

TESIS DE GRADUACION
LICENCIATURA EN BIOQUIMICA
SECCION BIOQUÍMICA – BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS - UdelaR

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TIPO CRISP DE *ECHINOCOCCUS*
GRANULOSUS PARA SU UTILIZACIÓN COMO ANTÍGENO
PARA UNA VACUNA**

DICIEMBRE 2011
BCH. SOLEDAD ESTEFANI ECHEVERRÍA CORDO
ORIENTACIÓN: DRA. ESTELA CASTILLO

Agradecimientos

A toda la 313 por acompañarme en mi aprendizaje todo este tiempo. En especial a Estela por darme la oportunidad de entrar al laboratorio y conocer al hermoso grupo de personas que trabajan en él. También gracias a Alicia por transmitirme todas sus experiencias con *Pichia* que facilitaron en gran parte mi trabajo y por acompañarme en cada etapa.

A mi familia que me aguantaron cuando les contaba cosas que no entendían. A mis papas por darme la oportunidad de estudiar con todas la herramientas que necesitaba y esforzarse para que yo avanzara. A mi hermano Daniel que aunque ya no está con nosotros me enseñó que a los sueños hay que seguirlos y luchar por lo que uno quiere lograr.

A mi novio que cada vez que tenía que ir al laboratorio los domingos me acompañaba y que cada vez que algo no funcionaba como yo quería estaba ahí para escucharme.

A mis amigas que me acompañaron en todo el desarrollo de mi carrera y gracias a ellas tenía los resúmenes.

A mi mejor amiga que soporto todos mis no puedo tengo examen, o tengo cosas que hacer.

En fin gracias a todos lo que me acompañaron, me dieron aliento cuando lo precisaba, me bajaron a la realidad cuando era necesario y me mostraron que no estaba sola sino que siempre que lo necesitara ellos iban a estar ahí.

GRACIAS!!

Resumen

Echinococcus granulosus provoca pérdidas económicas en la ganadería, debido a que los hospederos intermediarios que parasita son principalmente ovejas y vacas. Actualmente existe un tratamiento basado en administración de drogas al hospedero definitivo. Esto último no ha sido eficaz sobre todo por la aparición de parásitos resistentes a la droga, por lo que sería importante la generación de una vacuna.

Indagando en posibles antígenos para el desarrollo de una vacuna antihelmíntica, elegimos estudiar proteínas tipo CRISP de *E. granulosus*. Estas proteínas forman parte de la superfamilia SCP/TAPS de proteínas y se caracterizan por la presencia de un dominio SCP y varios residuos de cisteína conservados.

Na-ASP2 es una proteína perteneciente a esta superfamilia que se ha utilizado para la vacuna contra nematodos. Uno de los inconvenientes que presentan estas proteínas es que al expresarse en sistemas procariotas se obtienen en forma insoluble, razón por la cual decidimos expresar estas proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*.

En este trabajo elegimos como candidatas a dos proteínas, cuyas secuencias se denominaron EgCRISP_A y EgCRISP_I. Destacándose EgCRISP_I por encontrarse en una biblioteca de protoescólices pepsinados de *E. granulosus*, lo cual podría indicar una posible función en el proceso de invasión de la larva.

A partir de las secuencias de *Echinococcus multilocularis* se diseñaron cebadores los que fueron usados para realizar experimentos de PCR usando como molde ADNc de *E. granulosus*.

Los fragmentos obtenidos fueron clonados en vectores procariotas y secuenciados.

Luego de confirmada la obtención de los ADNc correspondientes éstos fueron clonados en el vector pPicZαA, que es el vector de expresión usado en *Pichia*. Una vez clonados en el vector de expresión y confirmado que estaban en marco con el péptido señal del mismo se procedió a transformar en *P. pastoris* donde se obtuvieron algunas transformantes. Luego de obtenidas las transformantes se comenzó con los ensayos de expresión.

Los ensayos de expresión mostraron la expresión de la proteína en baja concentración.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo nos permitirán continuar trabajando en la optimización de la expresión de esta proteína para obtener una mayor cantidad que permita realizar los primeros ensayos y pruebas de su capacidad antigénica real en laboratorios Europeos.

Índice

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	5
<i>ECHINOCOCCUS GRANULOSUS</i>	5
PROTEÍNAS TIPO CRISP	7
SISTEMA DE EXPRESIÓN <i>PICHA PASTORIS</i>	9
OBJETIVOS	10
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	10
MATERIALES Y MÉTODOS	13
OBTENCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN CODIFICANTES DE EgCRISP_A y EgCRISP_I	13
CLONADO EN VECTOR T: LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN	14
BÚSQUEDA DE TRANSFORMANTES CON EL VECTOR T	14
CLONADO EN VECTOR pPICZAA: LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN	16
BÚSQUEDA DE TRANSFORMANTES CON EL VECTOR pPICZAA	16
TRANSFORMACIÓN EN <i>P. PASTORIS</i>	17
VERIFICACIÓN DE QUE LOS CLONES ZEOCINA RESISTENTES OBTENIDOS PRESENTEN EL INSERTO DE INTERÉS	17
ENSAYOS DE EXPRESIÓN EN <i>P. PASTORIS</i>	19
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
OBTENCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN CODIFICANTES DE EgCRISP_A y EgCRISP_I	21
CLONADO EN VECTOR T: LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN	23
BÚSQUEDA DE TRANSFORMANTES CON EL VECTOR T	24
CLONADO EN VECTOR pPICZAA: LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN	25
BÚSQUEDA DE TRANSFORMANTES CON EL VECTOR pPICZAA	26
TRANSFORMACIÓN EN <i>P. PASTORIS</i>	29
VERIFICACIÓN DE QUE LOS CLONES ZEOCINA RESISTENTES OBTENIDOS PRESENTEN EL INSERTO DE INTERÉS	30
ENSAYOS DE EXPRESIÓN EN <i>P. PASTORIS</i>	32
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	34
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	38
REFERENCIAS	39

Introducción

Echinococcus granulosus

Las helmintiasis son enfermedades que afectan la salud humana y animal, por lo que presentan un impacto económico de importancia mundial. Los parásitos helmintos tales como *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*, son de los parásitos de mayor relevancia sanitaria, ya sea en países en desarrollo así como en países desarrollados .

En nuestro país el cestodo *E. granulosus*, el agente causante de la hidatidosis, provoca pérdidas económicas en la ganadería, ya que si bien su huésped definitivo es el perro (y otros caninos) sus posibles hospederos intermediarios comprenden el ganado equino, bovino, vacuno, porcino, entre otros. Si bien se realizan esfuerzos para erradicarlo y controlar la enfermedad, el tratamiento se basa en administración de drogas (praziquantel) en el hospedero definitivo. Este tratamiento no es suficiente ya que debe ser mantenido a lo largo del tiempo y esto suele ser difícil en regiones endémicas. Además se ha visto resistencia a las drogas en varios helmintos.

Para controlar estas enfermedades sería mucho más efectiva la utilización de una vacuna debido a que generan memoria y su protección por ende es a largo plazo. Para generar vacunas se suelen utilizar proteínas involucradas en la invasión o en el mantenimiento del parásito dentro de su hospedero. En particular las proteínas presentes en la interface entre el parásito y el hospedero (productos de excreción-secreción y proteínas de superficie) son de especial interés dado que son potenciales antígenos por estar expuestas al sistema inmune.

Para la elección del potencial antígeno es necesario conocer un poco más del ciclo de vida de *E. granulosus*. Este se clasifica dentro del Filo Plathelminths, Clase Cestoda, Orden Ciclofilídeos, Familia Taeniidae. Los platelmintos presentan simetría bilateral, con el cuerpo aplanado dorso-ventral, con asimetría anteroposterior por presentar cefalización. Los cestodos carecen de sistema digestivo, circulatorio, respiratorio y esquelético. Presentan cuerpos largos con una serie de órganos reproductores denominados proglótides, los que presentan surcos en sus zonas posterior y anterior. No presentan cilias móviles en el adulto. Se alimenta mediante absorción a través del tegumento sincitial, el que está formado por el citoplasma distal de cuerpos celulares hundidos en la primera capa muscular .

E. granulosus, es un endoparásito hermafrodita, predominando la autofecundación sobre la fecundación cruzada. Su ciclo consta de dos huéspedes el definitivo (perros y otros cánidos) y el intermediario que comprende más de 40 especies de mamíferos herbívoros, incluidos monos, ovejas, vacas, renos y el humano como hospedero accidental por lo que se considera una zoonosis. El estadio juvenil que infecta humanos es un tipo especial de cisticerco que se denomina quiste hidático. Este puede crecer un largo periodo (más de 20 años) y presentar un gran tamaño en lugares no restringidos como el hígado .

En el ciclo de vida natural de *E. granulosus* los huevos del parásito expulsados por el perro ya están embrionados, estos presentan una cubierta de queratina (denominada oncósfera), que proporciona una protección física del embrión, frente al ambiente lo que hace que sean muy resistentes. Una vez ingeridos por el huésped

intermediario, los huevos liberan la oncósfera, la cual se activa en presencia de las enzimas estomacales, e invade los microvilli a nivel del yeyuno. La invasión se da por acción de los ganchos y los movimientos corporales del parásito, además de sustancias que secreta, que ayudan a la lisis del tejido, viajan a través de la sangre a otros tejidos, alojándose principalmente en hígado o pulmones donde se enquistan. El crecimiento del quiste es lento y variable, depende de muchos factores incluidos la cepa del parásito, el hospedero intermediario y la intensidad de la infección, que se refiere a la carga parasitaria. El quiste crece un diámetro de 1 a 5 cm por año, mientras que la formación de cápsulas hijas puede variar desde pocos meses a años. La producción de cápsulas hijas y protoescólices no es la razón del crecimiento del quiste, si no que parece depender de la relación hospedero parásito. El quiste crece por la proliferación asexual de la capa germinal, donde la formación de las capsulas hijas es endógena. La formación de protoescólices es asincrónica, por lo que se observan diferentes estadios de desarrollo en el quiste en un mismo momento .

La delgada capa germinal está rodeada externamente por una capa laminar. Todas las especies de *Echinococcus* se caracterizan por la presencia de esta capa. Está formada por un complejo de glicoproteínas, las cuales son secretadas por la lámina germinal. Esta permite una tensión intraquística considerable para el desarrollo. También protege al quiste del ataque inmunológico del hospedero. A pesar de esto se ha visto que la inmunoglobulina es capaz de ingresar al quiste, y se piensa que la capacidad de regulación de la entrada de macromoléculas parece ser una función de la lámina germinal más que de la cubierta exterior .

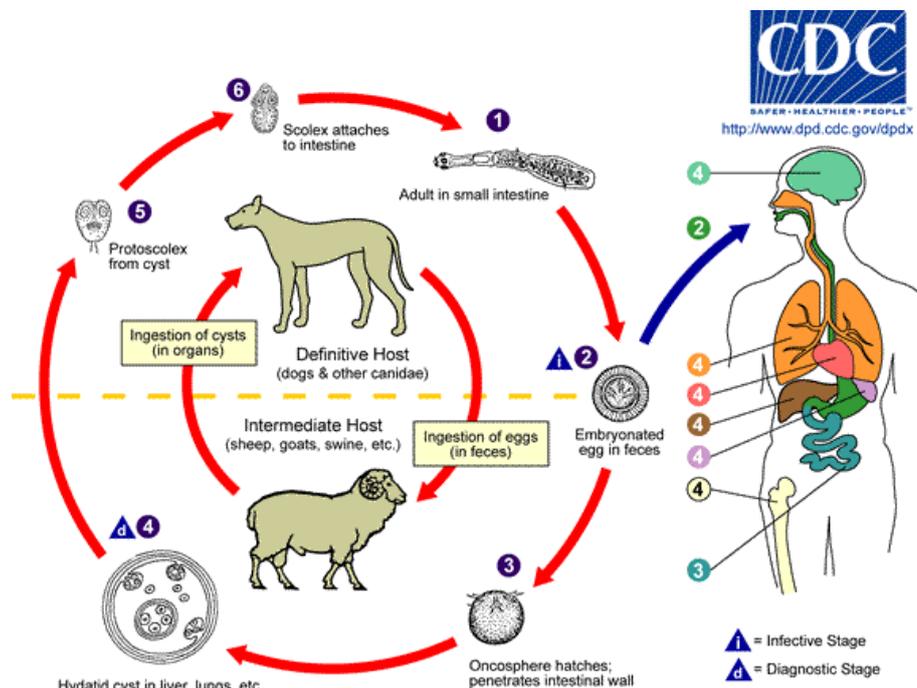


Figura 1: ciclo de *Echinococcus granulosus*

El hospedero definitivo se infecta al ingerir los quistes en los tejidos del hospedero intermediario. El ambiente del intestino induce la evaginación del protoescólex, lo que ocurre luego de ser expuesto a las enzimas y otros factores ambientales del intestino delgado. Luego de esto el parásito se ancla rápidamente en las criptas de Lieberkuhn para evitar ser expulsado. El anclaje se realiza mediante la

sujeción del parásito utilizando sus ventosas, y los ganchos que apenas penetran el epitelio de la mucosa pero actúan como ancla previniendo que este sea desalojado. El desarrollo de *Echinococcus* presenta variabilidad entre los diferentes hospederos definitivos. Se observa diferencia entre diferentes especies de hospederos, entre individuos de la misma especie y entre diferentes regiones del intestino. El adulto presenta entre 3 y 6 mm de largo y está formado por 3 tipos de proglótides (inmadura, madura y gravida). En las proglótides se hallan los órganos reproductores y cada una refleja diferentes estados de maduración. La proglótide inmadura se encuentra en el inicio del desarrollo de los órganos reproductores, en la proglótide madura los órganos reproductores se encuentran totalmente desarrollados y comienza la fecundación de los huevos, por último la proglótide gravida está llena de huevos fecundados dentro del útero. Los huevos son liberados por el hospedero definitivo a través de las heces, como consecuencia del desprendimiento de la proglótide gravida del parásito. Estos huevos recién liberados y embrionados son nuevamente capaces de infectar al hospedero intermediario y el ciclo comienza nuevamente (Figura 1).

