



Trabajo de Grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas:

# **CLONADO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA-QUINASA PK4 DE *LEISHMANIA MAJOR***

**Juan Andrés Imelio**

Orientadores: Dr. Alejandro Buschiazzi, Mag. Sofía Horjales

Unidad de Cristalografía de Proteínas

Institut Pasteur de Montevideo

Mayo 2014



*“Nos merecemos bellos milagros, y ocurrirán.”*

Carlos “Indio” Solari

*Quisiera dedicar este espacio al agradecimiento de todos/as aquellos/as que fueron parte no sólo de esta humilde redacción de resultados científicos, sino de un proceso académico de 5 años que nunca me voy a olvidar.*

*Agradecer, ante todo, a mi madre Mónica, mi padre Juan José, mi hermana Majo, mi hermano Santi y toda mi familia, quienes me vieron crecer con el sueño de convertirme en biólogo y me han dado todo para que pudiese concretarlo. A mi novia Flo, quien me da la fuerza para salir adelante cada día. Esta tesis es por, y para ellos.*

*A mis amigos compañeros de generación que estuvieron desde siempre y hemos compartido tanto, Mathi, Nati, Tute, Chechu, Cami, Analía, Esteban, Danaé, Fredy y a los que ya no los veo por los pasillos de facultad pero sí fuera de ella. A los que conocí después y les agradezco tanto como si hubiesen estado desde el primer día. Muchas gracias por todos estos años y por hacerme sentir como en casa todos los días.*

*A la selección de fútbol de Ciencias, a todos con quienes compartí ya sea grupo de trabajo de práctico, grupo de estudio para parciales o exámenes, salidas nocturnas, y a todos aquellos que en su momento fueron parte.*

*A la banda de mi calle, que siempre estuvo ahí y fue el motor de este trabajo: Gabriel, Ronald, Nachito, Esta, Turu, Peludo, Diego. A Puri, Sil, Lu Jazmín, Mateo, Baloo, Teti. Gracias por tantas cervezas y tantos momentos compartidos inolvidables.*

*A mis amigos del liceo, Nico K, Francisco, Mandu, Guille, Juanjo, Juan Manuel, y a todos los del otrora fútbol en Monte VI. A ellos, con quienes compartí parte de mi adolescencia, agradecido desde antes de haber siquiera entrado a Facultad de Ciencias.*

*A la gente de PXF, eternamente agradecido.*

*En primer lugar, me gustaría agradecer a Ale y Sofi, quienes me han orientado a lo largo de este proyecto, me han dado para adelante en todo momento y su ayuda ha sido imprescindible para la redacción de este trabajo. A Ale, no sólo por haber confiado en mí y abrirme las puertas de su laboratorio, sino también las puertas a la investigación científica. A Sofi, quien estuvo siempre a mi lado transmitiéndome sus enseñanzas, su buena onda y su paciencia. A Fabi, que me ha aguantado la cabeza en todo este tiempo y estuvo ahí cuando la necesité, muchísimas gracias. Este trabajo no hubiese sido posible sin ellos.*

*A los compañeros de laboratorio y de salita por toda la ayuda que me dieron y por la buena onda, Nicky, Nati, Lore, Gonza, Feli, Horacio, Ariel, Flor, Fede, Juli, J.P., Braulio, y a todo UPR y UBP, quienes también, cuando necesité una mano con cualquier cosa, por más mínima que sea, estuvieron allí; a Colo por las construcciones y los oligos, y a Flor por el material que me permitió guiarme durante la escritura de este trabajo.*

*A UByPA, al servicio de secuenciado, a la gente de recepción, lavadero, cantina, gestión científica... a todos quienes han colaborado con este proyecto y me han hecho sentir parte del Instituto.*

*Al Club Atlético Peñarol, mi religión desde chico. En la cancha se olvidan las frustraciones. A Vendedores De Humo, por las noches de rock and roll que fueron y que serán.*

*A la Dra. Beatriz Garat y el Dr. Pablo Opezzo por su tiempo y voluntad de integrar el tribunal evaluador. A todos aquellos quienes se tomaron la molestia de leer este trabajo, muchas gracias y a las órdenes.*

*En fin, perdón a TODOS los que no nombré, pero bien saben, son parte de todo esto. GRACIAS a todos por este sueño. Lo mejor siempre está por venir y esto es solo el comienzo.*

