorios de nivel de bioseguridad 1 (S1).

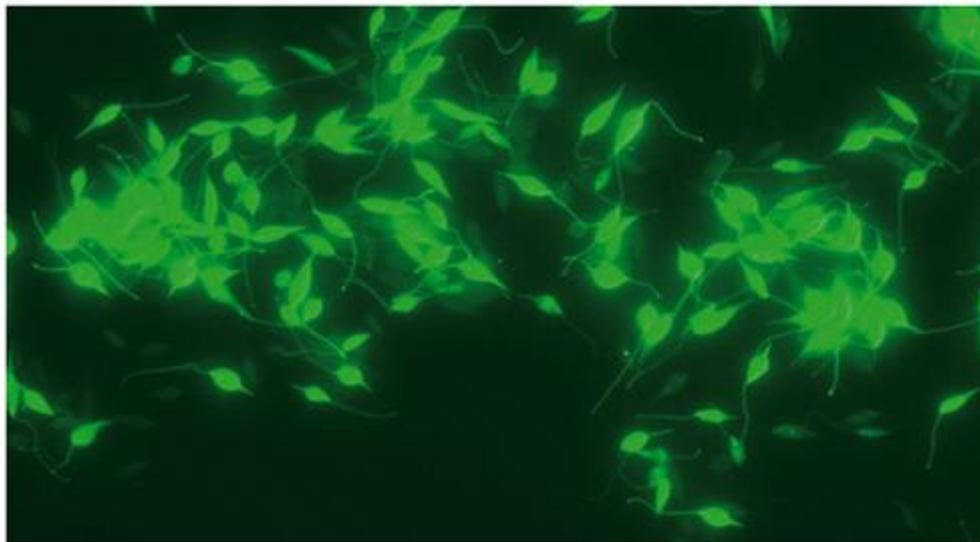


Figura 4: Cultivo de células de *L. tarentolae* que expresan proteína verde fluorescente fotografiadas al microscopio.

En el sistema LEXSY la expresión de proteínas en *L. tarentolae* está disponible en dos configuraciones principales: constitutiva (Breitling *et al.* 2002) o inducible (Kushnir *et al.* 2005). En ambas, las proteínas recombinantes pueden expresarse intracelularmente o secretarse en el medio de cultivo. En este sistema, los cultivos de *L. tarentolae* pueden transfectarse eficientemente por electroporación con los vectores de expresión recombinantes y la selección de transfectantes se realiza por adición del antibiótico de selección. La obtención de cultivos transgénicos se puede hacer de forma policlonal (crecimiento en suspensión en medio líquido) o clonal (sembrado de las células en medios de selección sólidos), utilizando genes de resistencia a antibióticos (Basile *et al.* 2009).

La figura 5 muestra el esquema general de algunos vectores de expresión utilizados en este sistema. Dependiendo de las enzimas de restricción utilizadas, el gen de interés puede o no fusionarse con un péptido señal que expresará una proteína secretada al medio de cultivo.

Esta estrategia se recomienda para la expresión de proteínas tóxicas que inhiben la proliferación de los parásitos, y por lo tanto reducen el rendimiento.

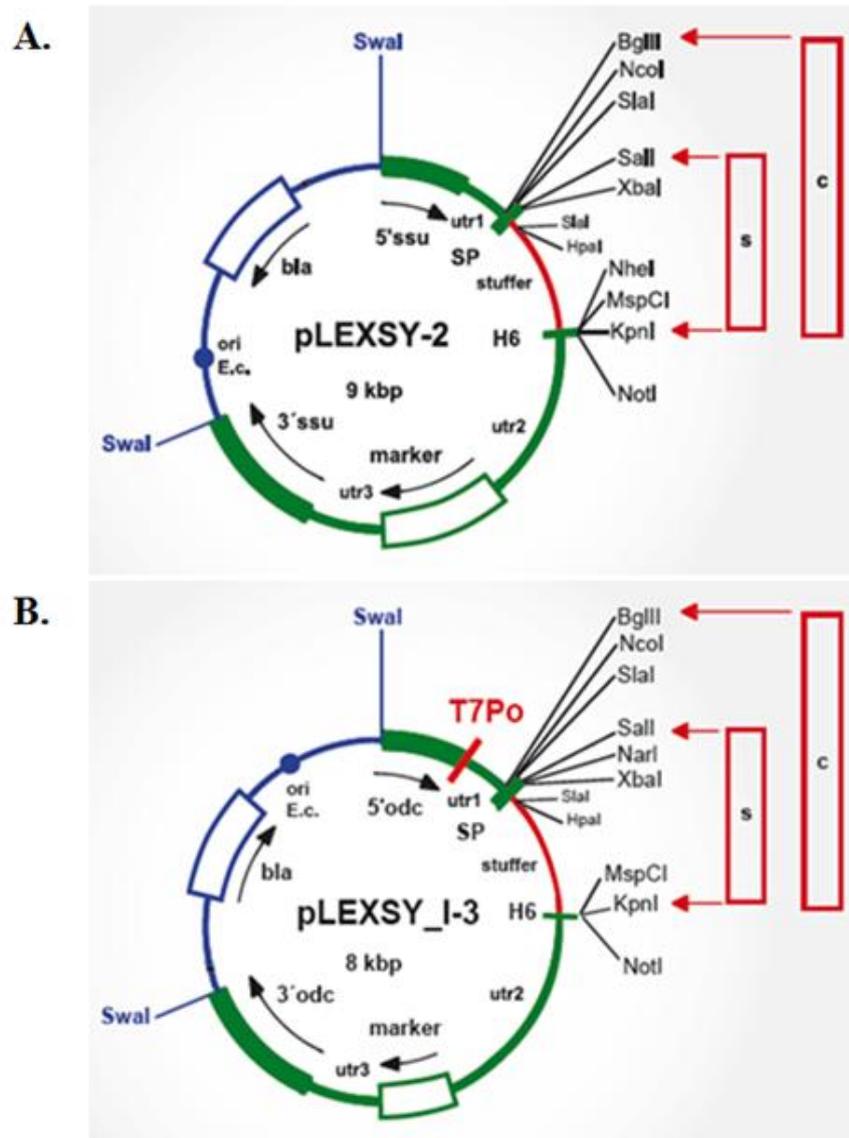


Figura 5: Mapas de la familia de vectores *pLEXSY* integrativos para la expresión constitutiva (A) o inducible (B). 5' y 3' ssu o 5' y 3' odc: son regiones para la recombinación homóloga en el cromosoma de *L. tarentolae* luego de la electroporación con el plásmido de expresión lineal, previa digestión con enzima de restricción *Swal*. Utr1, utr2 y utr3: son regiones no traducidas que flanquean genes y proporcionan las señales de *splicing* para el procesamiento post-transcripcional del mRNA para la expresión, tanto de genes que codifican a la proteína de interés y los marcadores de selección. SP: péptido señal de la fosfatasa ácida secretada por *L. mexicana* *LMSAP1* (Wiese *et al.* 1995) y H6: tramo hexa-histidina. Las estrategias de clonación alternativas dan como resultado la expresión citosólica (c) o secretora (s) de las proteínas recombinantes.

El sistema LEXSY de expresión constitutiva dispone de distintos vectores de expresión que difieren solo en el marcador de resistencia a antibióticos, que permite la posterior selección. Estos vectores están diseñados para su integración por recombinación homologa en el locus *ssu* cromosómico que codifica para genes 18S ribosomales rRNA de *L. tarentolae* (Fig. 6). Una vez que ocurre la inserción de este casete en el genoma, los genes de interés son transcritos por la ARN polimerasa I del parásito.

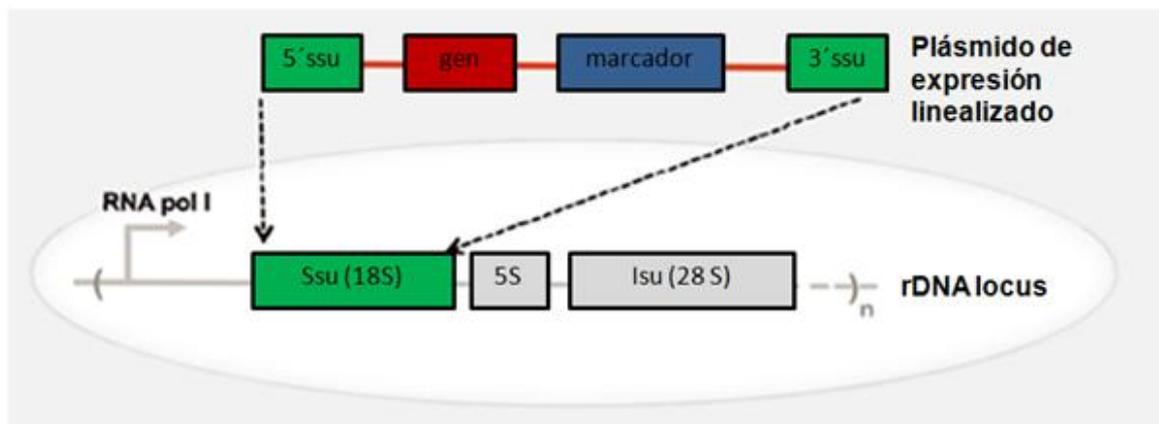


Figura 6: Arquitectura del sistema LEXSY constitutivo. 5' y 3' ssu: regiones para la recombinación homóloga en el cromosoma del huésped después de la linealización del plásmido de expresión con *SwaI*. En bloque rojo: gen clonado destinado a la expresión. Bloque azul: gen que otorga la resistencia al antibiótico marcador de selección. RNA pol I: ARN polimerasa responsable de la transcripción de los genes de interés. 5s y 28s: locus ribosomal.

En el sistema LEXSY de expresión inducible (Fig. 7) la expresión del gen de interés está regulada y activada mediante la adición de un inductor (Tetraciclina). Para esto es necesario utilizar una cepa de *L. tarentolae* modificada genéticamente que exprese constitutivamente el gen de la T7 RNA polimerasa y la proteína represora TET (TR). A su vez, es necesario transfectar estos parásitos con un vector lineal que contenga el gen exógeno posicionado río abajo de un segmento compuesto por el promotor T7 (Po) y el operón TET (*Orth et al., 2000; Tabor, 2001*). De esta manera, la transcripción del gen exógeno está gobernada por la adición del antibiótico tetraciclina, que desplaza a la proteína represora TR y permite la actividad de la RNA polimerasa T7. Estas características permiten utilizar el sistema para la expresión de proteínas de otros tripanosomátidos patógenos, particularmente aquellas que por su toxicidad son difíciles de obtener con sistemas constitutivos de expresión.

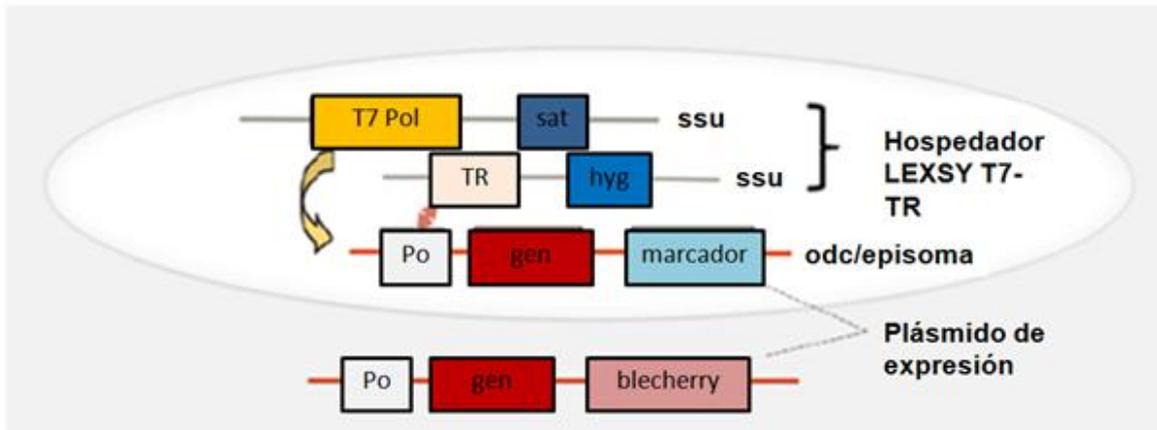


Figura 7: Arquitectura de LEXSY inducible. El huésped LEXSY T7-TR modificado por ingeniería genética expresa la ARN polimerasa T7 bacteriana (T7 pol) y el represor TET. Blecherry, Sat e Hyg: gen de resistencia a antibióticos.

El objetivo general de esta tesina de licenciatura es obtener una herramienta para avanzar en el estudio y caracterización funcional de la proteína TcCALI de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Para su desarrollo se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Clonado del fragmento que codifica para TcCALI en vectores de expresión constitutivos e inducibles del sistema *pLEXSYs*, específicos para *L. tarentolae*.
2. Obtener líneas celulares transgénicas de *L. tarentolae* que sobre-expresen la proteína recombinante TcCALI fusionada a una etiqueta de histidinas (TcCALI-6xHis).
3. Caracterizar las modificaciones post-traduccionales de la proteína TcCALI-6xHis recombinante: Estudiar la presencia de ácido palmítico en extractos proteicos de *L. tarentolae* recombinante generadas en los apartados anteriores.

2. Materiales y métodos

2.1 Cepas de microorganismos utilizadas

2.1.1 Bacterias

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 α (F $^-$ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^-$, mK $^+$) *phoA supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1* – Thermo Fisher Scientific) y *Sure2* (*endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14-* Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 F $^+$ [*proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15 Tn10 Amy Cm^R - Stratagene).

Las bacterias *Sure2* se diseñaron para clonar fácilmente el ADN Eucariota, eliminando los genes de *E. coli* implicados en la transposición y eliminación del ADN. El sistema de reparación UV (*uvrC*) y la vía de reparación SOS (*umuC*) están involucrados en la reparación de lesiones de ADN. La eliminación de estos genes da como resultado un aumento de 10 a 20 veces en la estabilidad del ADN foráneo. Las proteínas SbcC y RecJ de *E. coli*, están involucradas en ciertos tipos de recombinación. Las mutaciones en estos genes aumentan en gran medida la estabilidad de las estructuras de ADN Eucariota. La combinación de mutaciones *recB* y *recJ* confiere un fenotipo de deficiencia de recombinación a las células *Sure2*, reduciendo en gran medida la recombinación homóloga, similar a una mutación en el gen *recA*, aumentando a su vez la estabilidad del ADN foráneo dentro de las células. Las mutaciones de estos genes se lleva a cabo mediante una inserción de los transposones Tn10 y Tn5, confiriéndole a la bacteria resistencia a los antibióticos Tetraciclina, Kanamicina y Cloranfenicol.