Proteínas tipo CRISP

Las proteínas tipo CRISP forman parte de la superfamilia SCP/TAPS de proteínas conservadas a lo largo de la escala evolutiva, desde bacterias hasta vertebrados, e involucradas en varios procesos biológicos. Esta superfamilia se caracteriza por la presencia de varios motivos conservados, dos de ellos definidos en Prosite (CRISP-1: [GDER][HR][FYWH][TVS][QA][LIVM][LIVMA]W_{xx}[STN] (código Prosite PS01009) y CRISP-2: [LIVMFYH][LIVMFY]xC[NQRHS]Yx[PARH]x[GL]N[LIVMFYWDN] (código Prosite PS01010) y otros dos descritos por a los que denominaron CAP-3 (HN_{xx}R) y CAP-4 (G[EQ]N[ILV]). Se ha determinado la estructura tridimensional de varias proteínas de la superfamilia. El dominio SCP adopta un plegamiento del tipo sándwich α - β - α . En que una capa de plegamiento tipo lámina β se intercala entre dos capas de α -hélices. La estructura está estabilizada por enlaces de hidrógeno internos y por la presencia de un número variable de enlaces disulfuro. Solo uno de estos enlaces se encuentra conservado en todos los miembros de la superfamilia analizados, mientras que los restantes se conservan dentro de cada subfamilia. Su presencia explica la estabilidad de estas proteínas secretadas, cualidad necesaria para residir en el espacio extracelular. Un reflejo de esto es que la proteína GAPR-1 carece de enlaces disulfuro, lo que es consistente con su residencia citosólica, determinada por la ausencia de péptido señal de secreción.

Las proteínas tipo CRISP se caracterizan por la presencia de un dominio SCP en la región N-terminal y 10 residuos de cisteína conservados en la región C-terminal, la cual se denomina CDR (Cysteine Rich Domain). El CDR incluye una región denominada ICR (Ion Channel Regulator) y una pequeña región bisagra. En vertebrados las 10 cisteínas conservadas forman 5 enlaces disulfuro que son una característica distintiva de esta familia. El espaciamiento de las cisteínas en la región bisagra también es característico de cada subfamilia, todas contienen un péptido señal de secreción lo que es consistente con su localización extracelular. La mayoría de los mamíferos contiene 3 genes parálogos para estas proteínas, ubicados en el mismo cromosoma. Como excepción se encuentran ratas y ratones que contienen 4 genes. Si bien se han realizado estudios para determinar su función, no se ha podido definir ninguna específica para estas. En cestodos como *Mesocostoides corti* se han tenido

aproximaciones que sugerirían que están involucradas en el desarrollo de órganos reproductivos. En particular en el caso de McCRISP2 se ha visto que se expresa en la región anterior del estadio larvario, pudiendo sugerir que están involucradas en el proceso de invasión .

En helmintos los estudios de estas proteínas se han realizado mayormente en nematodos. En el caso de *Ancylostoma caninum*, parásito de perros, se observó que cuando pasa del estadio larvario de vida libre a la forma parasitaria, comienza a secretar en abundancia proteínas con este dominio. De las moléculas secretadas se han caracterizado varias, tanto de adultos como en larvas. Las proteínas NIF (Neutrophil Inhibitory Factor), HPI (Hookworm Platelet Inhibitor), Ac-ASP1 y Ac-ASP2 (Activated Secreted Protein), se producen en el estadio inicial de invasión, durante la etapa de la evasión de la respuesta inmune del hospedero a través de la secreción de moléculas de evasión . NIF impide la adhesión de neutrófilos activados a las células endoteliales . Por su parte, Ac-ASP1 y Ac-ASP2 presentan un 30% de identidad con NIF cada una, pero aún se desconoce su función. Se creen que al ser secretadas estas podrían mediar la interacción con el hospedero. Se han identificado 4 proteínas ASP adicionales en el estadio adulto, 3 de las cuales presentan dos dominios SCP. Su expresión es diferencial en distintos tejidos del parásito y se cree que pueden estar involucradas en el establecimiento o mantenimiento del parásito en el hospedero . Estas proteínas denominadas genéricamente ASP o VAL (por su nombre en inglés Venom Allergen Like), son expresadas en abundancia inmediatamente después de la transición a la forma parasitaria , son secretadas y se cree que presentan una función relacionada con la evasión de la inmunidad del hospedero. Se ha estudiado y resuelto la estructura tridimensional para una proteína ortóloga a Ac-ASP2, la proteína Na-ASP2 del nematodo *Necator americanum*. Esta muestra que la estructura adoptada es similar a una quimioquina . En cuanto a su función se ha probado que está involucrada en la migración de la larva por la piel y en la reclusión de neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo*, favoreciendo la permeabilidad del tejido . Esta proteína se considera un blanco posible para el desarrollo de una vacuna anti-helmíntica. Se han realizado ensayos de vacunas con la proteína recombinante, los cuales se encuentran en fase dos de prueba, habiéndose obtenido altos títulos de anticuerpos en pacientes humanos inmunizados . Esto último nos hace suponer que, dada la homología que presentan las proteínas CRISP con las proteínas ASPs, las proteínas tipo CRISP podrían ser un buen candidato para el desarrollo de una vacuna anti-helmíntica.

En nuestro grupo de trabajo se ha expresado anteriormente la proteína McCRISP2 de *M. corti* en *Escherichia coli*. Debido a la presencia de los residuos de cisteína en la región C-terminal se eligió una estrategia en la cual se clonó la secuencia codificante en marco con un péptido señal de *E. coli* para su exportación al espacio periplásmico, un ambiente más favorable para la formación de enlaces disulfuro. De todas maneras, esta fue obtenida de forma insoluble . Debido a que existen antecedentes de proteínas de esta familia expresadas en el sistema de expresión eucariota *Pichia pastoris*, se está ensayando su expresión en el mismo para obtenerla en forma soluble .

transformantes que sean multicopias . La obtención de colonias multicopia es de interés dado que se ha visto que mientras más copias del gen de interés presenten los transformantes podrían producir más proteína. La generación de un multicopia se basa en la integración del gen de interés en el genoma varias veces por recombinación homóloga como se puede observar en la figura 3.

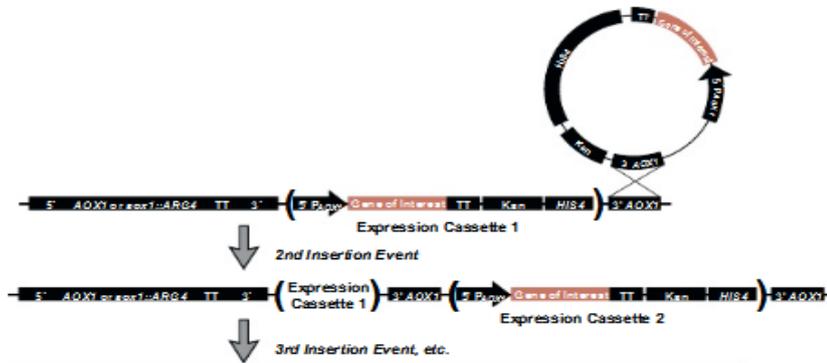


Figura 3: Esquema de obtención de multicopias.

Si bien la obtención de colonias multicopia parece ser prometedor vale destacar que los niveles de expresión de la proteínas de interés depende de cada clon en sí mismo, dado que se ha observado que clones que son positivos para PCR no son capaces de expresar la proteína de interés .

Objetivos

Objetivo General: Clonar y expresar dos proteínas tipo CRISP de *E. granulosus* para su utilización como antígeno en el desarrollo de una vacuna anti-helmíntica.

Objetivos específicos:

- 1) Aislamiento y clonado en un vector de expresión de los fragmentos de ADN codificantes de EgCRISP_A y EgCRISP_I
- 2) Optimización de la expresión de dos proteínas en *P. pastoris*

Estrategia experimental

Previo al desarrollo de la tesis se realizó en el grupo de trabajo una búsqueda bioinformática de las posibles proteínas tipo CRISP en el genoma de *E. granulosus*, dado que en ese momento este no estaba disponible la búsqueda fue realizada en el genoma de *E. multilocularis* (versión 07.01.10, disponible en <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/helminths/echinococcus-multilocularis.html> WellcomeTrust Sanger Institute). Se encontró que este contiene al menos nueve proteínas tipo CRISP (EmCRISP_A a EmCRISP_I). Además se observó que EmCRISP_I presenta un ortólogo en una biblioteca de protoescolícos pepsinados (PEP) de *E. granulosus* . Esto es interesante, dado que la pepsina simularía el momento de la invasión de la larva a su hospedero, lo que parecería indicar que EgCRISP_I estaría involucrada en el proceso de invasión al hospedero. Dado lo anterior EgCRISP_I sería

un buen candidato para clonar y expresar con la finalidad de ser utilizado como antígeno para el desarrollo de una vacuna.

En base a esto, en este trabajo se aislaron dos fragmentos de ADN codificantes para proteínas tipo CRISP de *E. granulosus* denominadas EgCRISP_A y EgCRISP_I. El diseño de los dos juegos de *primers* se realizó a partir de las secuencias en el genoma de *E. multilocularis*. En estos *primers* se incluyeron sitios de corte para dos enzimas de restricción en sus extremos (*EcoRI* y *SalI*) para el clonado direccional en el vector de expresión. La amplificación mediante PCR se realizó a partir de ADN copia (ADNc) de diferentes estadios (protoesclótics, PEP y adultos).

Luego de amplificar los fragmentos de ADN, se realizó un primer clonado de los mismos en un vector T (pGEM-T Easy de Promega, pJET1 de Fermentas) en *Escherichia coli*. Se identificaron por medio de digestión o PCR los clones que contenían el inserto apropiado y luego se secuenciaron. Se confirmó que estuvieran presentes los sitios de restricción incluidos en los *primers*. Además se enviaron a secuenciar más de un clon de EgCRISP_A y EgCRISP_I para poder determinar si los cambios que se observaban con las secuencias de *E. multilocularis* eran por problemas durante la PCR o eran por el hecho de que son organismos diferentes. Esto fue necesario ya que no se conocía la secuencia de *E. granulosus*.

Luego de verificar lo anteriormente mencionado se procedió a clonar los insertos en el vector de expresión pPicZαA (Invitrogen). Para ello se realizó una digestión con *EcoRI* y *SalI* tanto del vector como de la construcción en pJET1, se ligó y se transformó a *E. coli*. Se eligió utilizar este vector dado que contiene el péptido señal de secreción de *Saccharomyces cerevisiae* (α -factor), el cual hace que la proteína sea secretada al medio facilitando de esta forma su purificación. También se pensó que debían ser secretadas ya que estas proteínas parecerían formar parte de los productos de excreción-secreción, por lo que al ser secretadas estarían pasando por el mismo mecanismo que ocurre en *E. granulosus*. Por otra parte este vector también contiene una cola de histidinas, que se utilizaría para purificar la proteína. Los clones de *E. coli* que presentaron el inserto se secuenciaron para verificar la dirección en que se encontraba el inserto, la presencia del péptido señal en marco con la proteína, la cola de histidinas, y que no presentaban ningún error en sus codones con respecto a las secuencias obtenidas anteriormente (ya sean inserciones, deleciones o cambios de base).

Después de obtenido un clon cuya secuencia cumpliera lo anterior, se procedió a digerir el vector con *SacI* para linealizarlo y se transformó en la sepa GS115 (Invitrogen) de *P. pastoris*. Luego de la transformación, se rastrearon por medio de PCR de ADN genómico (ADNg) aquellos clones que tenían integrado en su genoma al vector con el inserto. Por último, se llevó a cabo la expresión para la cual se ensayaron distintas condiciones, ya sea distintos medios o cepas, hasta obtener la mejor condición de expresión de la proteína recombinante (ver Figura 4).