*Juan*

## ÍNDICE

RESUMEN	(1)
INTRODUCCIÓN	(2)
Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	(2)
Leishmaniasis visceral	(4)
Profilaxis y tratamiento: estado actual	(5)
Desarrollo racional de nuevos fármacos: la cristalografía de rayos X	(8)
MAP quinasas	(11)
MAP quinasas en <i>Leishmania</i>	(12)
PK4 como potencial blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos	(13)
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	(15)
MATERIALES Y MÉTODOS	(16)
Estrategia experimental	(16)
Protocolos específicos	(18)
Subclonado de la secuencia codificante de PK4 en vectores de expresión	(18)
Bioinformática	(20)
Expresión de PK4 en <i>Escherichia coli</i>	(21)
Fraccionamiento de proteínas solubles y evaluación del rendimiento por SDS-PAGE	(21)
Puesta a punto de la purificación de PK4 a homogeneidad	(22)
Inmunoensayos y espectrometría de masa	(23)
Rastreo preliminar de condiciones de cristalización	(24)
RESULTADOS	(25)
Construcciones recombinantes generadas y secuencia aminoacídica de PK4	(25)
Expresión y purificación de PK4 en vector pQE80	(25)
Expresión y purificación de PK4 en vector pET28a	(29)
Expresión y purificación de PK4 con fusión a DsbC	(29)
Rastreo preliminar de condiciones de cristalización de DsbC-PK4	(35)
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	(37)
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	(41)
ANEXO	(48)