2.1.2 Parásitos

Se utilizaron dos cepas de *Leishmania tarentolae*, una salvaje (denominada comúnmente *Wilde type* o WT, por sus siglas en inglés) y otra denominada T7R, para la expresión constitutiva e inducible, respectivamente, de los genes de interés. El mantenimiento de los cultivos de parásitos se realizó por medio de diluciones 1:20 o 1:50

cada tres o cuatro días, según la densidad de crecimiento, en medio apropiado en estufa a 28 °C.

2.2 Plásmidos

Se utilizó el plásmido pZEROTM 2.1 (Invitrogen, Estados Unidos) para el clonado del fragmento que codifica para TcCALI. Este vector contiene un gen quimérico letal para la bacteria denominado ccdB (por sus iniciales en inglés de “gen de control de muerte celular”) fusionado al promotor Plac de transcripción procariota (Bernard *et al.* 1994). El sitio múltiple de clonado se encuentra entre el promotor y el gen quimérico letal (LacZ α -ccdB). De esta manera, la inserción de un fragmento de ADN anula la expresión del gen quimérico LacZ α -ccdB, permitiendo el crecimiento de bacterias que contengan el vector recombinante. Por otro lado, se inhibe el crecimiento de las células que contienen vectores no recombinantes, es decir, donde LacZ α -ccdB no está interrumpido. A su vez, contiene un gen que le confiere resistencia al antibiótico Kanamicina (Fig. 8).

Para la expresión de TcCALI en *L. tarentolae* se utilizaron los plásmidos *pLEXSY-hyg2* o *pLEXSY-ble3* (Jena Bioscience, Alemania). *pLEXSY-hyg2* es un vector de expresión constitutiva que posee el gen que codifica para la enzima Higromicina fosfotransferasa, confiriéndole resistencia al antibiótico Higromicina (Hyg) (Fig. 9A). *pLEXSY-ble3* es un vector de expresión inducible, por el agregado del antibiótico Tetraciclina al medio de cultivo. Posee además un gen que le confiere resistencia a Bleomicina (Ble) (Fig. 9B).

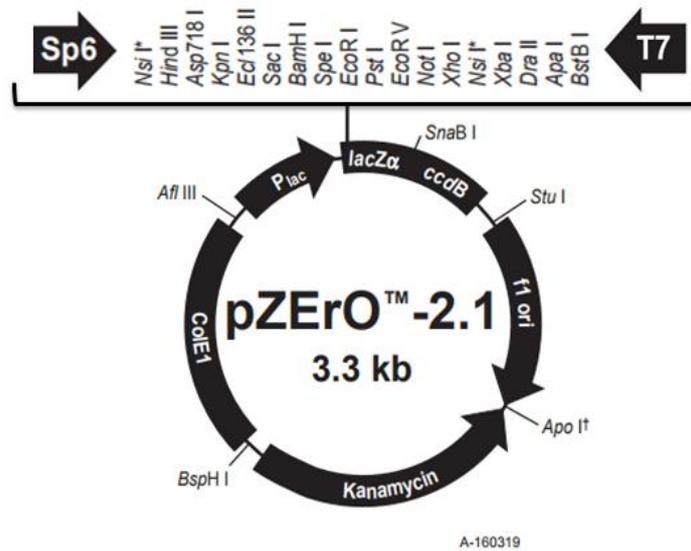


Figura 8: Estructura del vector de clonado pZERO 2.1. Se indica el sitio múltiple clonado y la organización de los genes que le confieren sus principales características, representados por rectángulos negros.

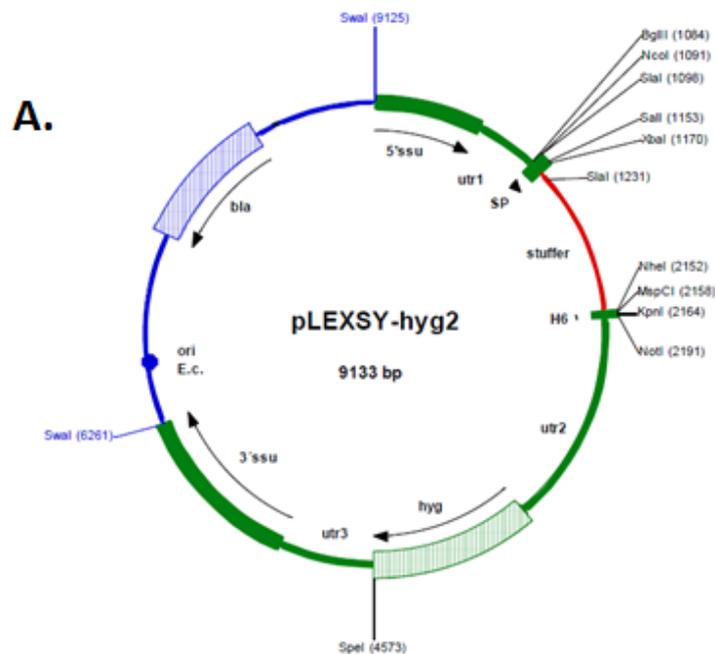


Figura 9: Estructura de los vectores de expresión pLEXY-hyg2 (A) y pLEXY-ble3 (B). Se indican el sitio de múltiple clonado, las regiones de integración al genoma de *L. tarentolae* (rectángulos verdes) y las secuencias necesarias para su amplificación en bacterias (línea azul). El rectángulo rayado azul indica el gen de resistencia al antibiótico Ampicilina, necesario para la selección de los vectores recombinantes en *E. coli*.

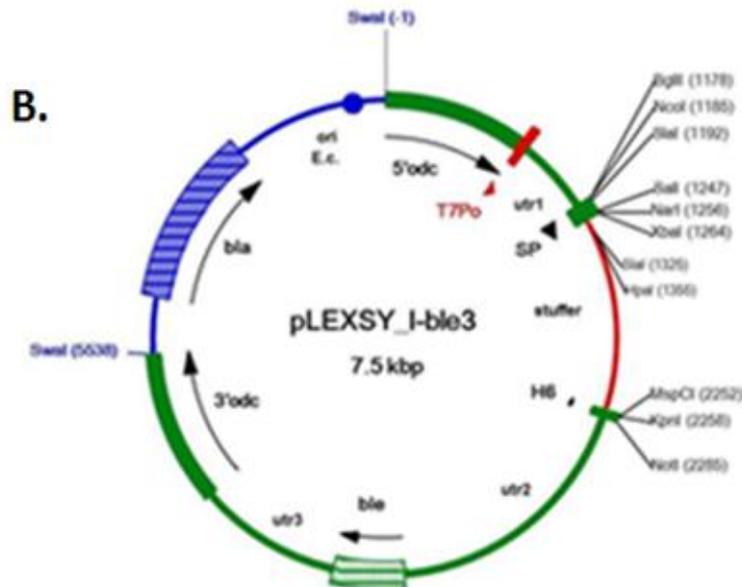


Figura 9 (continua de página anterior): Estructura de los vectores de expresión *pLEXSY-hyg2* (A) y *pLEXSY-ble3* (B). Se indican el sitio de múltiple clonado, las regiones de integración al genoma de *L. tarentolae* (rectángulos verdes) y las secuencias necesarias para su amplificación en bacterias (línea azul). El rectángulo rayado azul indica el gen de resistencia al antibiótico Ampicilina, necesario para la selección de los vectores recombinantes en *E. coli*.

2.3 Medios y soluciones empleados

2.3.1 Medios

LB (Luria Bertani): 10g/l Bacto-Triptona, 5 g/l Extracto de Levadura, 10 g/l NaCl, pH 7.5

LB Agar: 10 g/l Bacto-Triptona, 5 g/l Extracto de Levadura, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, pH 7.5

BBL™ Brain Heart Infusión (BHI base completo): 6 g/l Infusión de cerebro y corazón (sólidos), 6 g/l Digerido péptido de tejido animal, 5 g/l Cloruro sódico, 3 g/l Dextrosa, 14,5 g/l Digerido pancreático de gelatina, 2,5 g/l Fosfato disodico; suplementado con Hemina (5 mg/ml), Estreptomicina y Penicilina (PeniStrepto) (20 unidades/ml).

BBL™ Brain Heart Infusión (BHI base completo) con antibióticos: Según la cepa de *L. tarentolae* utilizada, se adicionó al medio Higromicina (100 µg/ml), Nourseothricin (ClonNat) (100 µg/ml) o Bleomicina (100 µg/ml).

2.3.2 Soluciones

Buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA): 40 mM tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA.

PBS 1X (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄.

Acrilamida/Bis: 4 M Acrilamida, 0,05 M N,N'-bis-metileno-acrilamida.

SDS 10% peso en volumen, p/v.

Tris-HCl 1.5 M: 1,5 M Tris base, HCl para llevar a pH 8.8.

Tris-HCl 0.5M: 0,5 M Tris base, HCl para llevar a pH 6.8.

APS 10% peso en volumen, p/v.

Buffer de corrida: 25 mM Tris-Base, 192 mM glicina y 0,1 % p/v SDS.

Buffer de transferencia: 25 mM Tris-Base, 150 mM glicina, 0,1 % p/v metanol, pH 8.3

Solución de bloqueo: leche descremada 5% p/v en PBS 1X.

Solución de anticuerpos: leche descremada 2% p/v en PBS 1X.

Solución de revelado (Western Lightning® Plus-ECL): 0,00225 % p/v Luminol, 22,5% v/v ml Tris-HCl 1M pH 8,6, 75% v/v H₂O y 0,004% v/v H₂O₂.

Buffer de lisis: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM g/l NaCl, 10 mM Imidazol.

Buffer de lavado: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol.

Buffer de lavado alto Imidazol: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol.

Buffer de lavado alto NaCl: 50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol.

Buffer de elusión: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM de Imidazol.

Solución Colorante Coomassie Blue coloidal: 2 % p/v Coomassie G-250, 0,4 M Sulfato de amonio, 0,2 M Ácido orto fosfórico.

Solución P1: 50 mM Tris and 10 mM EDTA, pH 8.0.

Solución P2: 0.1 M NaOH and 1% SDS.

Solución P3: 1.5 M Acetato de potasio, pH 5.5.

Buffer de siembra (5x): 0,4 M Tris-HCl pH 6,8, 50% v/v glicerol, 7,7% p/v DTT, 10% SDS, 0,002% p/v azul de bromofenol.

2.4 Anticuerpos

2.4.1 Anticuerpos primarios

Anti-His: anticuerpo monoclonal producido en ratón que reconoce una cola de 6 a 9 residuos de Histidina unidos a un carboxilo o amino terminal de cada proteína recombinante (Sigma, Estados Unidos).

Anti-TcCALI: anticuerpo policlonal producido en ratón en el laboratorio a partir de la proteína recombinante TcCALI-His producida en bacterias.

2.4.2 Anticuerpos secundarios

Anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón producido en cabra (KPLaboratories, Estados Unidos) conjugado con la enzima peroxidasa (HRP).

2.5 Técnicas generales de Biología Molecular

2.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 1 μ l de las ADN polimerasas *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*, de la empresa NEB) y *Taq* (*Thermus aquaticus* de la empresa Invitrogen), para amplificar el fragmento que codifica para TcCALI, a partir de ADN de *Trypanosoma cruzi* y de los plásmidos *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* o *pLEXSY-Ble3-TcCALI*, respectivamente. Se utilizó un volumen final de 25-50 μ l con la concentración adecuada de Buffer correspondiente a cada enzima, Mg^{2+} , dNTPs (200 μ M) y oligonucleótidos complementarios a sus extremos 5' y 3' (0,5 μ M). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla I. Se añadió a la mezcla de reacción 0,2 - 1 μ l de ADN molde y se llevó a volumen con H₂O desionizada autoclavada (libre de nucleasas). Se homogeneizó el contenido de cada tubo, se centrifugó brevemente y se inició el programa de PCR indicado en cada paso (Tabla II).

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Enzima restricción
<i>TcCALforward</i>	GG <u>AGATCT</u> ACC ATG CAA CGC AGT CTAAT	BglII
<i>TcCALreverse</i>	GCG <u>GGTACC</u> TCG CTG AGC AAA ATT	KpnI
<i>Lexsyforward</i>	CCGACTGCAACAAGGTGTAG	—

Tabla I: Secuencia de oligonucleótidos utilizados. En negrita y subrayado se indica la secuencia de restricción que reconoce cada enzima especificada.

Proceso	Tiempo	temperatura	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	30 seg	98°C	1
Desnaturalización	10 seg	98°C	30
Hibridación	25 seg	50°C	
Extensión	50 seg	72°C	
Extensión final	5 min	72°C	1

Tabla II: Programa de reacción en cadena de la polimerasa utilizado en el termociclador.

2.5.2 Purificación de Ácidos Nucleicos

Para purificar los ácidos nucleicos (fragmentos de ADN, plásmidos, etc.), se utilizó un ensayo comercial Clean Up Wizard (Promega, Estados Unidos). A partir de electroforesis en geles de agarosa, las bandas de ADN de interés se purificaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la capacidad del ácido nucleico de unirse a la sílica. De esta forma, se puede recuperar el ADN de interés sin contaminantes residuales de las distintas reacciones de las que provenían (por ejemplo: exceso de nucleótidos u oligonucleótidos, DNA polimerasa, buffers, sales o enzimas de restricción).

2.5.3 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron con las enzimas *EcoRV*, *BglII*, *KpnI* o *SwaI*, según cada caso, en las condiciones óptimas de reacción indicadas por el fabricante (NEB).

Se utilizaron 10 unidades de enzima por μg de ADN y las digestiones se realizaron como se especifica a continuación:

EcoRV: Incubación de 1 hora a 37°C utilizando el Buffer correspondiente y posterior inactivación de la enzima a 80°C por 20 minutos.

BglII y *KpnI*: Dado que la actividad de estas enzimas de restricción es óptima en distintos *buffers* de reacción, se realizó una digestión secuencial. Como primer paso se incubó con la enzima *BglII* a la concentración recomendada en buffer específico (NEB) durante 1 hora a 37 °C. Esta digestión se purificó con el ensayo Clean Up Wizard (Sección 2.5.2) y posteriormente se digirió con *KpnI* en un buffer de reacción de mayor fuerza iónica (CutSmart, NEB) a la concentración recomendada durante 20 minutos a 37 °C. La eliminación de *KpnI* y el buffer de reacción se realizó por purificación con un ensayo Clean Up Wizard.