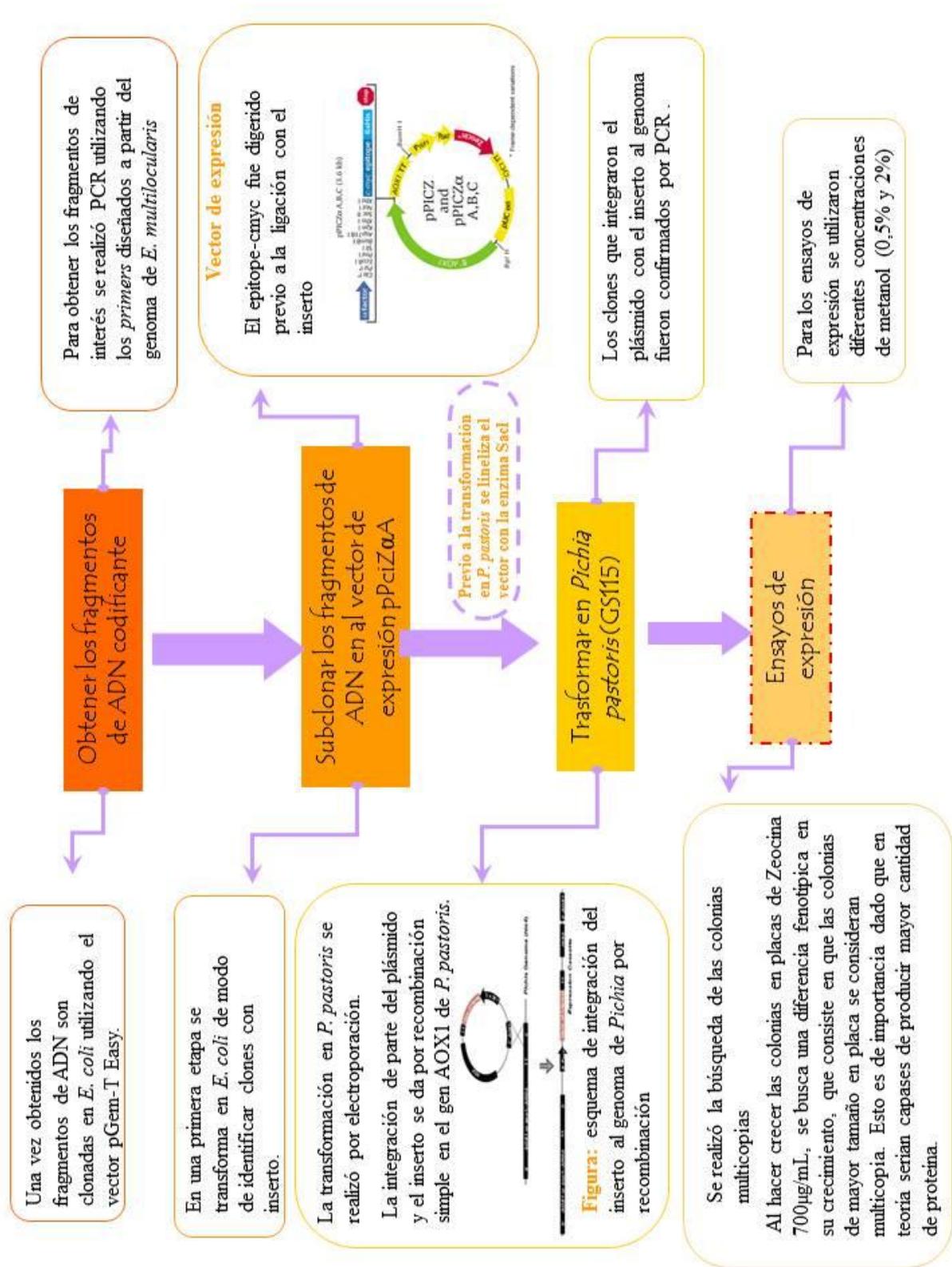


Figura 4: Esquema de estrategia experimental

Material es y métodos

Obtención de los fragmentos de ADN codificantes de EgCRISP A y EgCRISP I

Para la amplificación de los fragmentos codificantes se diseñaron los *primers* utilizando como referencia el genoma de la especie estrechamente emparentada *E. multilocularis*. Esta estrategia ha sido realizada anteriormente en nuestro grupo de trabajo con resultados exitosos. Los *primers* diseñados contienen en sus extremos sitios para las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI*. Siendo estos últimos de importancia para el clonado direccional en el plásmido de expresión. Dado todo lo anterior las secuencias de los *primers* obtenidos fueron:

Para el clonado de EgCRISP_A;

Fw. ATG AAT TCC TTA GTG AAG AGG ACC GTA GG

Rv. ATT AGTC GAC TCT GCT CCA GCA TTG ATT GT

Para el clonado de EgCRISP_I

Fw. ATG AAT TCA ATG TGT ACC CTC CTG CCA G

Rv. ATT AGT CGA CTG TCC AAT CAA TAA CGC ATT TTG GG

Luego de obtenidos los *primers* se realizaron las reacciones de PCR utilizando como molde ADNc, obtenido a través de retrotranscripción con la enzima *Super Script III* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y a partir de ARN mensajero (ARNm) de diferentes estadios larvarios. Para la realización de PCR se utilizaron las enzimas *Taq* ADN polimerasa recombinante de Invitrogen y *SBS*. La reacción fue llevada a cabo como se indica en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Condiciones utilizadas para las PCR con las diferentes enzimas, ambas reacciones se realizaron en un volumen final de 25µL.

	Taq ADN pol. Invitrogen	Taq ADN pol. SBS
ADNc	3 µL	3 µL
Buffer 10X	2,5 µL	2,5 µL
dNTPs 10mM	1 µL	1 µL
MgCl 25mM	1 µL	0 µL
Primer Fw 10µM	2 µL	2 µL
Primer Rv 10µM	2 µL	2 µL
Taq 5U/ µL	0,2 µL	0,2 µL

Tabla 2: resumen de los diferentes programas utilizados para realizar PCR.

Etapa	Programa 1		Programa 2	
	T (°C)	t	T (°C)	t
Desnaturalización inicial	94	5 min	94	5 min
Desnaturalización	94	45 s	94	45 s
Hibridación	63	45 s	53	45 s
Extensión	72	1 min	72	1 min
Ciclos	35		35	
Extensión final	72	7 min	72	7 min

La separación de las moléculas de ADN se realizó mediante electroforesis de geles de Agarosa 1%, en *buffer* TAE (40mM Tris-Acetato, 10mM EDTA pH8). Para cargar las muestras se utilizó *buffer* de carga 6X (0,25% Azul de bromofenol, 0,25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol). Se visualizó mediante adición de bromuro de etidio a la solución de agarosa a una concentración de 0,5µg/mL y exposición a luz ultravioleta (254nm) luego de la corrida. Para estimar el tamaño de las moléculas se utilizan los marcadores de peso molecular comerciales 1kb y/o 100pb de Fermentas.

Clonado en vector T: ligación y transformación

El vector T utilizado fue el pGEM-T Easy (Promega), que confiere resistencia a ampicilina y permite la selección blanco/azul.

La ligación se realizó según indican las condiciones de la tabla 3. Los fragmentos a ligar fueron productos obtenidos por PCR. Estos fueron purificados directo de la reacción utilizando el *Gel Extraction kit* BIORON, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Por otra parte los insertos fueron ligados en el vector de clonado pJet (Fermentas) que presenta mejores sitios de restricción para el clonado de nuestro inserto dada la existencia de 2 sitios de corte para *EcoRI* en pGEM-T Easy. Para lo cual se siguieron las indicaciones del fabricante y se utilizaron para clonar los productos de PCR.

Tabla 3: Condiciones de ligación, la mezcla de reacción se dejó reposar por 2hs a temperatura ambiente u ON a 4°C. El *buffer* utilizado es el indicado por el fabricante.

	Volúmenes
<i>Buffer</i>	5 µL
Producto de PCR	3 µL
pGEM-T Easy	1 µL
T4 ligasa (Promega)	1 µL

Luego de obtenida la ligación se procedió a transformar la cepa XL-1 BLUE de *Escherichia coli*, que no presenta resistencia a ampicilina.

Para el procedimiento de transformación se descongelaron las células químicamente competentes durante 10 min en hielo. Luego se agregó la mezcla de ligación con la cual se incubó por 20 min. Se llevó a cabo un shock térmico de 90s a 42 °C, y se incubó en hielo por 1-2 min. Se añadió 600µL de medio LB y se incubaron por 45 a 60 min con agitación a 37 °C. Por último se plaqueó con rastrillo en placas de LB-agar con ampicilina 100µg/mL para seleccionar las bacterias que incorporaron el plásmido. Para la selección blanco/azul se utilizaron placas de LB-agar y ampicilina en las que se agregó previamente IPTG 2% y Xgal 20mg/mL sobre la superficie.

Búsqueda de transformantes con el vector T

Para confirmar la presencia del inserto en las colonias que resultaron resistentes a ampicilina y blancas en presencia de Xgal y el IPTG se les realizó PCR de colonia, para la cual se tocó una colonia aislada con un ansa y se resuspendió en la mezcla de reacción de la tabla 4 y las condiciones determinadas en el programa 2 de la tabla 2.

Tabla 4: Condiciones utilizadas para la realización de PCR de colonia en un volumen final de 15 μ L.

	Volúmenes
<i>Buffer</i> 10X	1,5 μ L
dNTPs 10mM	0,2 μ L
Primer Fw. 10 μ M	0,3 μ L
Primer Rv. 10 μ M	0,3 μ L
Taq 5U/ μ L	0,1 μ L
Agua	Csp. 15 μ L

Las colonias que amplificaron un producto del tamaño esperado en la PCR fueron usadas para la preparación de ADN plasmídico (ADNp) según indica en el protocolo de lisis detallado a continuación.

Se realizó un cultivo en 3mL de LB líquido con ampicilina 100 μ g/mL a partir de una colonia aislada y se incubó ON a 37°C. Se centrifugó 1,5mL de cultivo crecido a 10000-14000 rpm de 30s a 2 min. Se descartó el sobrenadante y se volvió a repetir el paso anterior. Se retiró completamente el resto de sobrenadante del pellet de células. Luego se añadió 200 μ L de Solución I se resuspendió el pellet con vortex y se añadió 5 μ L de ARNasa 10mg/mL. Se añadió 200 μ L de Solución II y se invirtió suavemente 2-3 veces y se dejó un máximo de 5 min sobre la mesada. Luego se agregó 200 μ L de Solución III se invirtió suavemente 2-3 veces y se dejó reposar 5 min en hielo. Se le agregó 200 μ L de cloroformo isoamílico se invirtió suavemente 2-3 veces y se centrifugó por 15 min a 12000g a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, y se precipitó el ADNp con 0,6vol de isopropanol se dejó 5 min en mesada. Se centrifugó 20 min 12000g a 4 °C se descartó el sobrenadante, se lavó con 500 μ L de Etanol 70%. Se dejó secar bajo lámpara y se resuspendió en 35 μ L aproximadamente de agua mQ. La composición de las soluciones utilizadas se detalla a continuación.

Solución I: Tris-HCl 50mM, EDTA 10mM, pH 8,0

Solución II: NaOH 200mM, SDS 1%

Solución III: Acetato de potasio 3M pH 4,8

Se realizó la digestión del ADNp para verificar la presencia del inserto en el vector T. Para esto se utilizó la enzima de restricción *EcoRI* (Promega), que digiere al plásmido en regiones flanqueantes al inserto. Las condiciones del ensayo se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Condiciones utilizadas para realizar la digestión con *EcoRI*, en el cual se incubó la mezcla de reacción por 2hs a 37°C, en un volumen final de 10 μ L

	Volumen
ADNp	5 μ L
<i>Buffer</i> 0 (Promega)	1 μ L
<i>EcoRI</i> 12U/ μ L (Promega)	0,3 μ L

La visualización del ADN se realizó a través de geles de agarosa como se indicó previamente.

Aquellas colonias que presentaban un inserto del tamaño esperado se utilizaron para preparar ADNp a pequeña escala utilizando *Ron's Plasmid Mini kit* de BIORON, según recomendaciones del fabricante. Luego fueron secuenciados los ADN en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (*Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer*). En el caso de las secuencias del vector pGEM-T Easy se utilizó el *primer* T7, que hibrida con el vector en un sitio adyacente a la secuencia de clonado múltiple. Para las secuencias del vector pJet se utilizaron los *primers* M13 Fw y M13 Rv, que hibridan en sitios adyacentes a la secuencia de clonado múltiple. Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y corregidas manualmente, en caso de ser necesario, con el programa *CHROMAS* versión 2.33 (Tecnelysium) y se analizaron utilizando el programa *Gene Runner* 3.05 (Hastings Software, Inc).

Clonado en vector pPicZαA: ligación y transformación

Se utilizó como vector de expresión el pPicZαA, que confiere resistencia a Zeocina y puede ser utilizado tanto en levadura como bacteria dado que presenta un sitio de replicación bacteriano. Previo a la ligación en el vector, se realizó la digestión de los ADNp que presentaban las secuencias anteriormente verificadas, utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI*. También se digirió el vector pPicZαA con las mismas enzimas para obtener una ligación direccional, las condiciones de la digestión se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: condiciones utilizadas para la digestión previa a la ligación en vector de expresión. La mezcla de reacción con un volumen final de 100 μL se dejó incubando durante 2hs a 37°C.

	Volumen
ADNp	15 μL
<i>Buffer O</i> (Fermentas)	10 μL
<i>EcoRI</i> 12U/ μL (Promega)	3 μL
<i>SalI</i> 10U/ μL (Fermentas)	3 μL

Luego de digerido el ADNp los fragmentos se separaron por gel de agarosa 1% como se describió previamente. Se purificaron desde el gel utilizando el *Gel Extraction kit* BIORON, siguiendo las indicaciones del fabricante. La ligación fue realizada según el protocolo descrito en la tabla 3, con la sola modificación del tipo de vector utilizado.

Obtenida la ligación se procedió a transformar en la cepa DH5α de *E. coli*, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Modificando que las células fueron plaqueadas con rastrillo en LB Low Salt-agar con Zeocina 25μg/mL para seleccionar las bacterias que incorporaron en plásmido.

Búsqueda de transformantes con el vector pPicZαA

Se realizó nuevamente preparación de ADNp a pequeña escala como se indicó anteriormente. Fue digerido siguiendo el protocolo de la tabla 6 para verificar la presencia del inserto.

La visualización del ADN se realizó a través de geles de agarosa como se indicó previamente.

Aquellas colonias que presentaban un inserto del tamaño esperado se les realizó preparación de ADNp y este luego fue secuenciado en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (*Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer*). Utilizando los *primers* 5' AOX1 y 3' AOX1 que hibridan en sitios adyacentes a la secuencia de clonado múltiple.

Una vez obtenidas las secuencias y verificada la identidad del inserto se realizó midiprep utilizando el *kit AxyPrep plasmid Midiprep* de Axygen. Siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se precipitó con 1/10 Vol. de Acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 Vol. de etanol absoluto. Luego de precipitado el ADN se purificó desde el gel utilizando el *Gel Extraction kit* BIORON, siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de plásmido obtenida fue medida mediante *Nanodrop*, y luego se digirió con *Sst* (SBS mismo sitio de corte que *SacI*) según protocolo de la tabla 7, para obtener el plásmido linealizado que es necesario para transformar en *P. pastoris*.

Tabla 7: Condiciones de digestión para linealizar el plásmido pPicZαA. Se incubó a 37°C por 2hs, y se realizó en un volumen final de 250 μL.

	Volumen
ADNp	200 μL
Buffer L (SBS)	25 μL
<i>Sst</i> 6 U/ μL (SBS)	4 μL

Transformación en *P. pastoris*

Una vez conocida la concentración del ADNp linealizado se procedió a transformar la cepa GS115 de *P. pastoris* con ADN correspondiente a EgCRISP_A, EgCRISP_I y el vector pPicZαA sin inserto, siguiendo el protocolo de electroporación indicado en el manual *EasySelect™ Pichia Expresión Kit* (Invitogen). Se realizó según las sugerencias del fabricante, y se realizaron controles para verificar la viabilidad de las células luego de que fueron electroporadas, a estas solo se les agregó agua y se plaqueó mediante rastrilleo en placas de YPD-agar sin Zeocina utilizando el volumen mínimo y máximo indicados en el manual. También se realizó un control de ausencia de resistencia a Zeocina por parte de la cepa en sí misma, plaqueando mediante rastrilleo en YPDS-agar con 100μg/mL de Zeocina utilizando los volúmenes de los extremos indicados en el manual.