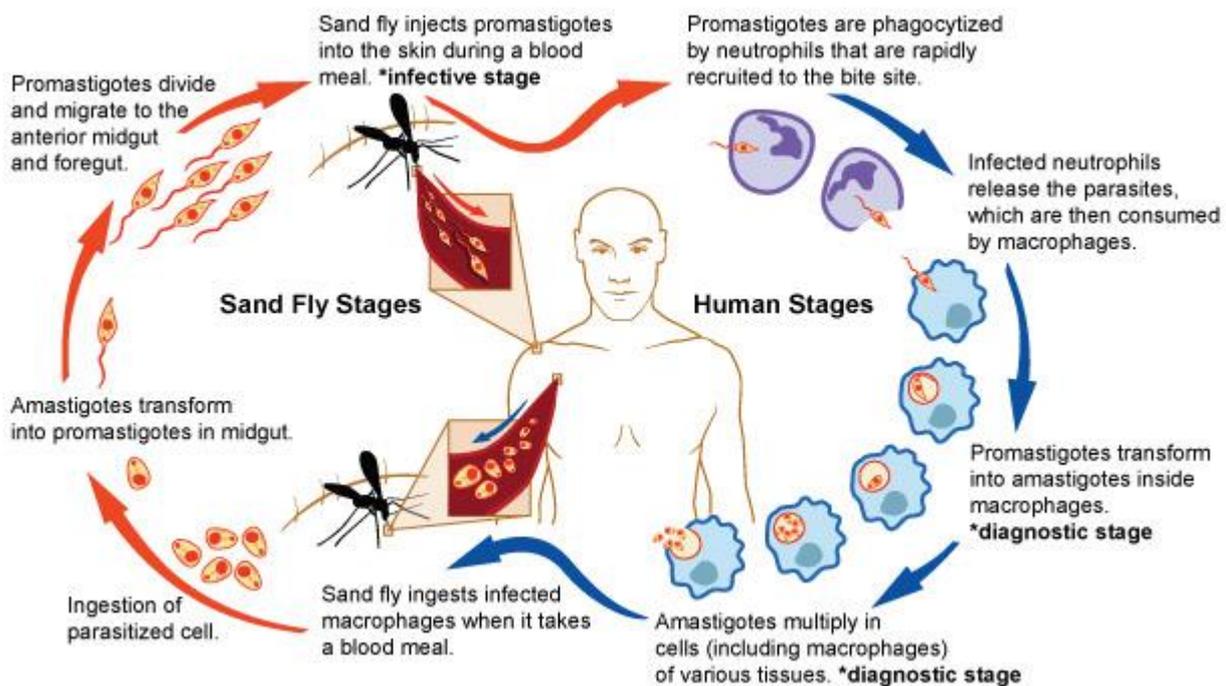
## RESUMEN

Las Ser/Thr protein-quinasas (STPKs) son moléculas ubicuas involucradas en la transducción de señales de procariotas y eucariotas. En los últimos años, han sido empleadas como blanco terapéutico de importantes enfermedades como cáncer, inflamación y diversas infecciones parasitarias. Este trabajo se centró en PK4, una STPK activada por mitógeno de *Leishmania*, un protozoo parásito de la familia Trypanosomatidae y agente etiológico de la leishmaniasis. Es una proteína esencial en *L. mexicana*, por lo que resulta un interesante blanco para el desarrollo de drogas anti-leishmánicas. El objetivo de este trabajo consistió en clonar, producir y purificar PK4 recombinante de *L. major* para luego realizar estudios estructurales mediante cristalografía de rayos X. Se clonó PK4 en los vectores de expresión pQE80 y pET28a de *Escherichia coli* mediante el método de clonado sin enzimas de restricción. Tras realizar ensayos de expresión en distintas cepas de *E. coli* y condiciones de inducción se logró sobreexpresar PK4, aunque mayoritariamente en forma insoluble. Al trabajar con un vector que permite la expresión de PK4 como fusión a la proteína disulfuro isomerasa DsbC de *E. coli*, se observó un aumento del rendimiento de expresión soluble de PK4. Se purificó DsbC-PK4 por cromatografía de afinidad y gel filtración, donde se vio que eluye de forma decamérica. La digestión de esta proteína de fusión con la proteasa TEV, resultó en la precipitación de PK4, por lo que la búsqueda preliminar de condiciones de cristalogénesis se realizó utilizando a PK4 fusionada a DsbC. Se realizaron rastreos de condiciones de cristalización con DsbC-PK4, lográndose identificar dos de los ensayos con crecimiento cristalino. Estos cristales fueron analizados por difracción de rayos X, revelando patrones propios de pequeñas moléculas, indicando en definitiva que los cristales obtenidos no contienen a la proteína de interés. Quedan claras las perspectivas de trabajo futuro apuntando a mejorar los protocolos de purificación y clivado de la proteína de fusión, procurando mejorar la homogeneidad y calidad de la proteína y así poder realizar una nueva búsqueda de condiciones de cristalogénesis.

## INTRODUCCIÓN

### Ciclo de vida de *Leishmania*

Las especies patógenas de *Leishmania spp.* son protozoos parásitos de la familia Trypanosomatidae. Estos seres unicelulares presentan un ciclo de vida digenético, alternando entre un estadio promastigota infectivo (flagelado y móvil) presente en el vector, y un estadio amastigota intracelular replicativo (sin flagelo e inmóvil) presente en mamíferos (Rodríguez *et al.*, 2011; Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Leishmania spp.* Fuente: McGwire & Satoskar, 2014.

*Leishmania* es transmitido por insectos flebótomos hematófagos de los cuales dos géneros diseminan la infección en distintas regiones del planeta: *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África), mientras que *Lutzomyia* es el principal vector en el continente americano (Saporito *et al.*, 2013). La hembra del flebótomo succiona sangre de mamíferos a modo de obtener soporte nutricional para sus huevos, y puede así alimentarse eventualmente de sangre con macrófagos infectados por células de *Leishmania* en el estadio amastigota. Una vez en el tracto digestivo del vector, se diferencian a promastigotas en la zona media del intestino y luego migran hacia la zona anterior donde colonizan, replican y se vuelven metacíclicos e infectivos. Se ha visto que el parásito secreta fosfoproteoglicanos en la diferenciación de amastigotas a promastigotas que condicionan el ambiente del tracto digestivo para la metaciclogénesis, haciendo resistentes a las formas procíclicas replicativas contra enzimas digestivas del insecto. Los fosfoproteoglicanos forman parte de un gel secretorio que obstruye el tracto digestivo del insecto, provocando la regurgitación de los promastigotas y facilitando su transmisión (Dostálová & Volf, 2012). Así, cuando el vector succiona sangre de un mamífero sano, los promastigotas metacíclicos son regurgitados e inoculados en el hospedero

definitivo. Adicionalmente, estudios anteriores han demostrado que *Leishmania* induce una manipulación comportamental sobre el flebótomo infectado, tanto por la secreción de estos fosfoproteoglicanos como por la cantidad de promastigotas metacíclicos presentes. Esto provoca un cambio en el comportamiento del vector que lo hace más persistente a la hora de alimentarse y lleva a una mayor transmisión del parásito a su hospedero definitivo (Rogers & Bates, 2007).