SwaI: Incubación de 2,5 a 5 horas a 25°C en Buffer específico. Por medio de variaciones de tiempos en el protocolo, se obtuvieron las condiciones óptimas de digestión.

2.5.4 Preparación y purificación de vectores recombinantes

A. Mini-preparación de ADN plasmídico

Se partió de cultivos bacterianos conteniendo los plásmidos recombinantes, crecidos toda la noche a 37°C con agitación, en medio LB, suplementado con Kanamicina. En estas preparaciones se obtuvo entre 100 nanogramos y 1 microgramo de ADN plasmídico aproximadamente. El protocolo consta de los siguientes pasos:

- 1) Centrifugar 1,5 ml de cultivo bacteriano a 4000 g por 3 minutos.
- 2) Re-suspender el precipitado en 100 μl de solución P1 con el agregado de la enzima RNAsa para degradar el ARN bacteriano contaminante.
- 3) Añadir 100 μl de sc. P2 (lisis) y mezclar por inversión.

- 4) Añadir 170 µl de sc. P3 (neutralización) y mezclar por inversión.
- 5) Centrifugar 10 minutos a 12000 g.
- 6) Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y descartar el precipitado.
- 7) Añadir 1,5 volúmenes de isopropanol.
- 8) Incubar 10 minutos a -20°C para favorecer la precipitación del ADN.
- 9) Centrifugar a 12000 g a 4 °C por 10 minutos.
- 10) Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
- 11) Re-suspender en 30 µl de H₂O conteniendo RNAsa (1 ug/ul).

Salvo cuando se indica, todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

B. Midi-preparación de ADN plasmídico.

La obtención de cantidades suficientes de ADN plasmídico para la transfección de *L. tarentolae* se realizó utilizando un ensayo comercial (PureYield Plasmid Midiprep System, de Promega). Este ensayo se basa en la obtención de ADN plasmídico por lisis alcalina con posterior purificación mediante la utilización de columnas de sílica, afines a la carga negativa de los ácidos nucleicos. Se obtuvieron cantidades de vectores del orden de los 20 a 50 microgramos. Se partió de volúmenes de cultivo del orden de los 50-100 ml que se cosecharon por centrifugación a 4000 g que fueron procesados según las instrucciones del fabricante.

2.5.5 Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de las digestiones, el tamaño y demás características de los ácidos nucleicos se realizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa (en Buffer TAE 1x) en concentraciones de 0,8 - 2 % conteniendo 0,001% p/v de bromuro de etidio. Las muestras se sembraron re-suspendidas en un volumen de buffer de siembra comercial (Loading Dye Purple, NEB). Las corridas electroforéticas se realizaron a 98 Volts. Una vez concluido esto, los geles se fotografiaron con una cámara digital acoplada a un transiluminador de luz ultravioleta (SynGene). Se emplearon como controles de tamaño de inserto y cantidad de ADN, distintos marcadores de peso molecular.

2.5.6 Cuantificación de Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher). También, la cuantificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, comparando la intensidad de las bandas visualizadas en el equipo SynGene (Sección 2.5.5), con las intensidades dadas por marcadores de peso molecular de concentración conocida. Estos marcadores se pueden utilizar para fragmentos de bajo número de pares de bases, como vectores de varios kilo pares de bases (Ladder 100 pb o Ladder 1kb, respectivamente).

2.5.7 Reacciones de ligación de Ácidos Nucleicos

Las ligaciones de ácidos nucleicos se realizaron utilizando distintas relaciones molares de inserto:vector (por ejemplo, 3:1, 6:1, 30:1 y 11,9:1). Típicamente, volúmenes de reacción finales de 10 µl conteniendo 50 ng de vector digerido y una masa variable de fragmento de ADN a clonar (según su relación molar), se incubaron con 400 unidades de la enzima *DNA T4 Ligasa* (NEB). Las incubaciones fueron llevadas a cabo a 16 °C durante toda la noche. Por medio de estas variaciones en el protocolo, se obtuvieron las condiciones óptimas de ligación.

Solo para el caso del vector *pLEXSY-ble3* y el fragmento que codifica para *TcCALI*, la ligación se llevó a cabo con el siguiente protocolo:

- 1) Se incubó la reacción de ligación a 65°C por 10 minutos (con todos los componentes pero sin el agregado de ligasa), para romper la estructura secundaria que se pudiera formar en el extremo 5' del fragmento de que codifica para *TcCALI*.
- 2) Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente.
- 3) Se agregó la enzima T4 Ligasa y se incubó toda la noche a temperaturas fluctuando entre 12 y 22°C.

2.5.8 Secuenciación automática de ácidos nucleicos

Se enviaron muestras de ADN plasmídico (una concentración de 30-100 ng/µl), para su secuenciación a la empresa MacroGen Inc. (<https://dna.macrogen.com/eng/>, Corea). Se

analizó la identidad de las secuencias obtenidas con los programas bioinformáticos NTI Vector y BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast, Altschul et al, 1990).

2.5.9 Preparación de bacterias competentes

Se prepararon cultivos electrocompetentes de bacterias *E. coli* de la cepa *Sure2*, mediante el siguiente protocolo:

- 1) Se tomó 200 ml de cultivo de bacterias crecido toda la noche y se centrifugó a 4000 g por 15 minutos a 4 °C.
- 2) Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 200 ml de glicerol 10% frío. Se centrifugó por 15 minutos a 4000 g a 4 °C.
- 3) Se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento con 100 y 20 ml de glicerol 10% frío.
- 4) Las bacterias se re-suspendieron en 2 ml de glicerol 10% frío y se dispensó en tubos con 100 µl de solución bacteriana que se almacenaron a -80° C hasta su uso.

Las bacterias competentes químicas de la cepa *DH5α* se adquirieron de la empresa Stratagene (Estados Unidos).

2.6 Clonado del fragmento que codifica para *TcCALI* en vectores de clonado.

2.6.1 Armado del vector pZERO-*TcCALI* y transformación de bacterias *DH5α*

Diferentes reacciones de ligación conteniendo el vector pZERO digerido con *EcoRV* y el fragmento *TcCALI* amplificado con la enzima *Pfu* se incubaron en hielo por 10 min con 100 µl de bacterias *DH5α* competentes químicas. Se aplicó a la mezcla un shock térmico de 45 segundos a 42°C y se colocó inmediatamente en hielo para enfriar los tubos. Posteriormente se agregó 800 µl de medio LB y se dejó recuperar las bacterias por 45 minutos en agitación a 37°C. Los cultivos se centrifugaron a 4000 g por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió en 100 µl de medio LB. Estas suspensiones se seleccionaron creciendo las bacterias en placas de petri con medio LB Agar suplementado con 30 µg/µl del antibiótico Kanamicina (agente de selección del vector) e incubándolas 16

horas en estufa a 37°C. Como control de religación del vector, se incluyeron en este procedimiento reacciones de ligación con el pZERO digerido y ausencia del fragmento TcCALI.

2.6.2 Análisis de las bacterias transformantes

Luego de la selección de las bacterias transformadas por incubación en LB-Agar-Kanamicina, se contabilizó el número de colonias con respecto a los controles de transformación y religación (transformación con un plásmido circular sin digerir, y el vector digerido sin inserto, respectivamente). Se repicaron 5 colonias al azar e inocularon en medio líquido LB con Kanamicina. A partir de estos cultivos se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico (Sección 2.4.5 A), corroborando luego la presencia del vector por electroforesis en gel de agarosa (Sección 2.5.5).

Con el ADN plasmídico obtenido se realizaron mapeos de restricción con las enzimas *BglIII* y *KpnI* (Sección 2.5.3). Los productos de la doble digestión se sembraron en un gel de agarosa 2% (Sección 2.5.5), con el fin de corroborar la liberación del fragmento que codifica para TcCALI.

De aquellos plásmidos que liberaron bandas de ADN del tamaño esperado (aproximadamente 300 pb), se tomaron 2 (Clon #1 y Clon #5) y se realizaron Midi-preparaciones (Sección 2.5.4 B). Las muestras se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen (Sección 2.5.8), para confirmar el clonado del fragmento que codifica para TcCALI en el vector pZERO recombinante obtenido.

2.7 Clonado del fragmento que codifica para TcCALI en vectores de expresión

2.7.1 Armado de los plásmidos *pLEXSYs-TcCALI*

El armado de los plásmidos recombinantes *pLEXSYs-TcCALI* fue realizado en 2 pasos principales:

- ❖ Obtención del fragmento que codifica para TcCALI y los vectores *pLEXSY-hyg2* y *pLEXSY-ble3*, por digestión con las enzimas de restricción *BglIII* y *KpnI*, como se describe en la sección 2.5.3. El fragmento TcCALI digerido se obtuvo por digestión

del vector recombinante pZERO-TcCALI obtenido en el apartado anterior. Los productos de digestión se purificaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 y 1%, seguido del empleo del ensayo Clean Up Wizard (Sección 2.5.2).

- ❖ Ligación de los productos digeridos TcCALI con los vectores pLEXSY-hyg2 o pLEXSY-ble3 (Sección 2.5.7).

2.7.2 Transformación de bacterias Sure2

Se transformaron bacterias *E. coli* electrocompetentes (cepa Sure2), con las ligaciones de TcCALI y los vectores pLEXSY-hyg2 o pLEXSY-ble3, incluyendo controles de religación (plásmido sin inserto), como se describe a continuación:

- 100 µl de bacterias electro-competentes se incubaron en hielo durante 5 minutos con 10 µl de las distintas ligaciones. Estas mezclas se transfirieron a cubetas de electroporación con un ancho de 0,2 cm y se les aplicó un pulso de 2,5 kVoltios (programa Ec2) utilizando el equipo Micro Pulser™ (BioRad). Las mezclas se enfriaron en hielo por 3 minutos y luego se recuperaron por 40 minutos a 37 °C con el agregado de 800 µl de medio LB (10 g).
- Posteriormente, los cultivos se centrifugaron 3 minutos a 4000 g, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el precipitado en 100 µl de medio LB. Se plaquearon la totalidad de bacterias que contenía cada tubo en placas con medio LB Agar suplementadas con los antibióticos Cloranfenicol (20µg/µl), Tetraciclina (12 µg/µl), Kanamicina (30 µg/µl) y Ampicilina (100 µg/µl), siendo éste último el factor de selección de los plásmidos. Las placas se dejaron en incubación a 30 °C durante 16-24 horas.

Nota: La utilización de los antibióticos Cloranfenicol, Tetraciclina y Kanamicina se da ya que la cepa Sure2 tiene genes de resistencia a ellos (Sección 2.1.1).

2.7.3 Análisis de bacterias transformantes

Una vez obtenidas las colonias transformadas con los productos de ligación, se seleccionaron clones elegidos al azar, tanto de los ensayos como de los controles, y se crecieron en LB líquido suplementado con los antibióticos especificados en el punto anterior. Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico (Sección 2.5.4 A) de cada

uno de los cultivos y se analizó la presencia de los vectores recombinantes por electroforesis en gel de agarosa 1% (Sección 2.5.5). A partir de estos vectores como molde de ADN, se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *Lexsyforward* y *TcCALreverse* (Sección 2.5.1). Para confirmar la identidad de la secuencia y la correcta orientación del clonado, se enviaron a secuenciar dos Midi-preparaciones de los clones en los que pudo obtenerse un producto de PCR de peso molecular compatible con el fragmento TcCALI (Sección 2.5.8).

2.8 Generación de cepas de *L. tarentolae* recombinantes

2.8.1 Preparación de los plásmidos transfectantes

Midi-preparaciones de los plásmidos *pLEXSY-Ble3-TcCALI* y *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* se digirieron con la enzima de restricción *SwaI* para obtener el vector lineal (Sección 2.5.3). Como control de efectividad del corte, las digestiones se corrieron en un gel de agarosa 1% (Sección 2.5.5) y se realizó una purificación mediante el kit Clean Up Wizard (Sección 2.5.2). Posteriormente, el ADN plasmídico se concentró mediante bomba de vacío (Speed Back). El tiempo de acción de este equipo depende de la concentración final de muestra que se desea. Se controla cada 30 minutos, hasta alcanzar una concentración de no menos de 50 µl finales.

2.8.2 Transfección y selección de Parásitos

El día previo a la transfección, los cultivos densamente crecidos de *L. tarentolae* se diluyeron 1:10. Luego de la incubación, se tomaron 14 ml de cultivo fresco por cada plásmido a transfectar, se centrifugó y se re-suspendió en 350 µl de medio BHI base completo suplementado los antibióticos correspondientes. Para cada transfección, se incubó 10 minutos en hielo la suspensión de parásitos con el agregado de 10 a 50 µg de ADN plasmídico en un volumen máximo 40 µl. Estas mezclas se transfirieron a cubetas de electroporación de 0,2 cm de ancho previamente enfriadas y se les aplicó un pulso de 450 Volts y 450 micro Faradios (µF) utilizando el equipo Gene Pulser II (Biorad). Se removieron las cubetas del equipo, se las incubó en hielo durante 10 minutos y se las transfirió a botellas de cultivo conteniendo 9, 5 ml de medio BHI (suplementado con los antibióticos de mantenimiento Higromicina y ClonNat, para el caso de la cepa T7R). Se

incluyeron controles transfectados con 40 µl de agua estéril, sin plásmido recombinante. Los parásitos se incubaron por 20 horas a 28 °C y pasado ese tiempo se agregó el antibiótico de selección. Para el caso de las cepas de *L. tarentolae* salvaje transfectada con el plásmido lineal *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* o su control transfectado sin plásmido, se agregó el antibiótico Higromicina (100 µg/ml), La cepa T7R, tanto el cultivo transfectado con el vector lineal *pLEXSY-Ble3-TcCALI* como su control sin plásmido, se suplementó con Bleomicina (100 µg/ml).

A partir del agregado del antibiótico de selección, se realizaron diluciones 1:10 de los cultivos en medio fresco, hasta observar ausencia de crecimiento en los controles de transfección. Los cultivos seleccionados se mantuvieron en estufa según lo especificado en 2.1.2

2.9 Estudio de la sobre-expresión de la proteína *TcCALI-6xHis*

2.9.1 Preparación de las muestras

De las distintas cepas de *L. tarentolae* (tanto recombinantes como originales), se tomaron muestras por centrifugación de 1 ml de cultivo. Se descartó el sobrenadante y el precipitado conteniendo los parásitos se re-suspendió con 30-60 µl de buffer de siembra SB con o sin agente reductor, (Ditrioteitol, DTT), según densidad de cada cultivo. Para el caso de la cepa T7R transfectada con el vector inducible *pLEXSY-Ble3-TcCALI*, se tomaron muestras a distintos tiempo de incubación con el agregado o no de Tetraciclina (12 µg/µl), a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 8 días post-inducción. Las muestras se incubaron por 5 minutos a 95 °C y se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis.