Verificación de que los clones Zeocina resistentes obtenidos presenten el inserto de interés

Para verificar la presencia de los fragmentos de interés en las transformantes resistentes a Zeocina se realizó un aislamiento de ADNg cuyo protocolo se describe a continuación.

Para este se realizó un cultivo en 5mL de YPD líquido a partir de colonias aisladas y se dejó incubando ON a 30°C con agitación. Se transfirió 1.5 mL del cultivo ON a un *eppendorf*. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1min a temperatura ambiente. Se removió el medio de cultivo por aspiración (con pipeta) y se resuspendió en 50μL de buffer STES. Luego se agregó aproximadamente 50μL de bolitas de vidrio (*acid washed glass beads*) a cada tubo conteniendo las levaduras resuspendidas. Fue

vortexeado aproximadamente 30 segundos. Se agregó 20µL de buffer TE pH 7,6. Se agregó 10µL de ARNasa 1mg/mL y fue incubado por 15 minutos a 37°C. Se añadió 60 µL de fenol:cloroformo (1:1, v/v). Luego se vortexeó por 1 minuto para mezclar las fases. Seguido de esto se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente. Recuperó la fase acuosa (superior) en un tubo limpio. Se precipitó el ADN con 1/10 volumen de Acetato de Sodio y 2 volúmenes de Etanol absoluto. Se dejó incubar por 20 minutos a -20°C. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y lavó el pellet con 100µL de Etanol 70%. Se volvió a centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante por aspiración (con pipeta) y dejó secar durante 15 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 40 µL de TE pH 7,6.

Las composiciones de las soluciones se resumen a continuación.

STES: Tris-Cl 0.2 M pH 7,6; NaCl 0,5 M; SDS 0,1% (w/v); EDTA 0,01 M

TE pH 7.6: Tris-Cl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM

Acetato de Sodio: 3M, pH 5.2

OBSERVACIONES: Para obtener un rendimiento mayor (sugerible) se puede escalar el protocolo. Por ejemplo, si se tiene un cultivo de 5mL, transferir 4.5mL (en tres veces) y multiplicar todos los volúmenes por 3

Luego de obtenido el ADNg de las levaduras se realizó PCR como indica la tabla 8 utilizando los *primers* del gen AOX1. Siguiendo las condiciones determinadas en el programa 3 descrito en la tabla 9.

Tabla 8: Condiciones utilizadas para realizar la PCR del ADNg en un volumen final de 20 µL

	Volumen
Buffer 10X	2,5 µL
dNTPs 10mM	1 µL
5' AOX 10µM	1 µL
3' AOX 10µM	1 µL
Taq 5U/ µL	0,2 µL
ADNg	3 µL

Tabla 9: Condiciones que se utilizaron en la realización de la reacción de PCR con ADNg para *P. pastoris*.

Etapa	Programa 3	
	T (°C)	T
Desnaturalización inicial	94	5 min
Desnaturalización	94	45 s
Hibridación	54	45 s
Extensión	72	1 min
Ciclos	35	
Extensión final	72	7 min

A los productos que se obtuvieron mediante la PCR se les realizó una digestión con la enzima de restricción *AvaII* para verificar su identidad. Para esto se utilizó el protocolo de la tabla 10.

Tabla 10: Condiciones utilizado para digerir el producto de PCR del ADNg de levadura. Se incubo la mezcla de reacción 2hs a 37°C

	Volumen
ADN	3 μ L
<i>Buffer</i> 4 10X (NEB)	2 μ L
<i>AvaII</i> 10U/ μ L (BioLabs)	1 μ L
Agua	Csp. 20 μ L

Ensayos de expresión en *P. pastoris*

Luego de verificar la identidad de los clones obtenidos en la transformación de *P. pastoris* se procedió a realizar ensayos de expresión. Este último, se realizó según el protocolo descrito en el manual *EasySelect™ Pichia Expresión Kit*. Habiendo elegido tratar a las células como Mut⁺. Utilizando los controles sugeridos por el manual menos el control de la cepa transformada con el plásmido sin inserto. También como es sugerido en el manual se realizaron ensayos de expresión con 2% de metanol.

Procesamiento de muestras y visualización de proteínas

Las fracciones obtenidas de los diferentes días del ensayo de expresión fueron procesadas según indica el manual *EasySelect™ Pichia Expresión Kit*.

La visualización de las proteínas obtenidas en el proceso se realizó mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para esto se utilizó un gel de poliacrilamida 15%. Al finalizar la corrida se tiñó con *Coomasie Blue*. Para estimar el tamaño en kDa de la proteína se utilizó el marcador de peso molecular *Prestained Protein Marker, Broad Range* (6-175 kDa) de BioLabs.

Para visualizar con mayor resolución las proteínas expresadas se realizó un western blot, utilizando un anticuerpo primario que reconoce la cola de histidinas (anti-HIS) producido en ratón con una dilución de 1/5000 y como secundario anti-ratón con la misma dilución del primero. El protocolo de transferencia utilizado fue el descrito en . Donde se modificó que la membrana (*Thermo scientific*) fue tratada según indicaciones del fabricante, la trasferencia fue realizada por 2h a 200mA. En el buffer trasferencia en lugar de metanol se usó etanol.

Se desarmó el dispositivo y se sumergió la membrana en solución de bloqueo. Se dejó incubado ON a 4°C o 2horas a temperatura ambiente con agitación. Se preparó la dilución anteriormente indicada del anticuerpo primario, se colocó sobre un vidrio limpio un *parafilm* de tamaño mayor que la membrana. Este *parafilm* se humedeció por debajo para pegarlo al vidrio. Se colocó la membrana centrada sobre el *parafilm*, se colocó por encima el anticuerpo primario. Se cubrió con una tapa cuidando que no toque el líquido. Se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente, sin agitación. Luego de esto se realizaron 6 lavados de 5 minutos con abundante TBST. El procedimiento fue repetido con el anticuerpo secundario, incubándolo 1 hora a temperatura ambiente. Realizándole 12 lavados con TBST. Por último, se procedió a revelar por

quimioluminiscencia, armando el mismo dispositivo con el *parafilm* sobre el vidrio. Se mezcló 1 parte de reactivo de revelado con una parte de *buffer* de revelado y dejando reposar 30 minutos. Cubrió la membrana con esta solución y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se colocó la membrana entre dos nylon, de modo que no se moje la placa fotográfica.

Se procedió a revelarlo en el cuarto de revelado, con el fijador y el revelador de química MediQ. Se cortó un trozo de placa fotográfica del tamaño de la membrana. Se colocó la membrana dentro del cassette y encima la placa, sin moverla. Se expuso el tiempo necesario. Luego se quitó la placa y fue sumergida en solución reveladora hasta que se vio señal. Fue enjuagada en agua destilada y se sumergió en la solución fijadora por 5 minutos. Por último se enjuaga con agua destilada y se dejó secar.

La composición de las soluciones utilizadas para el ensayo se resume a continuación.

TBST (para 1L): 1M Tris-HCl pH 7.5 10mL; NaCl 5M 30mL; Agua csp. 1L; Agregar Tween 20 al 0.1%

Solución de bloqueo: 3% leche en polvo, 2% Glicina en TBST

Resultados y discusión

Obtención de los fragmentos de ADN codificantes de EgCRISP_A y EgCRISP_I

El primer paso para cumplir el objetivo fue amplificar los fragmentos de interés a partir de ADNc, para lo que se utilizaron los *primers* que se diseñaron específicamente para este trabajo en base a la secuencia de *E. multilocularis*. Los productos esperados tienen una longitud de 552pb para EgCRISP_A y 636pb para EgCRISP_I.

Para la optimización de la reacción de PCR, se ensayaron diferentes condiciones hasta lograr la amplificación de los fragmentos codificantes de EgCRISP_A y EgCRISP_I utilizando como molde distintas preparaciones de ADNc realizadas en el laboratorio a partir de distintos estadios de desarrollo del organismo. También a partir de ADNg de *E. granulosus*.

Se comenzó siguiendo el programa 1 descrito en la tabla 2 (pág. 13) utilizando la enzima *Taq polimerasa de Invitrogen*, según las condiciones de la tabla 1 (pág. 13). Este primer intento fue ensayado con ADNc de protoescolices pepsinados (PEP) y con ADNc de protoescolices (PS) de *E. granulosus*. Este ensayo se puede visualizar en la Figura 5, en la cual se observaron productos de PCR que dado su tamaño podrían corresponder a la amplificación del ADNg presente en la muestra. Los tamaños de amplificación de fragmentos correspondientes a genómico serían para EgCRISP_A 851pb y para EgCRISP_I 1071pb. Si bien se observó una diferencia de tamaño de los productos que corresponden a dos moldes diferentes de EgCRISP_A, pudo deberse a que el ADNg presente en la muestra de ADNc de protoescolices de *E. granulosus* estuviera en parte degradado.

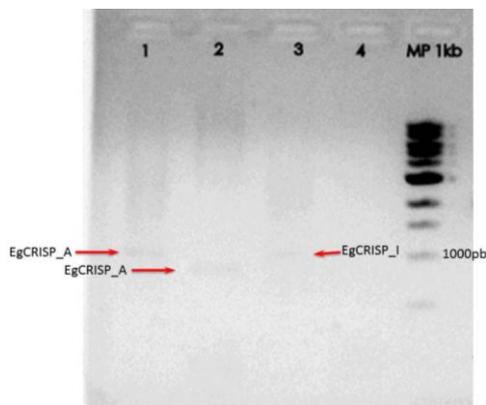


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Productos de PCR. 1: PCR con *primers* de EgCRISP_A con ADNc de PEP; 2: PCR con *primers* de EgCRISP_A con ADNc PS; 3: PCR con *primers* de EgCRISP_I con ADNc PEP; 4: PCR con *primers* de EgCRISP_I con ADNc de PS. Utilizando un volumen de cada muestra de 10µL y 6 µL de MPM 1kb de Fermentas.

Dada la ausencia de productos con el tamaño esperado en la reacción de PCR que fue realizada en primera instancia, se procedió a la realización de un segundo intento con la misma enzima y utilizando el programa 2 de la tabla 2 (pág. 13). Para este ensayo se utilizaron como molde las reacciones de PCR con ADNc de PEP mencionada anteriormente y ADNc de protoescolices de *E. granulosus*. En este experimento se observaron productos con el tamaño esperado en las reacciones correspondientes a las reamplificaciones, mientras que en el caso del molde de

protoescólicas sin pepsinar no se observaron productos con el tamaño de interés (Figura 6). La figura muestra que la banda obtenida para EgCRISP_I en la reamplificación fue de menor tamaño que el esperado, y que los productos de PCR obtenidos en protoescólicas sin pepsinar podrían ser debido a la presencia de ADNg en el molde utilizado.

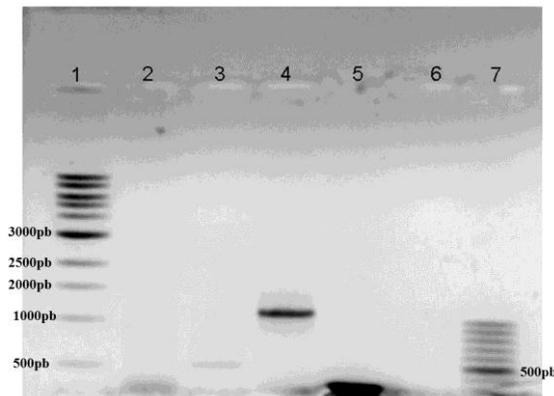


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1%. 1: MPM 1kb de Fermentas; 2: PCR con *primers* de EgCRISP_A con ADNc de PS; 3: reamplificación con *primers* de EgCRISP_A; 4: PCR con *primers* de EgCRISP_I con ADNc de PS; 5: reamplificación con *primers* de EgCRISP_I; 6: control negativo con agua; 7: MPM 100pb de Fermentas. Utilizando un volumen de cada muestra de 10 μ L y 6 μ L de cada MPM.

Dado el tamaño menor del producto de PCR correspondiente a EgCRISP_I se decidió realizar un nuevo ensayo de PCR, el cual fue realizado utilizando la enzima *uTaq* polimerasa de SBS, cuyas condiciones se resumen en la tabla 1 utilizando el programa 2 de la tabla 2 (pág. 13). En este ensayo se utilizó como molde un ADNc nuevo realizado en el laboratorio a partir de ARNm de PEP de *E. granulosus*, se reamplificó nuevamente a partir de la primera reacción de PCR realizada y también se utilizó como molde ADNg de *E. granulosus* para verificar que los productos que se habían obtenido de mayor tamaño anteriormente correspondían a tamaños genómicos de EgCRISP_A y EgCRISP_I. Como se puede observar en la Figura 7, el producto de PCR obtenido en el caso de EgCRISP_I utilizando el ADNc nuevo como molde es del tamaño esperado (636pb), si bien se pueden observar otras bandas la de mayor intensidad es la de nuestro interés. En el caso de la reamplificación se siguió obteniendo un producto de tamaño menor para EgCRISP_I y para EgCRISP_A se obtuvieron varias bandas, pudiéndose destacar las dos bandas mayoritarias, de las cuales la de menor tamaño parecería ser la de nuestro interés mientras que la de mayor tamaño puede corresponder al tamaño genómico de EgCRISP_A, comparándolo con los resultados obtenidos en la amplificación de ADNg con los *primers* de EgCRISP_A.

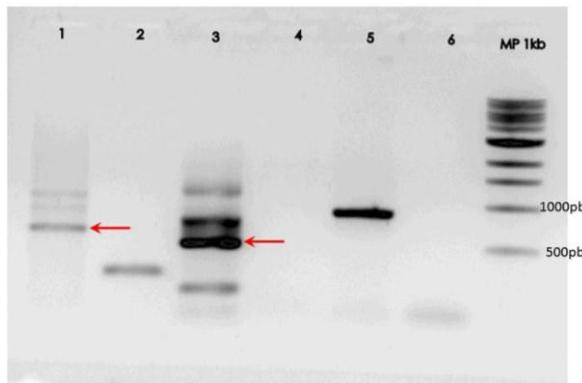


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa 1% 1: PCR con *primers* de EgCRISP_I con ADNc nuevo de PEP; 2: reamplificación con *primers* de EgCRISP_I; 3: reamplificación con *primers* de EgCRISP_A; 4: PCR con *primers* EgCRISP_I con ADNg de *E. granulosus*; 5: PCR con *primers* de EgCRISP_A con ADNg de *E. granulosus*; 6 control negativo con agua; 7 MPM 1kb de Fermentas. Utilizando un volumen de cada muestra de 10 μ L y 6 μ L de cada MPM.

Clonado en vector T: ligación y transformación

Como se obtuvo poca cantidad de los productos de PCR, se decidió purificarlos directo de la reacción y seleccionar luego de la transformación las colonias con inserto de interés. Para la purificación se utilizó el *Gel Extraction kit* de BIORON como se mencionó en la sección materiales y métodos (pág. 14). Luego de purificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 8).

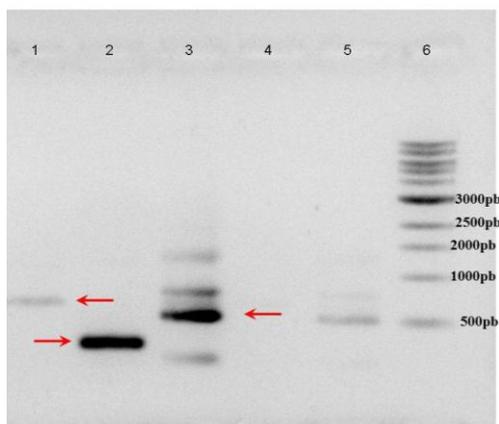


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa 1%. 1: primera elución de la reacción de PCR purificada de EgCRISP_I con ADNc de PEP; 2: primera elución de la reamplificación de EgCRISP_I; 3: primera elución de la reamplificación de EgCRISP_A; 4: segunda elución de la reacción de PCR purificada de EgCRISP_I con ADNc de PEP; 5: segunda elución de la reamplificación de EgCRISP_A; 6: MPM 1kb de Fermentas. Utilizando un volumen de cada muestra de 10 μ L y 6 μ L de cada MPM.

Se realizó la ligación y la transformación en la cepa de *E. coli* XL1 como se detalló anteriormente en la sección materiales y métodos (pág. 14). Los clones obtenidos de la transformación se denominaron pGem-CRAX para los clones transformados con el producto de ligación del vector y el fragmento de 552pb, EgCRISP_A, se denominó pGem-CRIX para los clones transformados con el producto de ligación del vector y el fragmento obtenido en la reamplificación de EgCRISP_I, y se denominó pGem-CRInX para los clones transformados con el vector T y el fragmento EgCRISP_I de 636pb obtenido de la reacción de PCR con el ADNc nuevo. Donde la X se corresponde al número de la colonia en la placa ordenada.

Por otra parte se realizó la ligación utilizando el vector pJet y la transformación de la cepa *E. coli* DH5 α como se detalló anteriormente en la sección materiales y

métodos (pág. 14). Esto se realizó dado que el vector pJet presenta sitios más adecuados para la restricción de nuestros insertos. Los clones obtenidos de la transformación se denominaron pJet-CRAX para aquellos clones transformados con el producto de ligación del vector y el fragmento EgCRISP_A de 552pb, se denominó pJet-CRInX para los para aquellos clones transformados con el producto de ligación del vector y el fragmento EgCRISP_I de 636pb obtenido en la reacción de PCR con el ADNc nuevo. Donde la X se corresponde al número de la colonia en la placa ordenada.

Búsqueda de transformantes con el vector T

Para la verificación de transformantes tanto para los clones obtenidos con pGem como los obtenidos con pJet, se realizó una PCR de colonias a partir de colonias ordenadas en placa obtenidas en la transformación, siguiendo las condiciones descritas en la sección materiales y métodos (pág. 14). Los resultados de la reacción de PCR para las colonias correspondientes a pGem se pueden visualizar en la Figura 9.

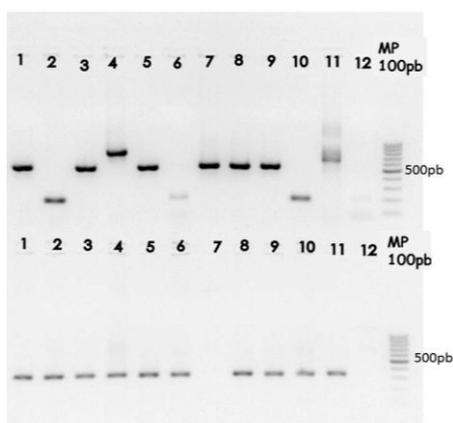


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Parte superior, 1 al 11: PCR de las colonias pertenecientes a pGem-CRA, 12: control negativo. Parte inferior, 1 al 11 PCR de las colonias pertenecientes a pGem-CRIn, 12: control negativo. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L y 4 μ L de cada MPM.

Dada la existencia de productos de diferentes tamaños en la reacción de PCR con los *primers* de EgCRISP_A (Figura 8) y en la posterior purificación directa de la reacción, era esperable obtener distintos clones que hubieran integrado el plásmido con los diferentes insertos (Figura 9). En base a este resultado se realizó la preparación de ADNp (Figura 10), siguiendo el protocolo descrito en la sección materiales y métodos (pág. 15). Para lo cual, se utilizaron diferentes colonias de pGem-CRI y se eligieron colonias de pGem-CRA con los diferentes tamaños de insertos visualizados a partir de la reacción de PCR de colonia.

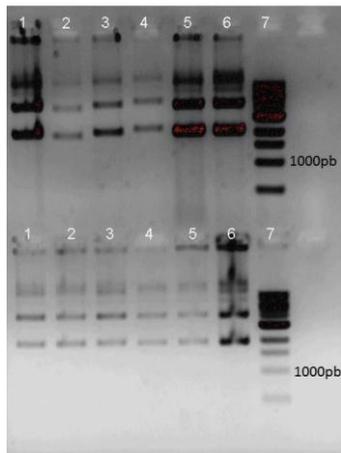


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Parte superior, 1 al 6: ADNp de las colonias pertenecientes a pGem-CRA. Parte inferior, 1 al 6: ADNp de las colonias pertenecientes a pGem-CRI. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L y 6 μ L de cada MPM

Una vez obtenido el ADNp se realizaron digestiones de estos ADN con la enzima *EcoRI* (Figura 11) está enzima presenta sitios de restricción en la región que flanquea al inserto y por tanto produce su liberación, lo que permitió visualizar su tamaño. La digestión se realizó según condiciones descritas en la sección materiales y métodos (pág. 15). A pesar de observar que hubo degradación del ADNp en la digestión es posible visualizar que el ADNp de las colonias de pGem-CRA pertenecientes a los clones 6 y 9 liberaron inserto con el tamaño de interés (552pb).

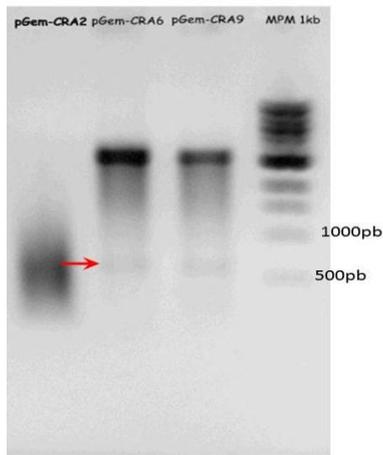


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Digestión con *EcoRI* del ADNp de tres diferentes colonias pertenecientes a pGem-CRA. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L y 6 μ L de cada MPM

Luego se realizó preparación de ADNp de las tres colonias de pGem-CRA (pGem-CRA2, pGem-CRA6 y pGem-CRA9) utilizando el *kit Ron's Plasmid Mini kit* de BIORON y se enviaron a secuenciar los plásmidos con el inserto para verificar su identidad.

Cabe destacar que este mismo procedimiento fue realizado para los clones que fueron transformados con el vector pJet.

Clonado en vector pPicZaA: ligación y transformación

En aquellas construcciones en las que fue confirmada la identidad de los insertos, se procedió a liberar los insertos con las enzimas *EcoRI* y *SallI*, cuyos sitios de

restricción fueron incluidos en la secuencia cuando se diseñaron los *primers*, como se mencionó en la sección materiales y métodos. La doble digestión se realizó siguiendo las condiciones descritas previamente en la sección materiales y métodos (pág. 16). El primer intento de liberación del inserto dio como resultado la degradación del mismo. Esto hizo necesario realizar diferentes pruebas de digestión con una u otra enzima para dilucidar cuál de estas era responsable de la degradación. Las pruebas que se realizaron consistieron en, incubar el plásmido en la mezcla de reacción pero sin las enzimas, o incubar el plásmido con una u otra enzima a 37°C durante 2h, lo que dio como resultado que la enzima *EcoRI* era la responsable de la degradación, por lo que se decidió probar con una enzima *EcoRI* procedente de otro laboratorio, con la cual no se observó degradación (no se muestra). Una vez resuelto este problema y obtenido el inserto, este fue ligado al plásmido de expresión pPicZαA y se procedió a transformar.

En una primera instancia se transformó utilizando el vector ligado al inserto correspondiente a EgCRISP_A en la cepa XL1 de *E. coli*, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en la sección materiales y métodos (pág. 14). Durante la búsqueda de transformantes (que se detalla a continuación), fue necesario cambiar la cepa en la que se transformó al principio, dado que el plásmido que se obtenía era degradado durante las digestiones. Por esta última razón se procedió a transformar nuevamente en la cepa DH5α de *E. coli*, siguiendo el protocolo descrito en la sección materiales y métodos (pág. 14) y utilizando el vector de expresión pPicZαA con el inserto EgCRISP_A y con el inserto EgCRISP_I.

Los clones obtenidos de la transformación se denominaron pPic-CRAX para los clones transformados el producto de ligación del vector y el fragmento de 552pb, EgCRISP_A, se denominó pPic-CRIX el producto de ligación del vector y los fragmentos de 636pb obtenidos de la reacción de PCR con el ADNc, EgCRISP_I. Donde la X se corresponde al número de la colonia en la placa ordenada.

Búsqueda de transformantes con el vector pPicZαA

Para la verificación de la identidad de las transformantes obtenidas de la transformación de XL1 con EgCRISP_A en pPicZαA, se procedió a realizar la preparación a pequeña escala de ADNp según protocolo descrito en la sección materiales y métodos. Una vez obtenido el ADNp se realizó la digestión del mismo, utilizando las enzimas *EcoRI* y *SalI* presentes en los *primers*, que liberan al inserto del vector de expresión. La digestión se realizó siguiendo las condiciones descritas en la sección materiales y métodos (pág. 16). Durante la realización de la digestión se observó la degradación completa del plásmido, por lo que se decidió como alternativa de búsqueda realizar PCR. Esta fue realizada utilizando el programa 2 de la tabla 2 y siguiendo las condiciones para la enzima *uTaq polimerasa* descritas en la tabla 1 en la sección materiales y métodos. El resultado de este PCR se puede observar en la Figura 12.

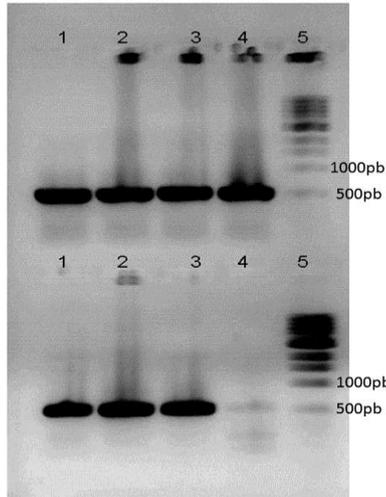


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Parte superior 1 al 4: PCR correspondiente a las colonias 1 a 4 de pPic-CRA; 5: MPM 1kb de Fermentas. Parte inferior, 1; PCR para a la colonia 7 de pPic-CRA; 2: PCR para la colonia 8 de pPic-CRA; 3: control positivo con ADNp de pGem-CRA secuenciado; 4: control negativo con agua; 5: MPM 1kb de Fermentas. Utilizando un volumen de cada muestra de 10 μ L y 6 μ L de cada MPM.

Si bien el producto de PCR presenta el tamaño esperado, la degradación del plásmido en esta cepa hizo difícil trabajar con este. Por el motivo descrito anteriormente se procedió a transformar con el plásmido pPic-CRA y pPic-CRI en la cepa DH5 α de *E. coli*. La búsqueda de las transformantes fue realizada nuevamente mediante la preparación de ADNp a pequeña escala, según protocolo de la pág. 15. Luego el ADNp fue digerido por las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI* como se describe anteriormente (pág. 16), la electroforesis de la reacción de digestión se puede observar en la Figura 13, donde se pueden identificar los insertos presentes en los ADNp de las distintas colonias, excepto para los pocillos 1 parte superior y 3 parte inferior de la figura donde no fue posible observar el plásmido.

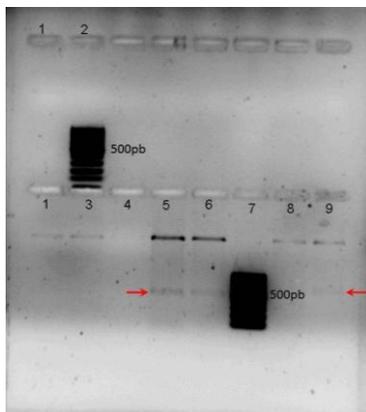


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Digestión con *EcoRI* y *SalI* del ADNp de diferentes colonias pertenecientes a pPic-CRA y pPic-CRI. Parte inferior, 1 al 6: ADNp digerido de colonias pertenecientes a pPic-CRA; 7: MPM 100pb de Fermentas; 8 y 9: ADNp de colonias de pPic-CRI. Parte superior, 1: ADNp de un clon de pPic-CRI; 2: MPM de 100pb de Fermentas. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L y 6 μ L de MPM

Los clones obtenidos también fueron verificados por PCR de colonia en la cual se siguió las condiciones descritas en la sección materiales y métodos. Los resultados de la reacción de PCR se pueden visualizar en la Figura 14.