2.9.2 Transferencia a membranas de nitrocelulosa y ensayos de Western Blot.

Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. La corrida electroforética se realizó a 170 Voltios constantes por el tiempo necesario, utilizando el sistema Mini-Protean© 3 cell (BioRad). Típicamente, se sembraron 20 a 30 µl de muestra, conjuntamente con un marcador de comercial peso molecular. Este

marcador posee bandas proteicas pre-teñidas, que sirven para el monitoreo del frente de corrida y la orientación del peso molecular aparente de las bandas detectadas.

Las muestras separadas en geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, con el sistema de transferencia semi-seca Fastblot Whatman (Biometra, Alemania), utilizando un buffer Tris-Glicina 1x con Metanol 20% v/v. Las transferencias se realizaron aplicando una corriente constante de 80 Amperes por cada gel sembrado con 10 calles de muestra, durante 40 minutos. En este caso, el marcador comercial con bandas pre-teñidas sirve de control de la eficiencia de la transferencia a las membranas.

Las muestras transferidas a membrana se incubaron con solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios α -His o α -TcCALI se incubaron toda la noche a 4°C en dilución 1:3000 o 1:1000, respectivamente. Se realizaron cuatro lavados con PBS 1X por 5 minutos cada uno. Se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario, α -Mousse KPL en dilución 1:2000 y luego se repitieron los pasos de lavado. La reacción se reveló utilizando la solución Western Lightning® Plus-ECL. La visualización y registro de las bandas proteicas se realizó con el equipo Gene Genome (SynGene), dando así una imagen de cada una de las membranas reveladas.

Nota: Salvo que se especifique, todas las incubaciones se realizaron en agitación a temperatura ambiente.

2.10 Purificación de la proteína recombinante TcCALI-6xHis en columna de Níquel-Agarosa (Ni-NTA-Agarosa)

2.10.1 Preparación de lisados clarificados

Distintos volúmenes de cultivos de *L. tarentolae* recombinantes que sobre-expresan TcCALI-6xHis, en forma constitutiva o inducible, se centrifugaron por 5 minutos a 3000 g. El sobrenadante se descartó y el precipitado (que contiene los parásitos) se re-suspendió en 300 μ l de buffer de lisis frío. Se aplicó tres pulsos de sonicado de 15 segundos cada uno, enfriando el tubo en hielo entre cada pulso. Se centrifugó a 14000 g por 20 minutos a 4°C con el fin de separar el precipitado (restos celulares, membranas rotas, material insoluble) del lisado clarificado (proteínas solubles del citoplasma). Una vez obtenido este último, se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

2.10.2 Optimización de la purificación

La purificación de TcCALI se llevó a cabo mediante una columna de afinidad de Níquel-Agarosa (Quiagen, Alemania), con algunas variaciones de las especificaciones del fabricante. Todos los pasos del protocolo se realizaron en frío para minimizar la degradación proteica.

Para cada purificación, se tomaron 120 μ l de resina que se equilibró por medio de dos lavados de 1 ml de buffer de lisis, centrifugando la agarosa a 1000 g por 20 segundos a 4°C. Se agregó 600 μ l de lisado clarificado y se incubó en rotación 2,5 horas en cámara fría. A continuación, se centrifugó a tiempo y velocidad mencionada, para bajar la resina y se separó el sobrenadante (fracción no unida). Se realizaron 6 lavados consecutivos con 1 ml de buffer de lavado cada uno. Las proteínas asociadas a la resina se recuperaron por medio del agregado de 4 volúmenes de 50 μ l cada uno de buffer de elusión. Se tomaron muestras de todas las fracciones para ser analizadas por Western Blot.

Se realizaron variaciones de este protocolo, empleando buffers de lavado con distintas concentraciones de, NaCl e Imidazol como se especifica en la sección 2.3.2. También, se varió el número de lavados y de volúmenes de elusión.

2.11 Estudio de modificaciones post-traduccionales de la proteína TcCALI

El análisis sobre la posible adición de ácido palmítico a la proteína TcCALI se realizó mediante el empleo de un ensayo comercial denominado CAPTUREome S-palmitoylated protein mini kit (empresa Badrilla, Reino Unido) (Fig.10). Cultivos de parásitos *L. tarentolae* expresando TcCALI-6xHis se centrifugaron por 3 min a 2000 g, luego se descartó el sobrenadante y se procesaron los precipitados (Fracción inicial – FI) conteniendo las células según las indicaciones del fabricante. Brevemente, los precipitados de parásitos se re-suspendieron en un buffer de lisis que además de romper las células, contiene un reactivo que bloquea selectivamente los grupos tiol libres (SH-) del aminoácido cisteína de las proteínas. Luego de tratar y precipitar las muestras con acetona, estas se disolvieron en un buffer específico y se incubaron con un reactivo que produce un clivaje selectivo de los enlaces tiol - ácido palmítico (enlace tioéster). Posteriormente, las muestras se incubaron con una resina agarosa acoplada a un grupo químico denominado pirimidilo (Forrester *et al.* 2011). Este reactivo tiene afinidad y se une a los grupos tiol

libres que se generaron en el paso anterior. Las resinas se lavaron extensivamente y se centrifugó obteniendo las fracciones no unidas a la resina (FN). Los componentes asociados se recuperaron con un buffer de elusión reductor, que rompe el enlace resina-proteína palmitoilada (Fracción unida – FU). Como control negativo, se realizó el mismo procedimiento pero con un reactivo que preserva las uniones tiol – ácido palmítico, de manera que es esperable que estas no se unan a la resina reactiva.

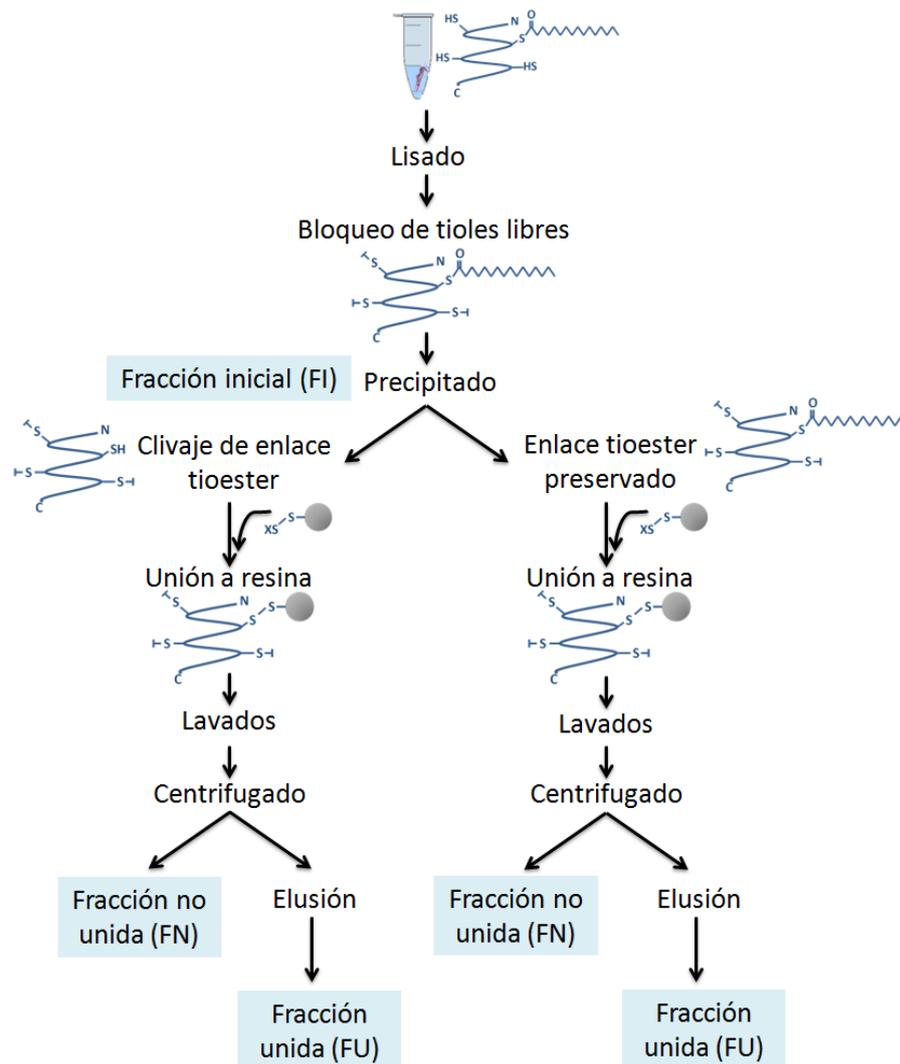


Figura 10: Representación esquemática de los pasos clave del análisis de palmitoilación de proteínas mediante el ensayo CAPTUREome S-Palmitoylated protein mini kit.

3. Resultados

3.1 Obtención de plásmidos recombinantes para la expresión de *TcCALI* en *L. tarentolae*

Los plásmidos recombinantes que contienen la secuencia *TcCALI* para su expresión en *L. tarentolae* se obtuvieron mediante una estrategia de clonado en dos pasos. En primer lugar se obtuvo el vector recombinante pZERO-*TcCALI*, por medio de la ligación del fragmento que codifica para *TcCALI* (312 pb) y el pZERO previamente digerido con la enzima *EcoRV* (3000 pb) (Fig. 11). Esta construcción se empleó para transformar bacterias *DH5a* competentes, que luego fueron seleccionadas por incubación en estufa a 37°C en placas LB-Agar suplementadas con Kanamicina.

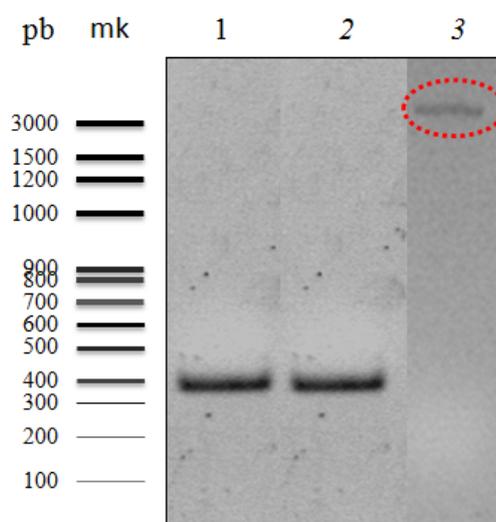


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa 1%. mk: marcador de peso molecular. A su izquierda se indican los pares de bases representados en cada banda. Calles 1 y 2: Producto de PCR correspondiente a *TcCALI* a partir de ADN genómico de *T. cruzi*. Calle 3: Vector lineal pZERO producto de la digestión con *EcoRV*. El círculo punteado indica la banda de ADN descrita.

Luego de la incubación se contabilizaron las colonias de bacterias crecidas en las placas transformadas con las distintas ligaciones. Las bacterias competentes fueron transformadas por un lado con las ligaciones y por otro con el vector sin el inserto (como control de religación). Solo se visualizaron colonias para el caso de crecimiento de bacterias

recombinantes. Se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico de 2 de los clones obtenidos (denominados #1 y #5), elegidos al azar. Estos vectores se digirieron con las enzimas *BglII* y *KpnI* y se observó la liberación de un fragmento de aproximadamente 300 pb, compatible con el tamaño del gen que codifica para *TcCALI* (Fig. 12). Estos clones se enviaron a secuenciar a MacroGen utilizando como oligonucleótidos los *primers* universales, cuya secuencia complementaria se encuentra río arriba y río abajo del sitio múltiple de clonado del vector pZERO. Como resultado, se confirmó la identidad del fragmento *TcCALI* (Fig.13).

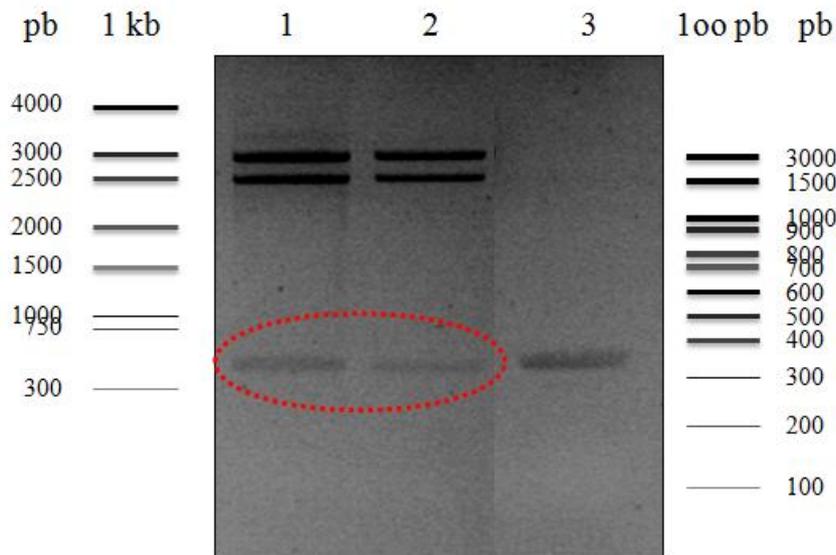


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1 kb y 100 pb: marcadores de peso molecular. Pb: pares de bases representados por cada banda. Calles 1 y 2: digestión de los plásmidos obtenidos a partir de los clones #1 y #5. Se observa la liberación de una banda de peso molecular compatible con el fragmento *TcCALI* indicado por el círculo punteado. Calle 3: producto de PCR del fragmento *TcCALI* empleado como control de peso molecular.

A.	pZERO- <i>TcCALI</i> #1	74	GCGGGTACCTCGCTGAGCAAAATTCAGCATGAGGCAGCAAAACTCATCGAATGTCATAAA	133
	<i>TcCALI</i> teórica	329	GCGGGTACCTCGCTGAGCAAAATTCAGCATGAGGCAGCAAAACTCATCGAATGTCATAAA	270
	pZERO- <i>TcCALI</i> #1	134	ATTGTCATCACTCTTCGCATACTTCCGGATCTCATTTGCTACTTCTGCGTCCGTGGGATC	193
	<i>TcCALI</i> teórica	269	ATTGTCATCACTCTTCGCATACTTCCGGATCTCATTTGCTACTTCTGCGTCCGTGGGATC	210
	pZERO- <i>TcCALI</i> #1	194	CAGACCATAGTGCTCCAAACCCTTGTAATACTTTGACATCTCAATAGCAAGGTATCC	253
	<i>TcCALI</i> teórica	209	CAGACCATAGTGCTCCAAACCCTTGTAATACTTTGACATCTCAATAGCAAGGTAGCC	150
	pZERO- <i>TcCALI</i> #1	254	ATTGTGCTCCGTGTCGAGTGAGTCAAAAAGCTCTGAAGCTTGTTTTAGTAATAGGCAA	313
	<i>TcCALI</i> teórica	149	ATTGTGCTCCGTGTCGAGTGAGTCAAAAAGCTCTGAAGCTTGTTTTAGTAATAGGCAA	90
	pZERO- <i>TcCALI</i> #1	314	ACCACCAATGTTGTTCTCAAGTTCTCATAATTGAGGTGACGATTGTTGTTGTGGCCTGC	373
	<i>TcCALI</i> teórica	89	ACCACCAATATTGTTCTCAAGTTCTCATAATTGAGGTGACGTTGTTGTTGTGGCCTGC	30
	pZERO- <i>TcCALI</i> #1	374	GATTAGACTGCGTTGCATGGTAGATCTCG	402
	<i>TcCALI</i> teórica	29	GATTAGACTGCGTTGCATGGTAGATCTCG	1
B.	pZERO- <i>TcCALI</i> #5	75	GCGGGTACCTCGCTGAGCAAAATTCAGCATGAGGCAGCAAAACTCATCGAATGTCATAAA	134
	<i>TcCALI</i> teórica	329	GCGGGTACCTCGCTGAGCAAAATTCAGCATGAGGCAGCAAAACTCATCGAATGTCATAAA	270
	pZERO- <i>TcCALI</i> #5	135	ATTGTCATCACTCTTCGCATACTTCCGGATCTCATTTGCTACTTCTGCGTCCGTGGGATC	194
	<i>TcCALI</i> teórica	269	ATTGTCATCACTCTTCGCATACTTCCGGATCTCATTTGCTACTTCTGCGTCCGTGGGATC	210
	pZERO- <i>TcCALI</i> #5	195	CAGACCATAGTGCTCCAAACCCTTGTAATACTTTGACATCTCAATAGCAAGGTATCC	254
	<i>TcCALI</i> teórica	209	CAGACCATAGTGCTCCAAACCCTTGTAATACTTTGACATCTCAATAGCAAGGTAGCC	150
	pZERO- <i>TcCALI</i> #5	255	ATTGTGCTCCGTGTCGAGTGAGTCAAAAAGCTCTGAAGCTTGTTTTAGTAATAGGCAA	314
	<i>TcCALI</i> teórica	149	ATTGTGCTCCGTGTCGAGTGAGTCAAAAAGCTCTGAAGCTTGTTTTAGTAATAGGCAA	90
	pZERO- <i>TcCALI</i> #5	315	ACCACCAATGTTGTTCTCAAGTTCTCATAATTGAGGTGACGATTGTTGTTGTGGCCTGC	374
	<i>TcCALI</i> teórica	89	ACCACCAATATTGTTCTCAAGTTCTCATAATTGAGGTGACGTTGTTGTTGTGGCCTGC	30
	pZERO- <i>TcCALI</i> #5	375	GATTAGACTGCGTTGCATGGTAGATCTCG	403
	<i>TcCALI</i> teórica	29	GATTAGACTGCGTTGCATGGTAGATCTCG	1

Figura 13: Alineamiento resultante de la secuencia de ADN amplificada a partir los vectores pZERO-*TcCALI* #1 y #5 (A y B, respectivamente), con la secuencia teórica *TcCALI*. La secuenciación fue realizada utilizando los oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3', Sp6 y T7. En fondo gris se indican los nucleótidos idénticos. Para ambos casos se obtuvo un porcentaje de identidad de 99%.

Una vez confirmada la identidad del fragmento clonado, se realizaron midi-preparaciones del plásmido pZERO-*TcCALI* con el fin de obtener cantidades de de vector del orden de los microgramos. Esto a su vez permitió, por digestión con *Bgl*III y *Kpn*I,

obtener el fragmento que codifica para TcCALI con extremos 5' y 3' compatibles para un clonado direccionado en los vectores de expresión *pLEXSY-Ble3* o *pLEXSY-Hyg2* (previamente digeridos con las mismas enzimas).

Las reacciones de ligación conteniendo el fragmento que codifica para TcCALI y los vectores digeridos, así como también plásmidos cortados sin inserto (controles de religación), se utilizaron para transformar y seleccionar bacterias de la cepa *Sure2*. La transformación y selección se realizó con distintas relaciones molares de ligación hasta obtener menos del 10 % de colonias crecidas en las placas transformadas con el control de religación con respecto a las ligaciones de inserto y vector. Se tomaron colonias al azar de las placas conteniendo las ligaciones con inserto y se realizaron midi-preparaciones de ADN plasmídico. Se observó una diferencia en el peso molecular de los plásmidos obtenidos de las bacterias transformadas con las mezclas de fusión *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* y *pLEXSY-Ble3-TcCALI* con respecto a los plásmidos *pLEXSY-Hyg2* y *pLEXSY-Ble3* vacíos, respectivamente (fig. 14).

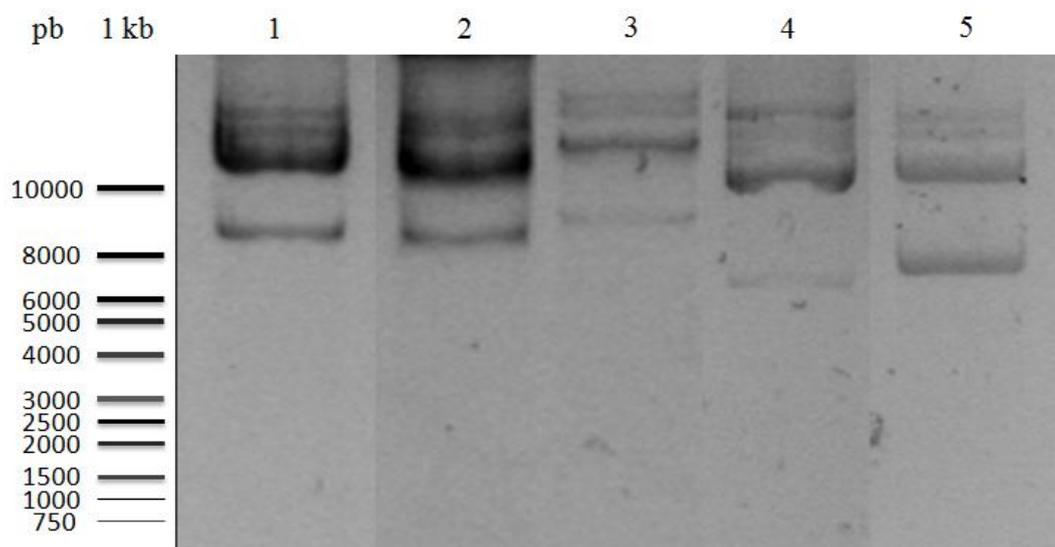


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa 1% de midi-preparaciones de ADN. pb: pares de bases. kb: marcador de peso molecular. Calles 1 y 2: plásmidos obtenidos de los clones #1 y #6, correspondientes a la fusión *pLEXSY-Hyg2-TcCALI*, respectivamente. 3: plásmido *pLEXSY-Hyg2* 4: plásmido obtenido del clon #1, correspondiente a la fusión *pLEXSY-Ble3-TcCALI* 5: plásmido *pLEXSY-Ble3*.

Como primer paso en la confirmación del fragmento clonado, se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde los plásmidos obtenidos en las midi-preparaciones de ADN. Como iniciadores de la reacción, se utilizaron oligonucleótidos complementarios a un segmento de los vectores *pLEXSYs* (*Lexsyforward*) en el extremo 5' y al segmento final de la secuencia que codifica para *TcCALI* en el extremo 3' (*TcCALIreverse*). Solo se amplificaron fragmentos de 300-400 pb en los casos en donde se utilizó como molde el vector obtenido de las colonias con las ligaciones de fusión *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* o *pLEXSY-Ble3-TcCALI* (Fig. 15). Estos clones se enviaron a secuenciar a MacroGen utilizando el oligonucleótido *Lexsyforward*. Como resultado, se confirmó la identidad del fragmento *TcCALI* clonado en orientación correcta en los vectores *pLEXSY-hyg2* y *pLEXSY-ble3* (Fig. 16).

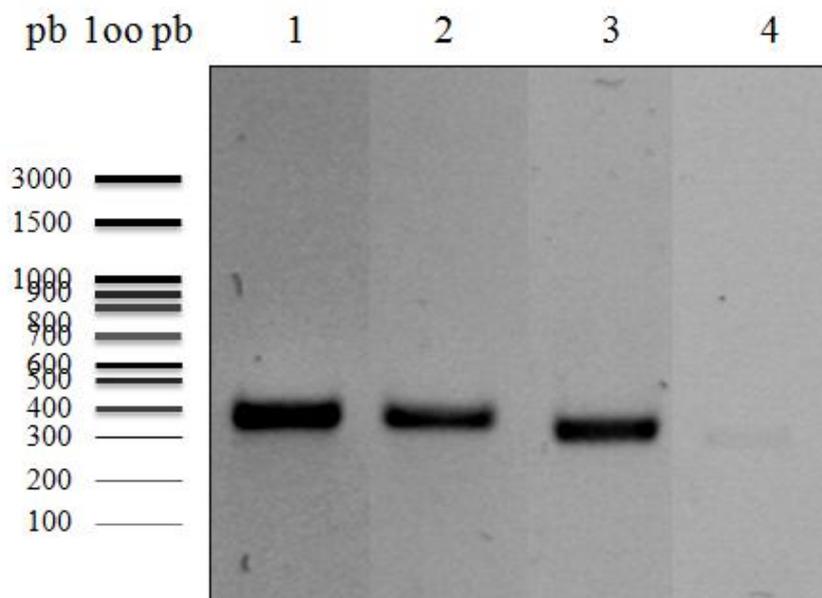


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa 1% de reacciones de PCR. pb: pares de bases. 100 pb: marcador de peso molecular. Calles 1, 2 y 3: se observa la amplificación de un fragmento de ~350 pb en las reacciones conteniendo los vectores *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* clon #1, *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* clon #6 y *pLEXSY-Ble3-TcCALI* #1, respectivamente. Calle 4: control negativo representativo de la reacción donde se usó como molde de la reacción el vector *pLEXSY-Ble3* vacío.

C.

pLEXY-Ble3- <i>TcCALI</i>	624	GGGTACCTCGCTGAGCAAATTCAGCATGAGGCAGCAAACATCGAATGTCATAAAAT	683
<i>TcCALI</i> teórica	327	GGGTACCTCGCTGAGCAAATTCAGCATGAGGCAGCAAACATCGAATGTCATAAAAT	268
pLEXY-Ble3- <i>TcCALI</i>	684	TGTCATCACTCTTCGCATACTTCGGATCTCATTTGCTACTTCTGCGTCCGTGGGATCCA	743
<i>TcCALI</i> teórica	267	TGTCATCACTCTTCGCATACTTCGGATCTCATTTGCTACTTCTGCGTCCGTGGGATCCA	208
pLEXY-Ble3- <i>TcCALI</i>	744	GACCATAGTGCTCCAAACCCCTGTAAAATACTTTGACATCTCAATAGCAAGGTATCCAT	803
<i>TcCALI</i> teórica	207	GACCATAGTGCTCCAAACCCCTGTAAAATACTTTGACATCTCAATAGCAAGGTATCCAT	148
pLEXY-Ble3- <i>TcCALI</i>	804	TGTGCTCCGTGTCGAGTGAGTCAAAAAGCTCTTGAAGCTTGTTCAGTAATAGGCAAAC	863
<i>TcCALI</i> teórica	147	TGTGCTCCGTGTCGAGTGAGTCAAAAAGCTCTTGAAGCTTGTTCAGTAATAGGCAAAC	88
pLEXY-Ble3- <i>TcCALI</i>	864	CACCAATGTTGTTCTCAAGTTCCTCATAATGAGGTGACGATTGTTGTTGTGGCCTGCCA	923
<i>TcCALI</i> teórica	87	CACCAATGTTGTTCTCAAGTTCCTCATAATGAGGTGACGATTGTTGTTGTGGCCTGCCA	28
pLEXY-Ble3- <i>TcCALI</i>	924	TTAGACTGCGTTGCATGGTAGATCT	948
<i>TcCALI</i> teórica	27	TTAGACTGCGTTGCATGGTAGATCT	3

Figura 16 (continúa de la página anterior): A) y B) Alineamiento resultante de la secuencia de ADN amplificada a partir de los vectores *pLEXY-Hyg2-TcCALI* #1 y #6, respectivamente, con la secuencia teórica *TcCALI*. C) Alineamiento de la secuencia amplificada a partir del vector *pLEXY-Ble3-TcCALI* #1 con la secuencia teórica *TcCALI*. En fondo gris se indican los nucleótidos idénticos, obteniéndose en todos los casos un 99 % de identidad.

Una vez obtenidos los vectores recombinantes *pLEXY-Hyg2-TcCALI* y *pLEXY-Ble3-TcCALI*, se tomó la totalidad de cada una de las midi-preparaciones (cantidades ente 10 y 50 µg de vector) y se digirió con la enzima de restricción *SwaI* (Fig. 17). Este procedimiento se realiza para linealizar el vector. De esta manera, se favorece la integración de la construcción por recombinación homóloga en el genoma de *L. tarentolae*, además de descartar los elementos del plásmido que sólo son necesarios para su replicación en *E. coli*. De esta manera también se disminuye el tamaño del vector y aumenta la eficiencia de la transfección en las células de parásitos.