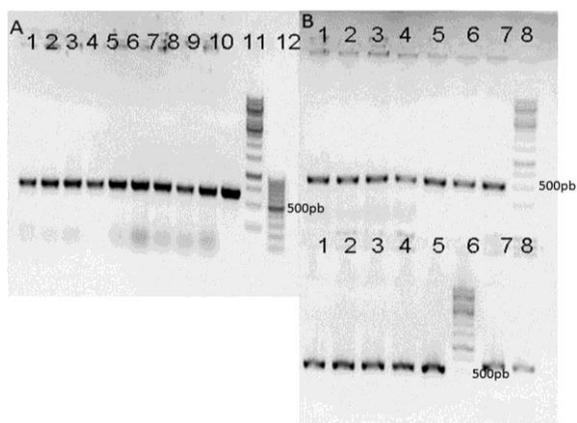


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa 1%. PCR de las diferentes colonias pertenecientes a pPic-CRA y pPic-CRI. A) 1 al 10: PCR para colonias con el inserto EgCRISP_I, 11: MPM 1kb Fermentas; 12: MPM 100pb de Fermentas. B) Parte superior, 1 al 7: PCR para colonias con el inserto EgCRISP_A; 8: MPM 1kb de Fermentas. Parte inferior, 1 al 5: PCR para colonias con el inserto EgCRISP_A; 6: MPM 1kb de Fermentas; 7 y 8: PCR de colonias con el inserto EgCRISP_I. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L y 6 μ L de MPM

Como se puede observar en la Figura 14 todas las colonias analizadas amplificaron una banda del tamaño esperado usando la reacción de PCR. Dado este resultado se realizó preparación de ADNp utilizando el *kit AxyPrep plasmid Midiprep* de Axygen, siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el ADNp fue precipitado (siguiendo las condiciones descritas en la sección materiales y métodos pág. 17) ya que para ser utilizado para transformar *P. pastoris* es necesario que este disuelto en agua. Al ADNp obtenido se le midió la concentración en un *Nanodrop* y los valores obtenidos se resumen en la tabla 11.

Tabla 11: Resumen de las medidas de absorbancia (A) de las diferentes preparaciones de ADNp.

ADNp de la colonia	A ($\lambda=260\text{nm}$)	A ($\lambda=280\text{nm}$)	Coef. 260/280	Coef. 260/230	Concentración ng/ μ L
pPicZA	3.391	1.82	1.86	2.1	169.5
pPicZaA	2.264	1.198	1.89	1.85	113.1
pPic-CRI1	2.039	1.103	1.85	1.74	101.9
pPic-CRA27	2.544	1.382	1.84	1.62	127.2

Una vez obtenida la concentración de cada ADNp se realizó la digestión del mismo con la enzima *Sst/SacI* según condiciones descritas en la sección materiales y métodos. Los resultados de la digestión se observan en la Figura 15. Como se puede apreciar en la Figura la digestión obtenida no fue completa por lo que se procedió a cortar la banda de interés de un gel y purificarla utilizando el *Gel Extraction kit BIORON*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de purificado se cuantifico aproximadamente la concentración del ADNp en comparación con un marcadores de concentración conocida, a partir de un gel de agarosa 1% correspondiente a la Figura 16.

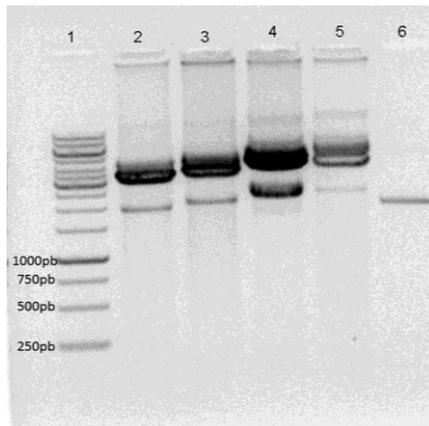


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Digestión con *Sst/SacI* de ADNp. 1: MPM de 1kb de Fermentas; 2: plásmido pPicZA; 3: plásmido pPicZαA; 4: plásmido de pPic-CRA27; 5: plásmido de pPic-CRI1; 6: plásmido sin digerir de pPicZαA. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μL y 6 μL de MPM

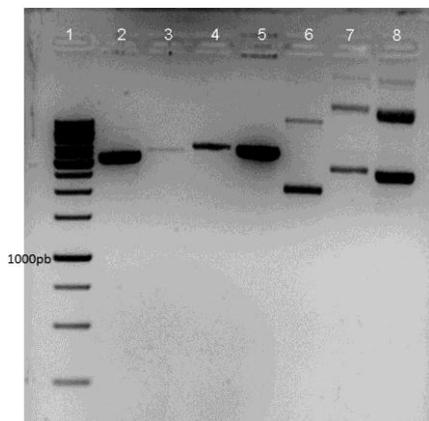


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Purificación de plásmidos linealizados. 1: MPM de 1kb de Fermentas; 2: plásmido pPicZA; 3: plásmido pPicZαA; 4: plásmido de pPic-CRI1; 5: plásmido de pPic-CRA27; 6: plásmido sin digerir de pPicZA diluido 1/10; 7: plásmido sin digerir de pPic-CRI1 diluido 1/10; 8: plásmido sin digerir de pPic-CRA27 diluido 1/10. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μL para las diluciones de ADNp sin digerir, 1 μL para los ADNp digeridos y 6 μL de MPM

Transformación en *P. pastoris*

Para transformar en *P. pastoris* se procedió según el protocolo de electroporación del manual *EasySelect™ Pichia Expresión Kit*. La transformación fue realizada con los ADNp linealizados de pPicZA, pPicZαA, pPic-CRA y pPic-CRI, utilizando 10 μL de cada uno de estos. A pesar de esto solo se obtuvieron transformantes correspondientes a pPic-CRA y pPic-CRI. Al siguiente día de realizada la transformación se observaron colonias de *P. pastoris* transformantes y se observó crecimiento en los controles de viabilidad (descritos en la sección materiales y métodos pág. 17). Luego de 5 días se ordenaron en placa de YPD las colonias que correspondían a transformantes que habían crecido hasta el momento. Las placas de transformación se dejaron creciendo hasta cumplidos los 10 días como indica el manual. De la transformación se obtuvieron un total de 24 transformantes para pPic-CRA (número de colonias en placa ordenada de 1 a 14 y de 20 a 29) y de 5 transformantes para pPic-CRI (número de colonias en placa ordenada de 15 a 19) (tabla 12). Las transformantes obtenidas se denominaron CRAX y CRIX, donde la X hace referencia al número de la colonia en la placa ordenada. CRA hace referencia a aquellas que presentan el inserto

EgCRISP_A, mientras CRI hace referencia a aquellas que presentan en inserto EgCRISP_I.

Tabla 12: resumen de colonias transformantes obtenidas para EgCRISP_A y EgCRISP_I

	Nº de transformantes	Nº de las colonias en placa
EgCRISP_A	24	1-14 y 20-29
EgCRISP_I	5	15-19

Verificación de que los clones Zeocina resistentes obtenidos presenten el inserto de interés

Para verificar la integración al genoma de *P. pastoris* de las construcciones con el péptido señal para su excreción se realizó la preparación de ADNg de las levaduras, según protocolo descrito en materiales y métodos (pág. 17). Una vez obtenido en ADNg se realizó su visualización en gel de agarosa 1% para cotejar su integridad, como se observa en la Figura 17.

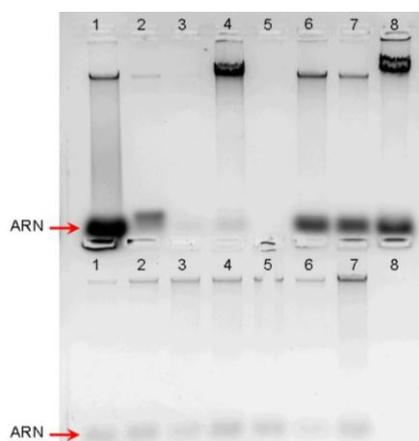


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Para visualizar la preparación de ADNg de las levaduras transformantes obtenidas. Parte superior, 1 al 8: ADNg de los clones del 1 al 8. Parte inferior, 1 al 7: ADNg de los clones del 9 al 16. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L.

Como se puede observar en la Figura 17 los ADNg estaban íntegros, pero algunos de ellos presentaban importantes cantidades de ARN. Luego de obtenidos los ADNg estos se usaron como molde para realizar una reacción de PCR, esto último se realizó para verificar la presencia del inserto de interés. La reacción fue llevada a cabo siguiendo las condiciones correspondientes a la enzima *uTaq polimerasa* de la tabla 8 y el programa 3 de la tabla 9 de la sección materiales y métodos (pág. 18). Si bien en el gel del ADNg no se visualizó ADNg para las colonias CRA3, CRA5 y CRI16 estos ADNg igualmente fueron utilizados como molde en la reacción de PCR. El resultado obtenido luego de la reacción de PCR se puede visualizar en la Figura 18.

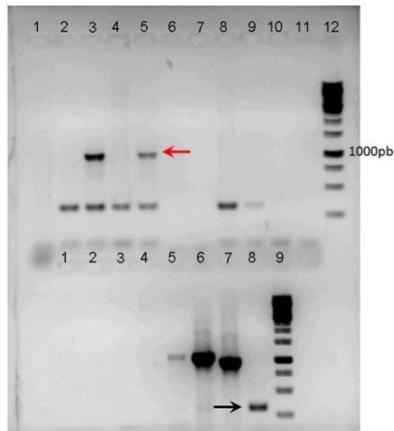


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Para visualizar las reacciones de PCR de los ADN_g de las colonias transformantes. Parte superior, 1 al 11: PCR para los clones del 1 al 11; 12: MPM 1kb de Fermentas. Parte inferior, 1 al 5: PCR para los clones del 12 al 16; 6: control positivo PCR con ADN_p diluido 1/10 de pPic-CRI; 7: control positivo PCR con ADN_p diluido 1/10 de pPic-CRA; 8: control negativo con agua; 9: MPM 1kb de Fermentas. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L y para cada MPM un volumen de 6 μ L.

Como se puede observar en la Figura 18, las reacciones de PCR en las que se observa una banda del tamaño esperado fueron aquellas en las que parecía no haber ADN_g. Esto podría deberse a un exceso de ADN molde en la reacción de PCR por esta razón se decidió realizar una nueva PCR en la cual se utilizó una dilución 1/100 de los ADN_g. En esta última se observan bandas para todas las reacciones excepto las que correspondían a las colonias CRA10 y CRI19 (datos no mostrados). Por otro lado y refiriéndonos a la Figura 18, se pudo observar una banda en el control negativo de tamaño menor a las de interés, que pudo deberse a una contaminación en los *primers*, como su tamaño es visiblemente menor al de la banda de interés se considera como resultados negativo de la reacción de PCR.

Para confirmar la identidad de los productos obtenidos en la reacción de PCR se realizó una búsqueda de una enzima que cortara ambas secuencias de modo tal que diera fragmentos distinguibles en un gel de agarosa utilizando el programa *CHROMAS*. Esta búsqueda nos llevó a realizar una digestión con la enzima *AvaII*. Esta enzima corta a la secuencia EgCRISP_A de modo tal que se obtienen dos fragmentos uno de 371pb y otro de 610pb, y para EgCRISP_I se obtienen dos fragmentos uno de 305pb y otro de 831pb (Figura 19). La digestión se realizó siguiendo las condiciones de la tabla 9 de la sección materiales y métodos.

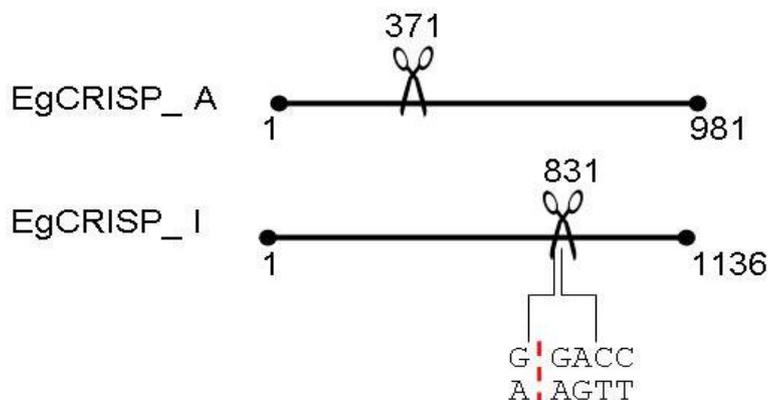


Figura 19: Esquema de restricción de *AvaII* en las secuencias de EgCRISP_A y EgCRISP_I

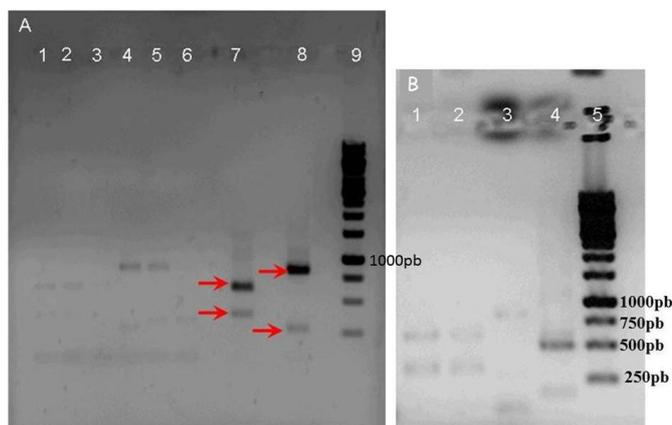


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Para visualizar la digestión con *AvaII* de los productos de PCR de los ADN_g de las colonias transformantes. A) 1: producto de PCR digerido de la colonia CRA1; 2: producto de PCR digerido de la colonia CRA6; 3: producto de PCR digerido de la colonia CRA7; 4: producto de PCR digerido de la colonia CRI15; 5: producto de PCR digerido de la colonia CRI17; 6: producto de PCR digerido de la colonia CRI18; 7: ADN_p digerido de pPic-CRA cuyos productos se marcan con flechas rojas; 8: ADN_p digerido de pPic-CRI cuyos productos se marcan con flechas rojas; 9: MPM 1kb de Fermentas. B) 1: producto de PCR digerido de la colonia CRA3; 2: producto de PCR digerido de la colonia CRA5; 3: producto de PCR digerido de la colonia CRI16; 4: ADN_p de pPic-CRA; 5: MPM 1kb de Fermentas. Utilizando un volumen de cada muestra de 5 μ L y para cada MPM un volumen de 6 μ L.