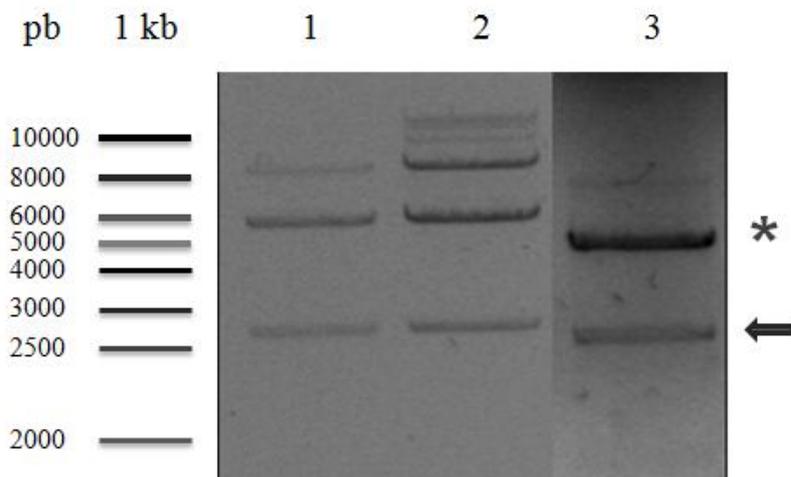


Figura 17: Electroforesis en geles de agarosa 1% de las digestiones con *SwaI*. pb: pares de bases representados en cada banda. 1 kb: marcador de peso molecular. Calles 1 y 2: digestión de los plásmidos recombinantes *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* #1 y #6. Calle 3: digestión del plásmido recombinante *pLEXSY-Ble3-TcCALI* #1. La flecha indica el elemento del vector necesario para su amplificación en *E. coli* (2,9 kpb). El asterisco indica el fragmento que se integrará en *L. tarentolae*, conteniendo la secuencia *TcCALI* y los elementos necesarios para su expresión (5 ó 6 kpb, según el vector).

3.2 Expresión y purificación de la *TcCALI*-6xHis recombinante

Las cepas WT y T7R de *L. tarentolae* se transfectaron con los vectores lineales *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* y *pLEXSY-Ble3-TcCALI*, respectivamente. Para cada caso se incluyó un control de selección, transfectando cultivos de ambas cepas con agua estéril sin ADN. Se cultivaron con los antibióticos de selección según la resistencia que le confiere cada vector (Higromicina o Bleomicina), hasta lograr ausencia de crecimiento en los cultivos controles (Fig. 18).

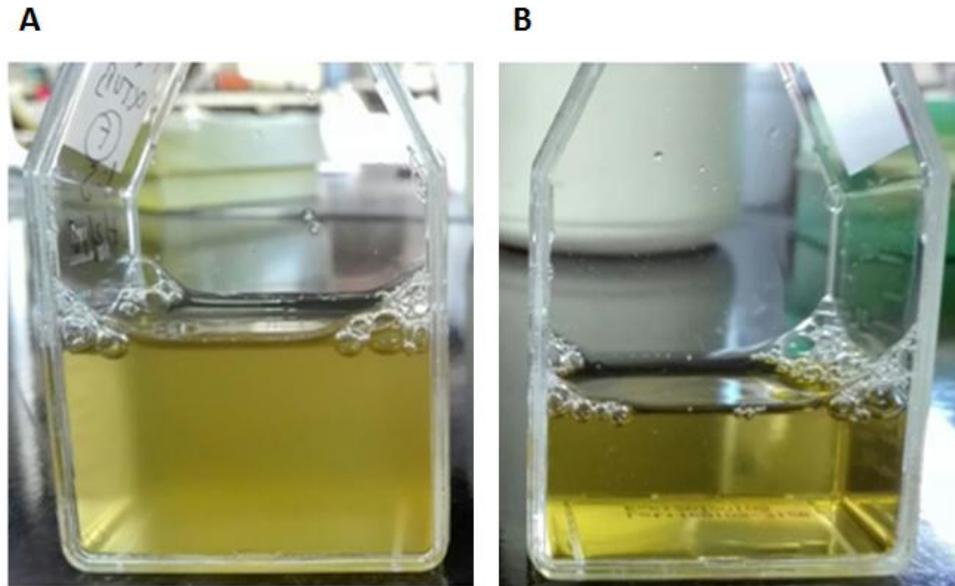


Figura 18: Imagen representativa de un cultivo de parásitos *L. tarentolae* recombinantes (A) donde se observa la turbidez del medio debido al crecimiento y proliferación, con respecto a los cultivos controles (B).

El análisis de la expresión de la proteína TcCALI se realizó en ensayos de Western Blot. Se tomaron muestras de los cultivos recombinantes y para el caso de los cultivos transfectados con el vector inducible *pLEXSY-Ble3-TcCALI*, la expresión se indujo con el agregado de tetraciclina. Se tomaron muestras a distintos tiempos luego del agregado de tetraciclina, con sus correspondientes cultivos controles sin inducir. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-TcCALI que detectó una banda específica de aproximadamente 15 kDa, tanto en los parásitos transfectados con la construcción *pLEXSY-Hyg2-TcCALI*, como en los cultivos inducidos con tetraciclina correspondientes a *pLEXSY-Ble3-TcCALI*. La ausencia de esta banda en las muestras de cultivos sin inducir y en el control de la cepa salvaje, demuestra que se obtuvieron parásitos que expresan la proteína recombinante TcCALI (Fig. 19).

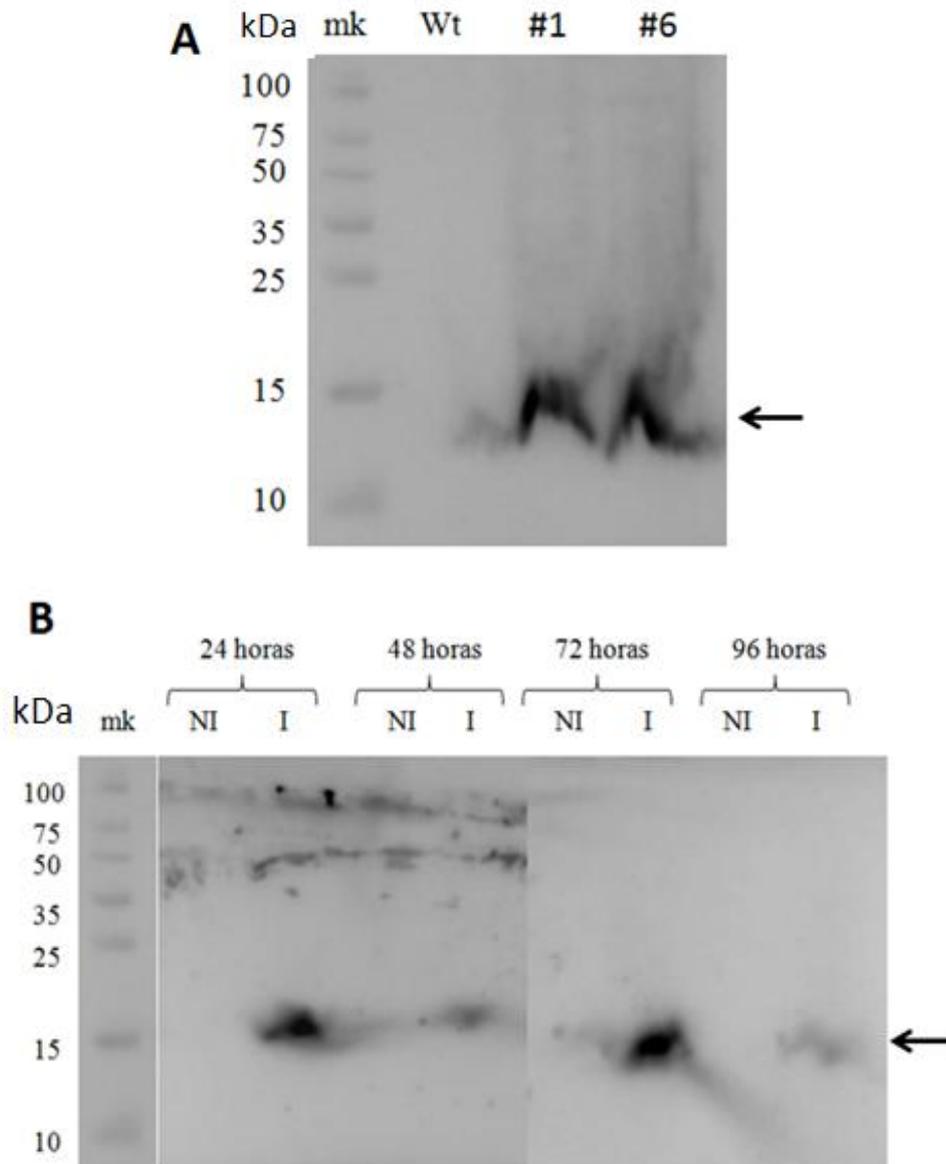


Figura 19: Ensayos de Western Blot. Los extractos proteicos de los distintos cultivos recombinantes, se resolvieron en geles SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las bandas proteicas se detectaron utilizando como anticuerpo primario y secundario anticuerpos anti-TcCALI y anti-IgG de ratón-HRP, respectivamente. A: ensayo realizado para los cultivos transfectados con el vector recombinante *pLEXSY-Hyg2-TcCALI*. Wt: extracto proteico de cultivo de la cepa salvaje de *L. tarentolae* no recombinante #1 y #6: extracto proteico de dos cultivos recombinantes. B: ensayo realizado para los cultivos transfectados con el vector recombinante *pLEXSY-Ble3-TcCALI*. I: extractos proteicos de cultivos inducidos NI: muestras sin inducir. En la parte superior de la figura se especifican las horas post-inducción con tetraciclina. En A y B, la flecha indica la altura de la banda específica detectada a 15 kDa. Mk: marcador de peso molecular de proteínas. kDa: peso molecular de cada banda.

Una vez confirmada la expresión de *TcCALI* en los cultivos de *L. tarentolae*, se diseñó un protocolo para purificar la proteína recombinante, con el fin de poder analizar los patrones de Dicroísmo circular generados por *TcCALI*-6xHis en presencia y ausencia de una solución de cloruro de sodio. Relacionado con esto, se llevó a cabo la purificación de *TcCALI*-6xHis por cromatografía de afinidad utilizando una resina de Níquel-Agarosa. El clonado direccionado que se realizó en los vectores *pLEXSYs*, generan la expresión de la proteína *TcCALI* fusionada a una secuencia de 6 Histidinas (etiqueta 6xHis) en su extremo C-terminal. Esta etiqueta es utilizada para purificar la proteína de fusión dada por la afinidad de los residuos de Histidina a iones de níquel conjugados en una resina de Agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético, Ni NTA-Agarosa (Hochuli *et al*, 1987). En este sistema, una purificación básica consiste en romper las células que contienen las proteínas recombinantes en buffer de cierta fuerza iónica para obtener un lisado clarificado. Éste se incubó con Níquel-agarosa para favorecer la unión de la etiqueta de histidinas al metal de la resina por un tiempo determinado y luego se realizan lavados para eliminar los componentes no asociados. Finalmente se recuperan las proteínas asociadas por elusión con un buffer de alta concentración de Imidazol, compuesto que tiene alta afinidad por el níquel y desplaza a la etiqueta de histidinas. Esta purificación se puede realizar de dos maneras principales. Una forma es utilizando una columna de cromatografía en donde la muestra y los buffers son aplicados en la parte superior y pasan a través de la resina por gravedad. Otra forma, que fue la empleada en este trabajo de tesis, consiste en realizar las incubaciones, lavados y elusiones en un tubo de volumen apropiado y recuperar las distintas fracciones por centrifugación a baja velocidad.

Se realizó una primera purificación (condición 1), a partir de un lisado clarificado en donde se cosecharon parásitos de *L. tarentolae* que sobre-expresan *TcCALI*-6xHis, con las proteínas solubles en un buffer de lisis. Se colectaron muestras y se estudió la presencia de *TcCALI*-6xHis en las distintas fracciones por medio de ensayos de Western Blot (Figura 20 A). La pureza de estas fracciones se analizó en geles SDS-PAGE al 15% (Figura 20 B).

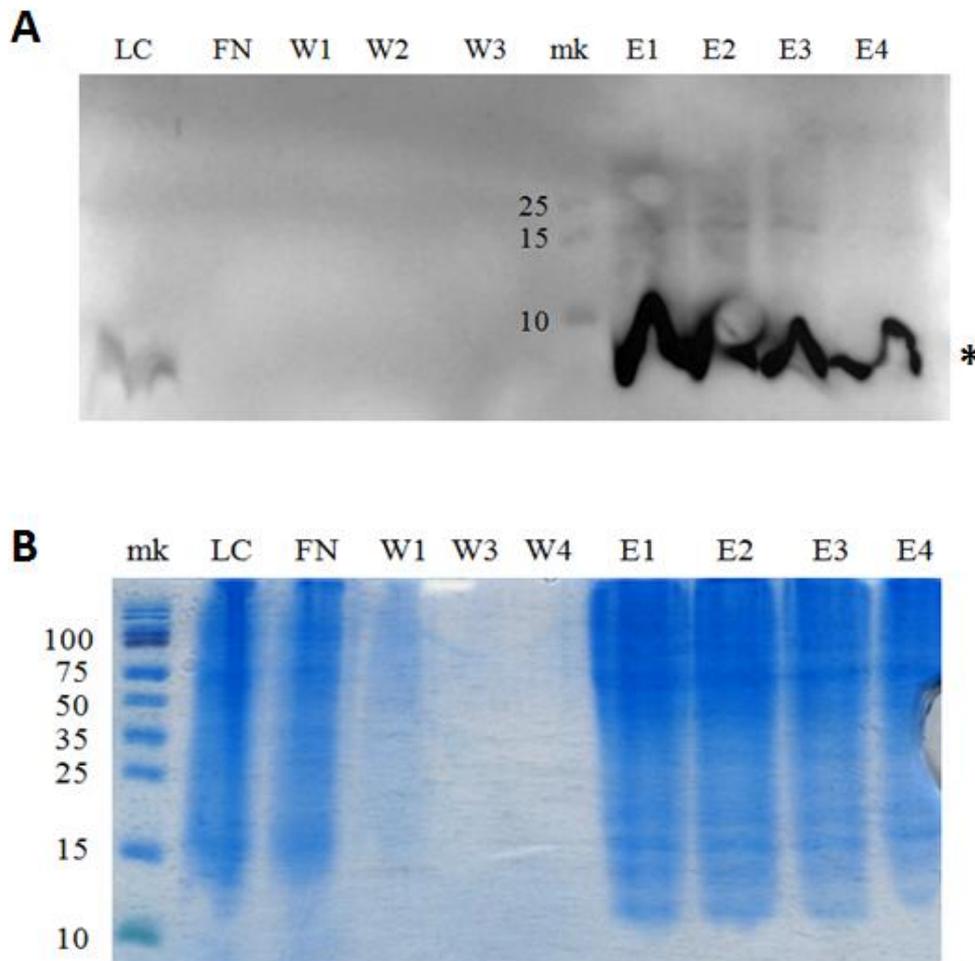


Figura 20: Purificación de *TcCALI-6xHis* utilizando resinas de Níquel Agarosa. A: Western Blot con las fracciones de la purificación, utilizando el anticuerpo primario anti-*TcCALI*. El asterisco (*) indica la altura de la banda revelada con el anticuerpo (15 kDa) B: electroforesis SDS-PAGE al 15% de las distintas fracciones, teñido con el colorante Coomassie Blue G-250. mk: marcador de peso molecular. LC: lisado clarificado. FN: fracción no unida a la columna. W1-W4: lavados de la resina. E1-E4: eluciones de la proteína.

Si bien se obtuvo un enriquecimiento de la proteína *TcCALI-6xHis* en la purificación anteriormente descrita, también se encontró una alta proporción de proteínas contaminantes, como lo revela la tinción de las fracciones de elusión en separadas en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Fig. 20 B). Se realizó una nueva purificación, equilibrando la resina de Níquel-Agarosa con buffer de lisis, el cual contiene 10 mM de Imidazol, previamente a la incubación con el lisado clarificado proveniente de los extractos de *L.*

tarentolae (Fig. 21). La inclusión de pequeñas concentraciones de Imidazol disminuye el pegado inespecífico de proteínas sin etiqueta de histidinas a la resina de Níquel. Con esta modificación en el protocolo, se observó una disminución de las proteínas contaminantes en las fracciones de elusión (Fig. 21, A y B), con respecto a la condición anterior (Fig. 20).

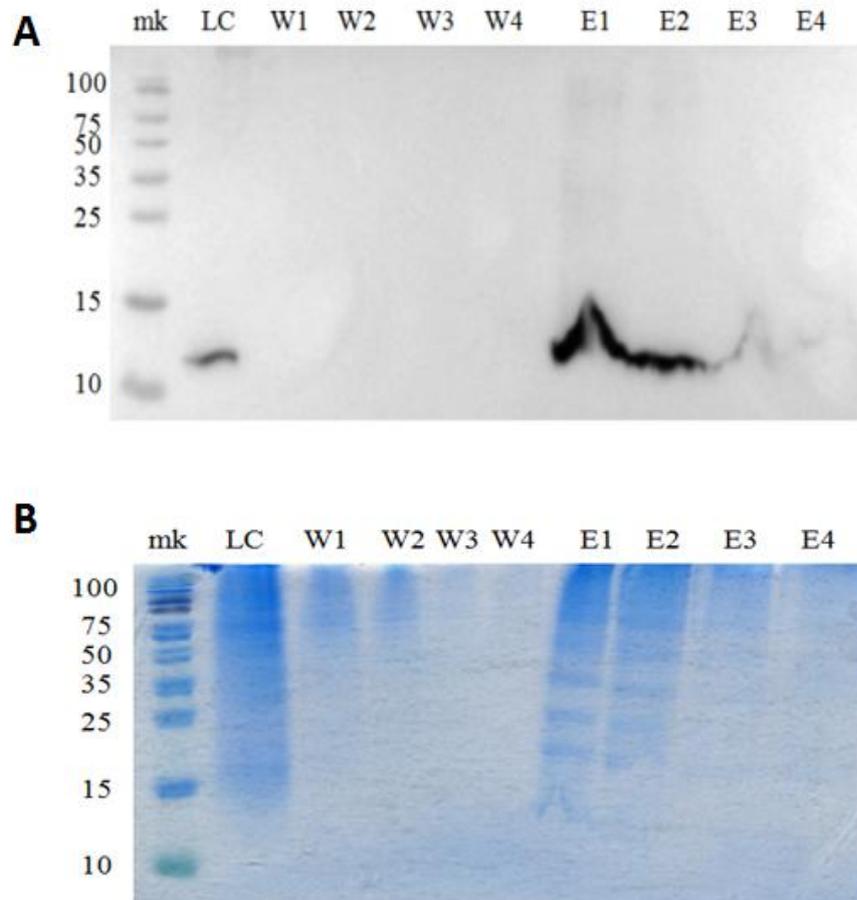


Figura 21: Purificación de TcCALI-6xHis utilizando resinas de Níquel Agarosa. A: Western Blot con las fracciones de la purificación, utilizando el anticuerpo primario anti-TcCALI. B: electroforesis SDS-PAGE al 15% de las distintas fracciones, teñido con el colorante Coomassie Blue G-250. mk: marcador de peso molecular. LC: lisado clarificado. FN: fracción no unida a la columna. W1-W4: lavados de la resina. E1-E4: elusiones de la proteína.

Se realizaron dos nuevas variaciones del protocolo de purificación con el fin de disminuir aún más lo contaminantes de las fracciones eluidas. Para eso se realizó un lavado de la resina en condiciones que desfavorezca aún más el pegado o asociación inespecífica a la resina. En un caso se aumentó la concentración de Imidazol en buffer de lavado de 20

mM a 30 mM (Fig. 22 A). En otro caso, se incrementó la fuerza iónica del buffer de lavado aumentando la concentración de NaCl de 0,3 a 1 Molar (Fig. 22 B). En ambos casos, si bien se aumentó la pureza de TcCALI-6xHis, no se logró eliminar totalmente los contaminantes, según los observado en los geles de poliacrilamida de las fracciones eluidas.

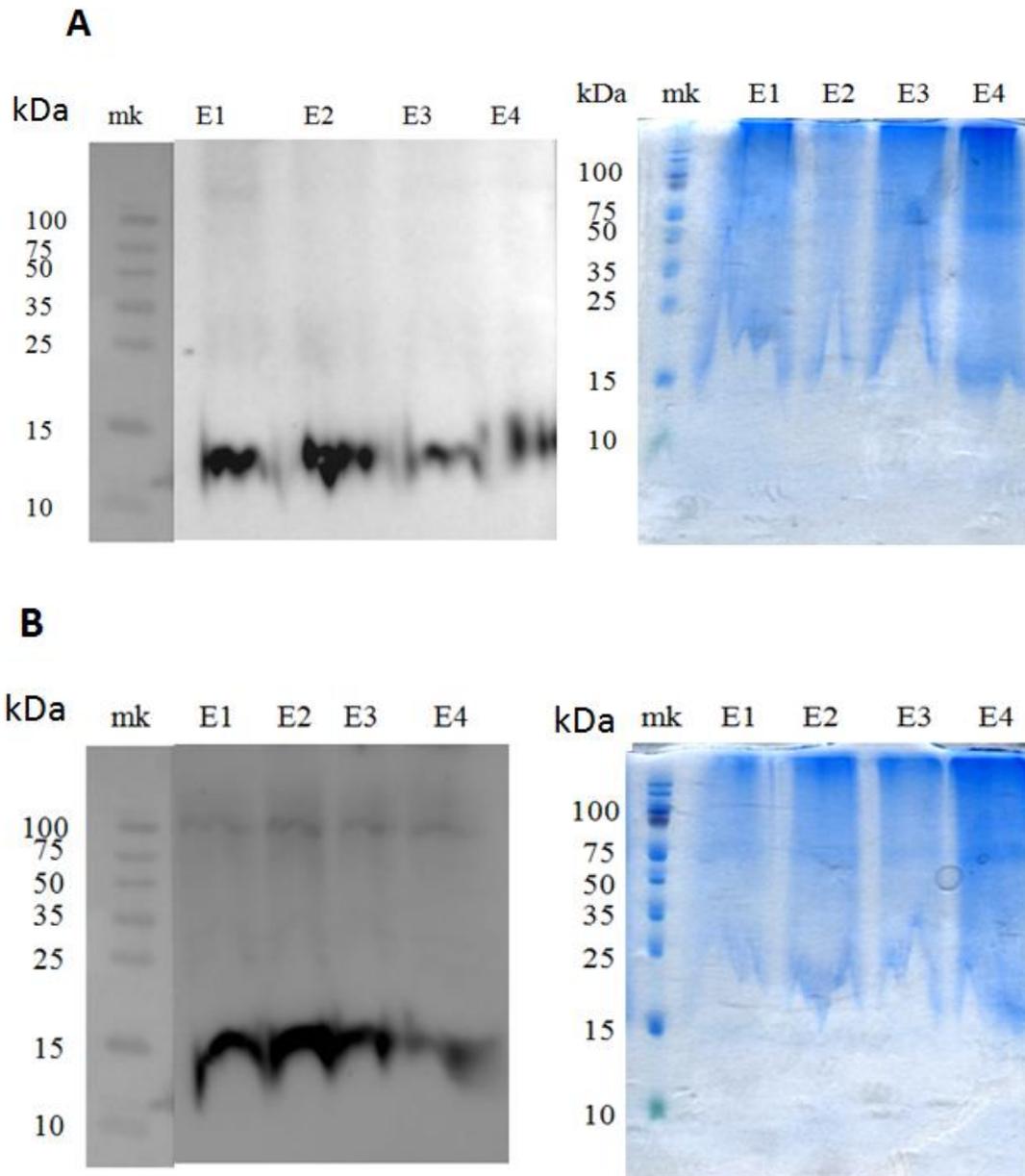


Figura 22: Puesta a punto de la purificación de TcCALI-6xHis por medio de la variación de las condiciones de lavado de la resina de Níquel-agarosa. Ensayos de Western Blot y sus respectivos geles SDS-PAGE A) Aumento de la concentración de Imidazol. B) Incremento de la fuerza iónica (1 Molar de NaCl). E1-E4: eluciones de la proteína.

Si bien en la última purificación realizada (Fig. 22), se alcanzó un enriquecimiento de TcCALI-6xHis y se pudo reducir la cantidad de proteínas contaminantes, estas purificaciones no son aptas para mandar a analizar, ya que se requiere alta pureza de la proteína de interés. Debido a esto, no se logro alcanzar el análisis de Dicroísmo circular.

3.3 Análisis de palmitoilación de TcCALI

Se utilizó un ensayo comercial para analizar si la proteína TcCALI es modificada, total o parcialmente, por la adición de ácido palmítico a las cisteínas de su secuencia (palmitoilación). En este ensayo, se lisaron parásitos de *L. tarentolae* que sobre-expresan TcCALI-6xHis en un buffer que bloquea los grupos tiol libres, para luego romper selectivamente los enlaces cisteína-palmitoílo (enlace tioéster) y generar nuevos grupos tiol provenientes de las proteínas palmitoiladas. Estos extractos se incubaron luego con una resina que une exclusivamente los nuevos grupos tiol libres. Solo se unirán a la resina aquellas proteínas que contenían un ácido palmítico unido covalentemente a su secuencia. Las proteínas se recuperaron de la resina por medio de un agente reductor y se evaluaron en un ensayo de Western Blot (Fig. 23). Como resultado de este ensayo se observó la presencia de una banda proteica correspondiente a TcCALI-6xHis tanto en la fracción inicial como en la fracción no unida a la resina (FI y FNc de la Fig. 23, respectivamente). Sin embargo, no se detectó dicha banda en la fracción eluída de la resina de afinidad por los residuos palmitoilados (FUc, Fig. 23). Como control del ensayo, se procesó una porción de la misma muestra pero preservando los enlaces cisteína-palmitoílo. En esta muestra, las proteínas que contienen cisteína-palmitoílo no podrán unirse a la resina de captura. Tanto en la muestra procesada como en el control, se observó una banda de alto peso molecular en la fracción unida a la resina (FUc y FUp, indicada por un asterisco en Fig. 23). Esto podría deberse a una agregación de TcCALI-6xHis y un consecuente pegado o asociación inespecífica a la resina del ensayo. En estas condiciones no es posible obtener un resultado concluyente. Es necesario entonces plantear nuevas estrategias o modificaciones al ensayo e interpretar nuevamente dichos resultados para obtener una conclusión al estudio planteado.

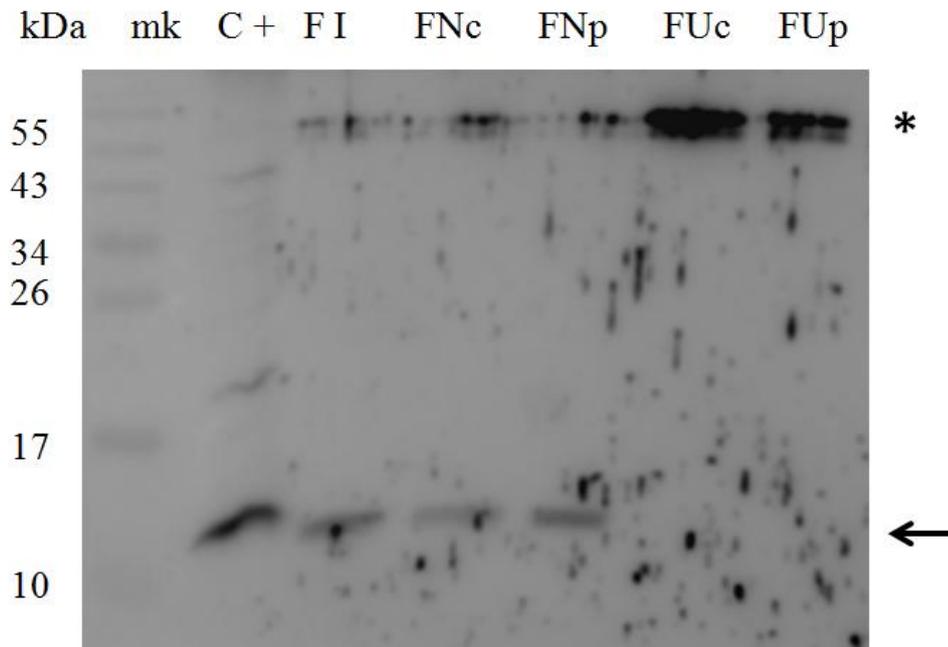


Figura 23: Estudio de formas palmitoiladas de la proteína *TcCALI-6xHis* expresada en *L. tarentolae*. Western Blot con las fracciones del ensayo. Se utilizaron como anticuerpo primario y secundario el anti-*TcCALI* y anti-IgG de ratón, respectivamente. C+: extracto proteico de un cultivo de *L. tarentolae* recombinante (control positivo de la detección de la banda correspondiente a *TcCAI-6xHis* en el ensayo). FI: fracción inicial, FNc: fracción no unida clivada, FNp: fracción no unida preservada, FUc: fracción unida clivada, FUp: fracción no unida preservada.

4. Discusión

En esta tesina de licenciatura se propuso utilizar un nuevo sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en *L. tarentolae* como herramienta para sobre-expresar TcCALI y estudiar sus modificaciones post-traduccionales.