En la Figura 20 pudimos observar la presencia de bandas con el tamaño esperado lo que nos estaría confirmando la identidad de los productos obtenidos por PCR. Dado lo anterior pudimos concluir que teníamos colonias de *P. pastoris*, que habían integrado nuestro inserto de interés en su genoma lo que nos permitió realizar los primeros ensayos de expresión.

Ensayos de expresión en *P. pastoris*

La realización de los ensayos de expresión, fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito para el fenotipo Mut⁺ según indica el manual *EasySelect™ Pichia Expresión Kit*. Se cambió únicamente que previo a la inoculación del matraz de 25mL, se realizó un pre-cultivo de 5mL a partir del cual se inoculó el matraz de 25mL. Para inocular el matraz de 25 mL se realizó la medida de la densidad óptica a 600nm, de modo de poder determinar de forma aproximada con que volumen del pre-cultivo inocular el matraz de 25mL para que esté a la densidad óptica (DO) deseada (2 a 6 según se indica en el manual) en determinado momento del día. Este cálculo se realizó considerando que el tiempo de duplicación de las células era de 2hs.

Para la realización del ensayo se utilizaron como controles dos cepas de *P. pastoris* incluidas en el kit. Una de ellas denominada GS115 Mut^s albumina (HSA), la cual secreta albúmina al medio (67kDa) y la otra GS115/pPICZ/lacZ Mut⁺ (LacZ) que produce lacZ (119kDa) intracelular. Se realizaron dos ensayos de expresión y en ambos casos se decidió utilizar medio completo con buffer (BMGY/BMMY). El primer ensayo se realizó con 0,5% de metanol y el segundo con 2% de metanol.

Tabla 13: medidas de DO a 600nm de longitud de onda para los pre-cultivo de 5mL.

Muestras	Dilución 1/10	1/1
HSA	0,740	7,40
CRA	0,620	6,20
CRI	0,620	6,20
LacZ	0,780	7,80

Tabla 14: Medidas de DO a 600nm de longitud de onda para el matraz de 25mL de BMGY

Muestras	Dilución 1/10	1/1
HSA	0,860	8,60
CRA	0,525	5,25
CRI	0,750	7,50
LacZ	0,600	6,00

Tabla 15: Medidas de DO a 600nm de longitud de onda para DO de los diferentes días del ensayo de expresión.

Muestras	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
	Dilución 1/2	Dilución 1/50	Dilución 1/50	Dilución 1/50
HSA	0,497	0,310	0,242	0,275
CRA	0,454	0,273	0,339	0,320
CRI	0,493	0,060	0,218	0,266
LacZ	0,453	0,104	0,301	0,341

En el primer ensayo de expresión las muestras mostraban un color amarillo no característico de *Pichia* lo que nos indicaba que estaban contaminadas, por lo que se decidió terminar el ensayo en el día 3. Como se observó en la tabla 14 las medidas de DO para los cultivos correspondientes a HSA y CRI fueron mayores a las deseadas, a pesar de esto el desarrollo de los cultivos a lo largo del ensayo (tabla 15) no se vio afectado.

Tabla 16: Medidas de DO a 600nm de longitud de onda para los pre-cultivo de 5mL

Muestras	Dilución 1/10	1/1
HSA	0,026*	0,13
CRA	0,260	2,60
CRI	0,094	0,94

*La dilución de HSA fue de 1/5

Tabla 17: Medidas de DO a 600nm de longitud de onda para el matraz de 25mL de BMGY

Muestras	Dilución 1/10	1/1
HSA	0,430	4,30
CRA	0,419	4,19

Tabla 18: Medidas de DO a 600nm de longitud de onda para de los diferentes días del ensayo de expresión.

Muestras	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
	Dilución 1/10	Dilución 1/50				
HSA	0,855	0,322	0,310	0,385	0,268	0,291
CRA	1,052	0,272	0,359	0,331	0,219	0,245

En el segundo ensayo de expresión el cultivo correspondiente a CRI no llego a la DO deseada de 2 a 6 en el cultivo de BMGY, por lo que se decidió ensayar solo con CRA y HSA. Como se observa en la tabla 18 a partir del quinto día las medidas de DO para los cultivos disminuyeron con respecto al cuarto día. Esto nos sugiere que las levaduras comenzaron a morir.

Procesamiento de muestras y visualización de proteínas

Las muestras fueron procesadas tal como se indica en el manual *EasySelect™ Pichia Expresión Kit*. Luego de procesar las muestras de los diferentes días se realizaron geles de poliacrilamida según se describió en la sección materiales y métodos (pág. 19) para visualizar las proteínas. Los tamaños esperados para las proteínas eran de 21kDa para CRA sin péptido señal; 30,7kDa para CRA con péptido señal, y 25,1kDa para CRI sin péptido señal; 34,7kDa para CRI con péptido señal.

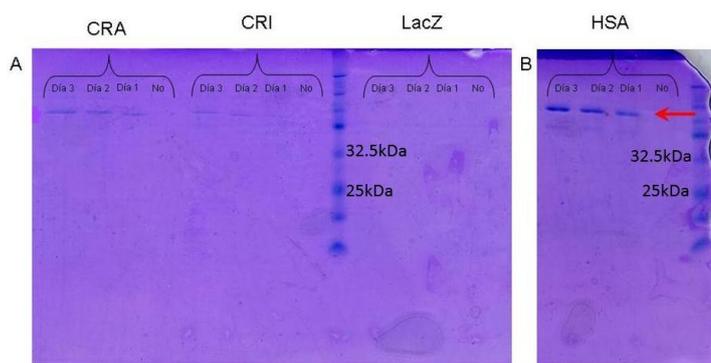


Figura 21: Proteínas de la fracción medio de la expresión en *P. pastoris* inducida con 0,5% de metanol. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 15% (*SDS-PAGE-15%*). A) corresponde a las fracciones medio de los diferentes días de CRA, CRI y LacZ donde se cargó 25 μ L de cada muestra y 12 μ L de MPM. B) corresponde a las fracciones medio de los diferentes días para HSA 25 μ L de cada muestra y 12 μ L de MPM.

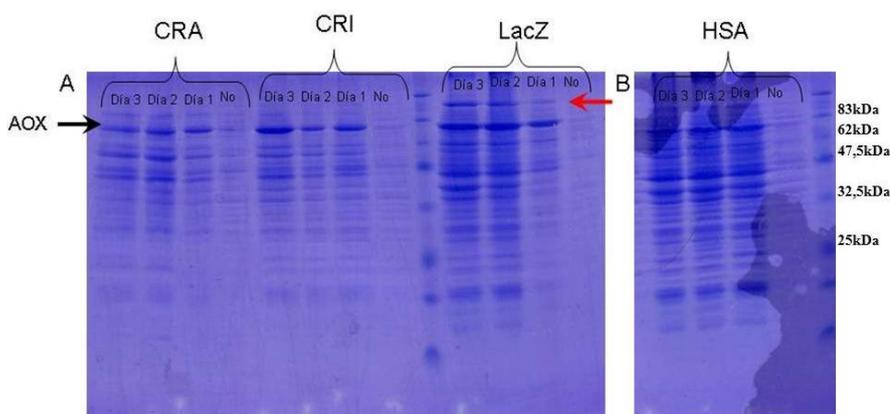


Figura 22: Proteínas de la fracción soluble de la expresión en *P. pastoris* inducida con 0,5% de metanol. Electroforesis desnaturalizante *SDS-PAGE-15%*. A) corresponde a las fracciones solubles de CRA, CRI y LacZ donde se cargó 25 μ L de cada muestra y 12 μ L de MPM. B) corresponde a las fracciones solubles de los diferentes días para HSA 25 μ L de cada muestra y 12 μ L de MPM.

Como se puede observar en la Figura 21B hubo expresión para el control correspondiente a HAS que se señala con la flecha roja, pero sin embargo no se visualizaron en la parte A de la Figura proteínas del tamaño esperado para CRA y CRI. Una posibilidad es que las proteínas no estuvieran siendo secretadas por lo que se realizó el gel correspondiente a las fracción soluble (Figura 22), pero aun en este no se visualizaron proteínas con el tamaño esperado para CRA y CRI. Si se pueda observar claramente la expresión de LacZ intracelular y aparece una banda en todas la muestras que podría ser la proteína AOX (Figura 22 A). Alternativamente se pensó que estas

podrían encontrarse a una concentración menor a la sensibilidad del método, por lo que se realizó un *western blot* como se muestra en la Figura 23.

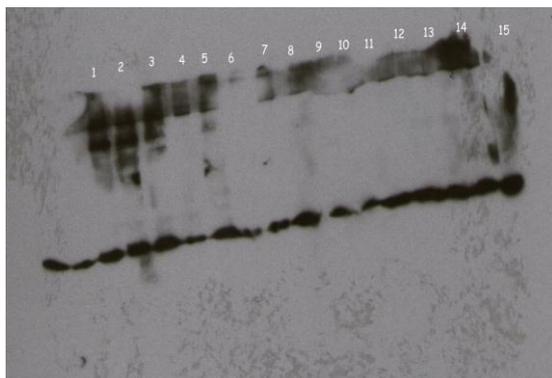


Figura 23: *Western blot* con anti-HIS. 1 al 3: los días 1 al 3 de la fracción soluble CRA; 4 al 6: del día no inducido (NI) al día 3 de la fracción soluble de CRI; 7 al 10: los días 1 al 3 de la fracción medio de CRA; 11 al 14: los días NI al día 3 de la fracción medio de CRI; 15: MPM.

En el experimento de *western blot* se pudo observar una señal en todas las muestras, la falta de marcador no permite asegurar que corresponda a las proteínas de interés, más allá del hecho de que aparecen dos señales a la izquierda del primer carril para las que no se pudo encontrar explicación. Dado este resultado se decidió realizar un segundo ensayo de *western blot*. Este último dio un resultado semejante al de la Figura 23 por lo cual se pensó que la señal podría corresponderse con las proteínas, y lo que estaría sucediendo es que no perderían su péptido señal al ser secretadas.

Para aumentar la cantidad de proteína expresada se realizó un segundo ensayo, en el cual se aumentó el metanol al 2% con el fin de aumentar la inducción. En este se esperaba poder visualizar las proteínas en el *SDS-PAGE*. A pesar del aumento de la concentración de metanol, no se observó proteínas con el tamaño de interés en los *SDS-PAGE*.

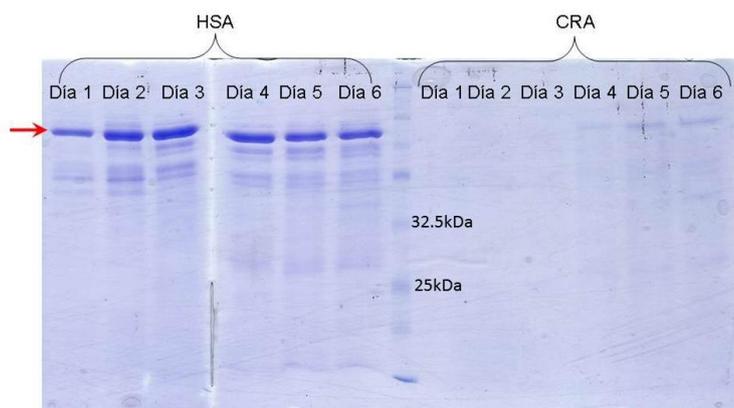


Figura 24: Proteínas de la fracción medio de la expresión en *P. pastoris* inducida con 2% de metanol. Electroforesis desnaturizante *SDS-PAGE*-15%. Corresponde a las fracciones medio de HSA y CRA donde se cargó 20 μ L de cada muestra y 12 μ L de MPM.

En este ensayo si se pudo visualizar la expresión de HSA (Figura 24) de la fracción medio. La presencia de HSA estaría indicando que la inducción estaba funcionando, a pesar de esto no se visualizó proteína del tamaño esperado para CRA y CRI. Si se puede observar, que la disminución de la DO del día 4 al 5 fue acompañado

de lisis celular, por esta razón se observaron mayor cantidad de proteínas en la fracción medio.

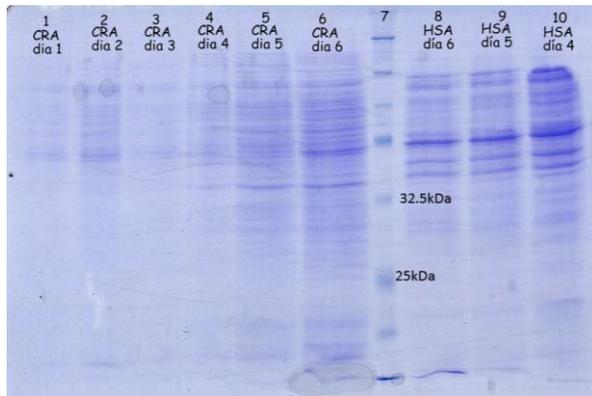


Figura 25: Proteínas de la fracción soluble de la expresión en *P. pastoris* inducida con 2% de metanol. Electroforesis desnaturizante *SDS-PAGE*-15%. Corresponde a las fracciones solubles de HSA y CRA donde se cargó 20 μ L de las diferentes muestras y 12 μ L de MPM.