Como primer y segundo objetivo se llevó a cabo el clonado del fragmento que codifica para la proteína TcCALI en el vector comercial pZERO y su posterior sub-clonado en los vectores de expresión del sistema LEXSY de *L. tarentolae*, respectivamente. La estrategia de realizar un paso de clonado previo en el vector pZERO se estableció luego de intentar en varias oportunidades un clonado directo en los vectores de expresión *pLEXSYs*, lo cual arrojó un resultado negativo. El clonado directo en los vectores *pLEXSYs* implicaba el corte del fragmento que codifica para TcCALI amplificado por PCR, de dos enzimas de restricción que producen extremos 5' y 3' protruyentes complementarios a los vectores digeridos con las mismas enzimas. Es posible corroborar la efectividad de una doble digestión en un vector, cortando el plásmido con las enzimas por separado y corriendo los productos de la digestión en un gel de agarosa. Si se observa una banda lineal en cada una de las digestiones con respecto a un control de vector entero sin digerir, se puede afirmar que la enzima cortó el plásmido eficientemente. Sin embargo, esto no es posible con el fragmento que codifica para TcCALI, ya que no se observarán diferencias significativas ente un producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos descriptos en esta tesis, cortados o sin cortar. Una hipótesis planteada a raíz de la dificultad de clonar directamente el fragmento TcCALI en los vectores *pLEXSYs*, puede deberse a que los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento presenten una estructura secundaria estable que dificulte el acceso de las enzimas de restricción (Pingoud y Jeltsch, 2001). En este sentido, el clonado del fragmento que codifica para TcCALI en el vector pZERO no requiere de enzimas de restricción, ya que se parte de un producto de PCR amplificado con la enzima *Pfu*, que genera extremos romos. Este fragmento es compatible con los extremos, también romos, generados luego del corte del vector pZERO con la enzima *EcoRV*. Dado que el clonado en este vector no se usará para su expresión, es indistinta la orientación en la cual se liga el fragmento en el pZERO con la enzima T4DNA ligasa.

Una vez obtenido en plásmido recombinante pZERO-*TcCALI* y al encontrarse el fragmento en un contexto inserto-vector, la eficiencia de la digestión aumenta (*Sambrook et al. 1989*) y se pudo obtener de esta manera el fragmento cortado con ambas enzimas. A partir de este fragmento digerido y purificado se pudo clonar exitosamente el gen de *TcCALI* en los vectores de expresión *pLEXSYs*, alcanzando con éxito el segundo objetivo.

Como tercer objetivo de este trabajo, se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante *TcCALI* en las distintas cepas de *L. Tarentolae*. Para ello se transfectaron los parásitos con los vectores recombinantes *pLEXSY-Hyg2-TcCALI* o *pLEXSY-Ble3-TcCALI* digeridos con la enzima *SwaI*. Se realizó una selección policlonal de los transfectantes en medio de crecimiento con los correspondientes antibióticos. Una vez seleccionados los cultivos, se analizaron para estudiar la expresión de la proteína recombinante *TcCALI*. Los vectores *pLEXSYs* le confieren una cola o etiqueta (tag, en inglés), de 6 histidinas al extremo C-terminal de *TcCALI*. Se colectaron muestras de cultivos recombinantes, tanto de las cepas que expresan *TcCALI*-6xHis de forma constitutiva como recombinante, y analizaron mediante ensayos de Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal comercial que reconoce la etiqueta de seis histidinas (anti-His). No se obtuvo marca alguna revelando esta membrana, en ninguna de las muestras analizadas (membrana no mostrada). Este mismo ensayo de Western Blot se realizó revelando la membrana con el anticuerpo anti-*TcCALI*, visualizándose una banda a la altura esperada en las muestras de los cultivos recombinantes, con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. Existen diversas hipótesis de porqué no se detectó la banda correspondiente a *TcCALI*-6xHis utilizando el anticuerpo anti-His. Una explicación plausible está relacionada con los cambios conformacionales que ocurren en las proteínas que migran del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa en una transferencia (*Bass et al. 2017*). Las proteínas se encuentran desplegadas en el SDS de los geles de poliacrilamida y se re-naturalizan mientras migran a la membrana de nitrocelulosa. En esta re-naturalización, las etiquetas de histidinas (o cualquier otro tag) pueden quedar en el interior de la nueva conformación y de esta manera muy poco accesibles o expuestas a ser reconocidas por un anticuerpo (*Debeljak et al. 2006*). Utilizando un anticuerpo policlonal en cambio, las posibilidades de que un epítopo antigénico quede expuesto para ser reconocido, aumentan considerablemente. Otra posibilidad está relacionada con el anticuerpo anti-His comercial empleado. En algunos casos, los distintos anticuerpos comerciales varían en cuanto a su

capacidad de detectar un mismo epítopo antigénico. Cuando esto ocurre y de ser posible, se aconseja la utilización de otro anticuerpo anti-His de distinta marca o proveedor, con el fin de aumentar las posibilidades de detección de la proteína recombinante.

Luego de analizar las líneas de *L. tarentolae* recombinantes, se realizaron distintos ensayos y protocolos para alcanzar los objetivos relacionados con la caracterización bioquímica de TcCALI. Uno de estos objetivos plantea el análisis experimental de la capacidad de unión de TcCALI a los iones calcio, mediado por los dominios con homología a *EF-hand* presentes en su secuencia. Para este análisis, se propuso analizar los patrones de dicroísmo circular generados por la proteína TcCALI-6xHis en presencia y ausencia de una solución de cloruro de calcio (Maune *et al.* 1992). La condición para realizar este ensayo es disponer de la proteína a analizar en un alto grado de pureza. Relacionado con esto, se llevó a cabo la purificación de TcCALI-His por cromatografía de afinidad utilizando una resina Níquel-agarosa. Se llevaron a cabo distintas variaciones de un protocolo inicial, haciendo cada vez más estrictas las condiciones de unión y lavados de la resina (aumento de la fuerza iónica y concentración de competidores de la etiqueta de histidinas). Si bien se alcanzó un enriquecimiento de TcCALI-His con respecto a un extracto proteico total de cultivos de *L. tarentolae* recombinantes, no se logró obtener la proteína recombinante con un alto nivel de pureza. Debido a esto no se logró alcanzar el objetivo propuesto de análisis de dicroísmo circular en el marco de los tiempos de este trabajo de licenciatura. Esto puede deberse a que la etiqueta de 6 histidinas este poco accesible a interactuar con la resina de Níquel-Agarosa, como se evidenció en los ensayos de Western Blot utilizando el anticuerpo anti-His. Es posible que en una conformación nativa la etiqueta 6xHis se encuentre parcialmente disponible a la resina de Níquel, pero no lo suficiente para aumentar aún más su pureza (Spriestersbach *et al.* 2015). Otra posibilidad, relacionada con la alta presencia de contaminantes, sean los niveles de sobre-expresión de TcCALI-His. Se ha reportado que las proteínas con mayores niveles de expresión pueden obtenerse con grados de pureza mayores al 95%, mientras que niveles de expresión bajos o intermedios, la presencia de contaminantes demanda pasos adicionales de estrategias de purificación (Spriestersbach *et al.* 2015).

Como perspectiva para alcanzar un alto nivel de pureza de la proteína TcCALI-His, se puede llevar a cabo distintas estrategias metodológicas. Por ejemplo, y aprovechando la ventaja de disponer de un anticuerpo específico anti-TcCALI, se pueden utilizar esferas

magnéticas reactivas. En esta estrategia, el anticuerpo se une covalentemente a través de su porción Fc a estas micro-esferas (Salimi *et al.* 2018). Las esferas magnéticas unidas con los anticuerpos anti-*TcCALI* se incuban con los lisados conteniendo la proteína recombinante en solución, para luego separarlas utilizando un imán. De manera similar a lo realizado en esta tesis, se realizan lavados consecutivos, tantos como sean necesarios, por medio de la captura de las esferas con el imán. Luego, las proteínas de interés se disocian del anticuerpo por medio del agregado de un buffer de alta fuerza iónica o de buffer de muestra y pueden ser analizadas por SDS-PAGE.

Finalmente, se realizaron ensayos para determinar si la proteína *TcCALI*-His expresada en *L. tarentolae* es modificada por adición de residuos de ácido palmítico a las cisteínas de su secuencia. Se utilizó un ensayo comercial, que en los primeros protocolos no mostró un resultado concluyente. Es necesario poner a punto el protocolo provisto por el fabricante para el caso de *TcCALI*-His. Uno de los pasos de este protocolo incluye el precipitado de las muestras por adición de acetona, y luego un extenso paso de re-disolución de estas muestras. Dado que se observan bandas a mayor altura que la esperada para *TcCALI*, es posible que la proteína se agregue, y estos conglomerados se asocien por interacción hidrofóbica con la resina de captura. Es necesario extender los pasos de precipitación, bloqueo de tioles libres y re-suspensión de las muestras en nuevos ensayos para llegar a evidencias concluyentes.

Como conclusión final, se ha avanzado en la optimización de un sistema de expresión novedoso, y se ha evaluado su aplicación al estudio de propiedades bioquímicas de una proteína de función desconocida de *Trypanosoma cruzi*.

Bibliografía

Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology (2014) 98:5301–5317**

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology (1990) 215: 403-410**

Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Baeshen NA, Redwan EM. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **Journal of Microbiology and Biotechnology (2015) 25: 953-962**

Basile G, peticca M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. **Molecular Biotechnology (2009) 43: 273-8**

Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. **Scandinavian Journal of Medicine and Science Sports (2017) 27: 4-25**

Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (2013) 40: 257-74**

Bernard P, Gabant P, Bahassi EM and Couturier M. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. **Gene (1994) 148: 71-74**

Blaskovic S, Adibekian A, Blanc M, Van der Goot GF. Mechanistic effects of protein palmitoylation and the cellular consequences thereof. **Chemistry and physics of lipids (2014) 180: 44-52**

Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, Hartung R, Müller A, Contreras R, Beverley SM, Alexandrov K. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein expression and purification (2002) 25: 209-18**

Clapham DE. Calcium signaling. **Cell (2007) 131:1047-58**

Cuiffo B, Ren R. Palmitoylation of oncogenic NRAS is essential for leukemogenesis. **Blood** (2010) 115: 3598-605

Debeljak N, Feldman L, Davis KL, Komel R, Sytkowsky AJ. Variability in the Immunodetection of His-tagged Recombinant Proteins. **Analytical Biochemistry** (2006) 359:216-23

Denessiouk K, Permyakov S, Denesyuk A, Permyakov E, Johnson MS. Two structural motifs within canonical EF-hand calcium-binding domains identify five different classes of calcium buffers and sensors. **PLoS One** (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0109287

Forrester MT, Hess DT, Thompson JW, Hultman R, Moseley MA, Stamler JS, Casey PJ. Site-specific analysis of protein S-acylation by resin-assisted capture. **Journal of Lipid Research** (2011) 52: 393-8

García ES, Genta FA, de Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in parasitology** (2010) 26: 499-505

Hashimoto M, Nara T, Enomoto M, Kurebayashi N, Yoshida M, Sakurai T, Mita T, Mikoshiba K. A dominant negative form of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor induces metacyclogenesis and increases mitochondrial density in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** (2015) 466: 475-480

Hochuli E, Dobeli H, and Schacher, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues. **Journal of Chromatography** (1987) 411: 177-184

Kushnir S, Gase K, Breitling R, Alexandrov K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. **Protein expression and purification** (2005) 42: 37-46

Maune JF, Beckingham K, Martin SR, Bayley PM. Circular Dichroism Studies on Calcium Binding to Two Series of Ca²⁺ Binding Site Mutants of *Drosophila melanogaster* Calmodulin. **Biochemistry** (1992) 31: 7779-7786

Merlin M, Gecchele E, Capaldi S, Pezzotti M, Avesani L. Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. **Biomed Research International (2014) 2014: 136419**

Organización Mundial de la Salud (2017) Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/>

Orth P, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. **Nature Structural Biology (2000) 7: 215-9**

Pingoud A and Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases. **Nucleic Acids Research (2001) 29: 3705–3727**

Potenza M, Osuna Albornoz A, Wehrendt D, Tellez-Iñón MT. Experimental approaches for the functional study of a putative calcium binding protein in *Trypanosoma cruzi*. **XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP), Buenos Aires, Argentina, 2015**

Potenza M, Wehrendt D, Tellez-Iñón M. Identificación de las proteínas que se asocian a TcCALI, una proteína hipotética de unión a calcio expresada en *Trypanosoma cruzi*. **XXVIII Reunión Anual de la SAP, Santa Fe, Argentina, 2016**

Queiroz R, Charneau S, Bastos IM, Santana JM, Sousa MV, Roepstorff P, Ricart CA. Cell surface proteome analysis of human-hosted *Trypanosoma cruzi* life stages. **Journal of Proteome Research (2014) 13: 3530-3541**

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. **Lancet (2010) 375: 1388-1402**

Salimi K, Usta DD, Koçer İ, Çelik E, Tuncel A. Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO₂ microspheres for affinity purification of immunoglobulin G. **International Journal of Biological Macromolecular (2018) 111: 178-185**

Sambrook, Fritsch, Maniatis: Molecular Cloning, A laboratory manual. Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 2, Section 9.47-9.58

Sobocińska J, Roszczenko-Jasińska P, Ciesielska A, Kwiatkowska K. Protein Palmitoylation and its Role in Bacterial and Viral Infections. **Frontiers in immunology (2018) 8: 2003**

Spriestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, Block H, Maertens B. Purification of His-Tagged Proteins. **Methods in Enzymology (2015) 559: 1-15**

Stevens JR, Gibson WC. The evolution of pathogenic trypanosomes. **Cadernos de Saude publica (1999) 15: 673-84**

Tabaczar S, Czogalla A, Podkalicka J, Biernatowska A, Sikorski AF. Protein palmitoylation: Palmitoyltransferases and their specificity. **Experimental Biology and Medicine (2017) 242: 1150-1157**

Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. **Current Protocols in Molecular Biology (2001) Chapter 16: Unit16.2**

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **pLoS neglected tropical diseases (2012) 6: e1749**

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica (2009) 115: 55-68**

Wiese M, Ilg T, Lottspeich F, Overath P. Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase. **The EMBO Journal (1995) 14: 1067-74**

Yao J, Weng Y, Dickey A, Wang Y. Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. **International Journal of Molecular Science (2015) 16: 28549-65**

Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. **Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology (2015) 16: 2420-31**