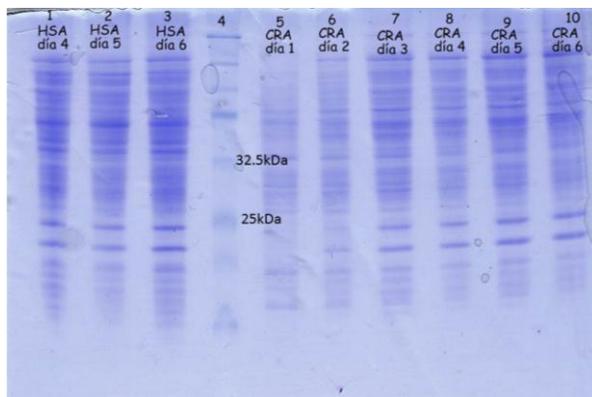


Figura 26: Proteínas de la fracción insoluble de la expresión en *P. pastoris* inducida con 2% de metanol. Electroforesis desnaturizante *SDS-PAGE*-15%. Corresponde a las fracciones insolubles de HSA y CRA donde se cargó 10 μ L de los diferentes días para CRA, 20 μ L para los días 4 y 6 de HSA, 10 μ L para el día 5 de HSA y 10 μ L de MPM.

Por otra parte en los *SDS-PAGE* correspondientes a las fracciones solubles e insolubles del segundo ensayo (Figuras 25 y 26) no se observó bandas que pudieran indicar expresión de las proteínas de interés lo que sugiere que a pesar del aumento en la concentración del metanol no hubo un aumento significativo de la expresión de la proteína.

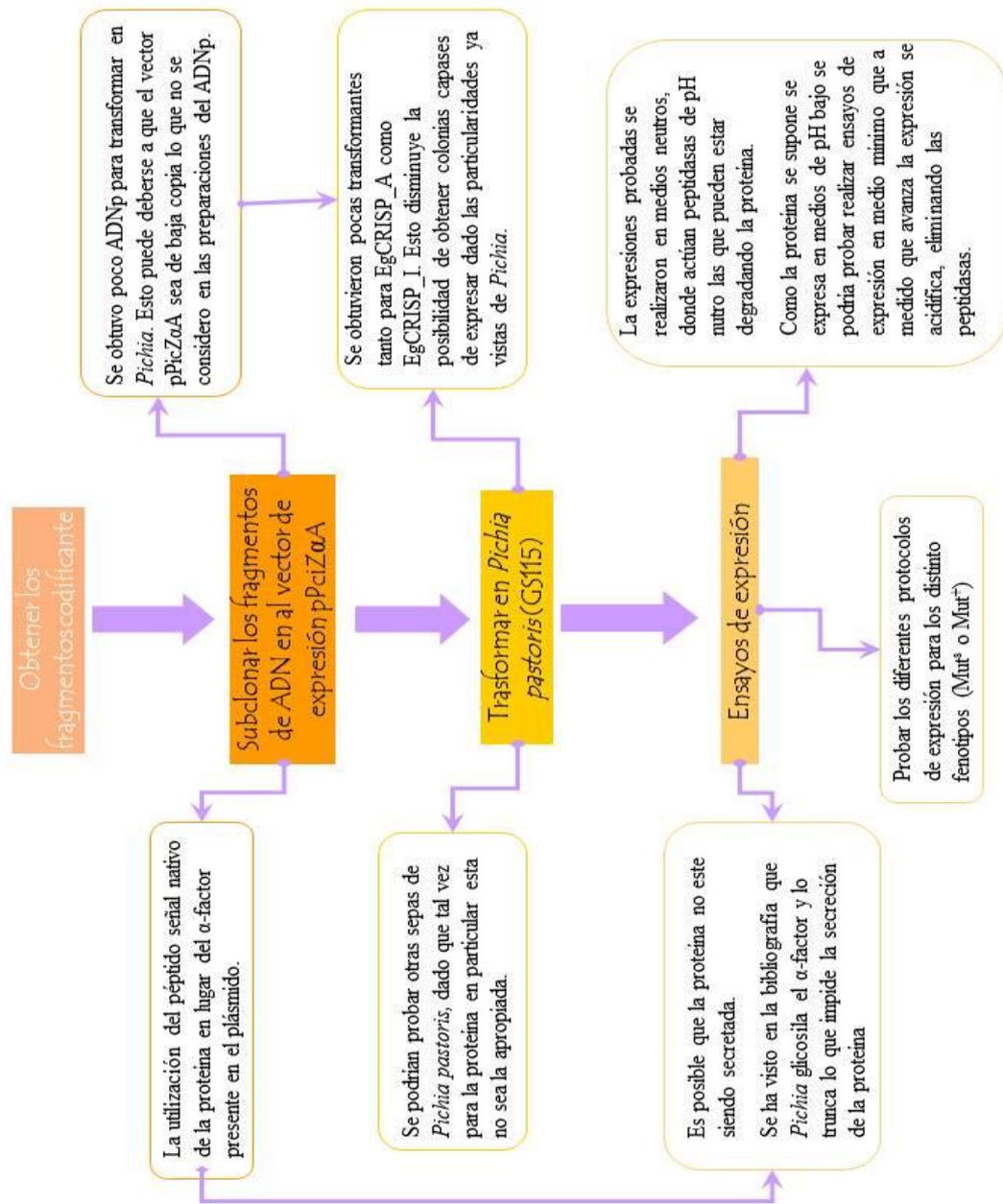


Figura 27: Esquema de posibles razones por las que la expresión en *P. pastoris* se pudo ver afectada, y puntos a mejorar y/o probar en experimentos futuros.

Conclusiones y perspectivas

Se logró obtener transformantes en *P. pastoris* que integraron el inserto de interés en su ADN_g. En base al resultado del *western blot* de la Figura 23, se puede pensar que hubo expresión de las proteínas CRA y CRI. Las proteínas fueron obtenidas a concentraciones bajas por lo que el proceso de expresión debe ser puesto a punto, para la producción a gran escala de la proteína. Por otra parte se debe continuar buscando condiciones de expresión para la proteína CRI. Las posibles razones por las que las proteínas no son expresadas se resumen en la Figura 27.

Se espera poder expresar ambas proteínas a gran escala para utilizarlas en el desarrollo de una vacuna anti-helmíntica. Para lograr la producción a gran escala de las proteínas es necesario develar que está sucediendo con las mismas dentro de las células, para esto nos basaremos en las hipótesis planteadas (Figura 27).

Como se mencionó anteriormente, estas proteínas parecen estar interviniendo en el proceso de invasión del parásito, por lo que sería de interés poder caracterizarlas y conocer sus posibles funciones. También estas proteínas pertenecen a una superfamilia de proteínas muy conservadas por lo que su caracterización estaría enriqueciendo el conocimiento de la misma. Por otra parte desde el punto de vista de herramientas moleculares la expresión en *P. pastoris* está siendo ampliamente utilizada, por lo que desarrollar este método para obtener mayor eficiencia en la producción de proteínas con modificaciones post-transcripcionales que no pueden ser obtenidas en *E. coli*, es de interés por su aporte a la biología molecular.

Referencias

- a Rogvi, R., R. Mathiasen, and G. Greisen. "Defining Smallness for Gestational Age in the Early Years of the Danish Medical Birth Registry." [In eng]. *PLoS One* 6, no. 1 (2011): e16668.
- Asojo, O. A., G. Goud, K. Dhar, A. Loukas, B. Zhan, V. Deumic, S. Liu, G. E. Borgstahl, and P. J. Hotez. "X-Ray Structure of Na-Asp-2, a Pathogenesis-Related-1 Protein from the Nematode Parasite, *Necator Americanus*, and a Vaccine Antigen for Human Hookworm Infection." [In eng]. *J Mol Biol* 346, no. 3 (Feb 25 2005): 801-14.
- Bethony, J. M., G. Simon, D. J. Diemert, D. Parenti, A. Desrosiers, S. Schuck, R. Fujiwara, H. Santiago, and P. J. Hotez. "Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Trial of the Na-Asp-2 Hookworm Vaccine in Unexposed Adults." [In eng]. *Vaccine* 26, no. 19 (May 2 2008): 2408-17.
- Bower, M. A., S. L. Constant, and S. Mendez. "Necator Americanus: The Na-Asp-2 Protein Secreted by the Infective Larvae Induces Neutrophil Recruitment in Vivo and in Vitro." [In eng]. *Exp Parasitol* 118, no. 4 (Apr 2008): 569-75.
- Britos, L., A. I. Lalanne, E. Castillo, G. Cota, M. Senorale, and M. Marin. "*Mesocestoides Corti* (Syn. *Vogae*, Cestoda): Characterization of Genes Encoding Cysteine-Rich Secreted Proteins (Crisp)." [In eng]. *Exp Parasitol* 116, no. 2 (Jun 2007): 95-102.
- Cereghino, J. L., and J. M. Cregg. "Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*." [In eng]. *FEMS Microbiol Rev* 24, no. 1 (Jan 2000): 45-66.
- Cleveland P. Hickman, Larry S. Roberts, Allan Larson. *Integrated Principle of Zoology*. 11 ed. 2001.
- Costáble, A. "Contribución Al Estudio De Las Proteínas Tipo Crisp En El Cestodo Parásito *Mesocestoides Corti*. Clonado Y Producción De La Proteína Mccrisp2 Recombinante. Tesina De Graduación." Sección Bioquímica - Facultad de Ciencias - UdelaR, 2009.
- Datu, B. J., R. B. Gasser, S. H. Nagaraj, E. K. Ong, P. O'Donoghue, R. McInnes, S. Ranganathan, and A. Loukas. "Transcriptional Changes in the Hookworm, *Ancylostoma Caninum*, During the Transition from a Free-Living to a Parasitic Larva." [In eng]. *PLoS Negl Trop Dis* 2, no. 1 (2008): e130.
- Fernandez, C., W. F. Gregory, P. Loke, and R. M. Maizels. "Full-Length-Enriched Cdna Libraries from *Echinococcus Granulosus* Contain Separate Populations of Oligo-Capped and Trans-Spliced Transcripts and a High Level of Predicted Signal Peptide Sequences." [In eng]. *Mol Biochem Parasitol* 122, no. 2 (Jul 2002): 171-80.
- Garcia, H. H., P. L. Moro, and P. M. Schantz. "Zoonotic Helminth Infections of Humans: Echinococcosis, Cysticercosis and Fascioliasis." [In eng]. *Curr Opin Infect Dis* 20, no. 5 (Oct 2007): 489-94.
- Gibbs, G. M., K. Roelants, and M. K. O'Bryan. "The Cap Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins--Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense." [In eng]. *Endocr Rev* 29, no. 7 (Dec 2008): 865-97.
- Goud, G. N., M. E. Bottazzi, B. Zhan, S. Mendez, V. Deumic, J. Plieskatt, S. Liu, *et al.* "Expression of the *Necator Americanus* Hookworm Larval Antigen Na-Asp-2 in *Pichia Pastoris* and Purification of the Recombinant Protein for Use in Human Clinical Trials." [In eng]. *Vaccine* 23, no. 39 (Sep 15 2005): 4754-64.

- Hewitson, J. P., J. R. Grainger, and R. M. Maizels. "Helminth Immunoregulation: The Role of Parasite Secreted Proteins in Modulating Host Immunity." [In eng]. *Mol Biochem Parasitol* 167, no. 1 (Sep 2009): 1-11.
- Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, B. A. CuChe, E. de Castro, C. Lachaize, P. S. Langendijk-Genevaux, and C. J. Sigrist. "The 20 Years of Prosite." [In eng]. *Nucleic Acids Res* 36, no. Database issue (Jan 2008): D245-9.
- Koziol, U., A. Costabile, M. F. Dominguez, A. Iriarte, G. Alvite, A. Kun, and E. Castillo. "Developmental Expression of High Molecular Weight Tropomyosin Isoforms in Mesocestoides Corti." [In eng]. *Mol Biochem Parasitol* 175, no. 2 (Feb): 181-91.
- Li, P., A. Anumanthan, X. G. Gao, K. Ilangovan, V. V. Suzara, N. Duzgunes, and V. Renugopalakrishnan. "Expression of Recombinant Proteins in Pichia Pastoris." [In eng]. *Appl Biochem Biotechnol* 142, no. 2 (Aug 2007): 105-24.
- Moyle, M., D. L. Foster, D. E. McGrath, S. M. Brown, Y. Laroche, J. De Meutter, P. Stanssens, *et al.* "A Hookworm Glycoprotein That Inhibits Neutrophil Function Is a Ligand of the Integrin Cd11b/Cd18." [In eng]. *J Biol Chem* 269, no. 13 (Apr 1 1994): 10008-15.
- Nolan, M. A., L. Wu, H. J. Bang, S. A. Jelinsky, K. P. Roberts, T. T. Turner, G. S. Kopf, and D. S. Johnston. "Identification of Rat Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) as the Ortholog to Human Crisp1 and Mouse Crisp4." [In eng]. *Biol Reprod* 74, no. 5 (May 2006): 984-91.
- Ramon, A., and M. Marin. "Advances in the Production of Membrane Proteins in Pichia Pastoris." [In eng]. *Biotechnol J* 6, no. 6 (Jun 2011): 700-6.
- Sean Gallagher, Scott E. Winston, Steven A. Fuller and John GR Hurrell. "Current Protocols in Molecular Biology." 10.8.1-10
8.24, 2004.
- Thompson, R. C. A. "Echinococcosis." Chap. 22 In *Principles an Practice of Clinical Parasitology*, edited by S. Gillespie and Richard D. Pearson. 585-94. Murdoch, Western Australia, 2001.
- Vinzon, S. E., M. L. Pirpignani, C. Nowicki, and M. Biscoglio de Jimenez Bonino. "Molecular Cloning and Expression in Pichia Pastoris of a Hypoallergenic Antigen 5." [In eng]. *Protein Expr Purif* 73, no. 1 (Sep 2010): 23-30.
- Zhan, B., Y. Liu, M. Badamchian, A. Williamson, J. Feng, A. Loukas, J. M. Hawdon, and P. J. Hotez. "Molecular Characterisation of the Ancylostoma-Secreted Protein Family from the Adult Stage of *Ancylostoma Caninum*." [In eng]. *Int J Parasitol* 33, no. 9 (Aug 2003): 897-907.