Los promastigotas metacíclicos de *Leishmania* pueden infectar roedores, caninos y seres humanos, actuando como parásitos intracelulares obligados de células del sistema reticuloendotelial, *i. e.* macrófagos, monocitos y células de Langerhans (Neuber, 2008), aunque se ha visto que en primera instancia pueden ser fagocitados por neutrófilos que son rápidamente reclutados hacia el sitio de inflamación en donde se alimentó el vector, funcionando como células hospederas temporales, permaneciendo allí por horas sin replicarse y manteniendo su infectividad (Peters *et al.*, 2008). En este contexto, se han postulado dos modelos no mutuamente excluyentes de explotación de neutrófilos por parte de *Leishmania*: el modelo del “caballo de Troya”, en el cual luego de que los neutrófilos infectados entran en apoptosis, los macrófagos ingieren por fagocitosis los cuerpos apoptóticos con el parásito, permitiendo así una entrada “silenciosa” del mismo al macrófago evitando que éstos activen sus mecanismos efectores vía receptores de membrana (van Zandbergen *et al.*, 2004); y el modelo del “conejo de Troya”, donde se indica que los promastigotas abandonan los neutrófilos antes de que éstos entren en apoptosis. Así, los neutrófilos apoptóticos silencian la respuesta efectora del macrófago hospedero prospecto, lo cual es explotado por los promastigotas oportunistas que luego infectarán activamente al macrófago (Ritter *et al.*, 2009). De cualquier manera, la capacidad de los neutrófilos de funcionar como mecanismo de evasión de la respuesta inmune depende del genoma del hospedero y la cepa del parásito, y siempre y cuando no exista una activación de su respuesta efectora (Ritter *et al.*, 2009).

Estudios por microscopía de alta resolución *in vitro* han permitido observar que el mecanismo de entrada de *Leishmania* al macrófago es un proceso activo que requiere una interacción adecuada del promastigota con la superficie de la célula hospedera prospecto, generalmente utilizando el extremo distal de su flagelo (Forestier, 2013). Una vez fagocitado y compartimentalizado en el fagosoma, el parásito pierde su flagelo y secreta lipoproteoglicanos que evitan el ensamblaje de la enzima NADPH oxidasa, reduciendo la exposición de los amastigotas a radicales libres (Lodge *et al.*, 2006) y excluyendo el reclutamiento de bombas de protones ATPasas a la membrana del fagosoma, evitando su acidificación (Vinet *et al.*, 2009). Estos mecanismos evitan la maduración del fagosoma y proveen a los amastigotas de un ambiente menos hostil para su supervivencia y proliferación. Además, las disfunciones de la actividad microbicida del macrófago infectado han sido correlacionadas con eventos de señalización alterados que resultan en un sesgo en el fenotipo de las células T colaboradoras de proinflamatorias (Th1) a antiinflamatorias (Th2) (Reiner & Locksley, 1995).

## Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis es un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por más de 17 especies diferentes de *Leishmania*, siendo transmitida entre mamíferos hospederos por insectos flebótomos (Croft *et al.*, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado a la leishmaniasis en la categoría de enfermedades desatendidas para la cual no hay vacuna ni tratamiento eficaz, seguro y asequible disponible, con 350 millones de personas consideradas en riesgo de contraer la enfermedad, un total de 12 millones de personas actualmente infectadas en 98 países, y 2 millones de casos nuevos estimados cada año (Saporito *et al.*, 2013). Las enfermedades causan tres síndromes principales en el ser humano, cuyo resultado de cada uno está determinado por la especie de *Leishmania* infectante y la susceptibilidad genética e inmunológica del hospedero (Ritter *et al.*, 2009; Saporito *et al.*, 2013; McGwire & Satoskar, 2014). Estos son: leishmaniasis cutánea, la forma menos severa de la enfermedad causada por *Leishmania major* y *Leishmania tropica* en el Viejo Mundo, y *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* y *Leishmania braziliensis* en el Nuevo Mundo (McGwire & Satoskar, 2014), donde los pacientes desarrollan lesiones e hinchazón en el sitio de inoculación seguido de formación de úlceras (Neuber, 2008); leishmaniasis mucocutánea, causada por *Leishmania braziliensis*, donde el parásito se extiende por metástasis desde la inflamación local hasta el tejido mucocutáneo, llevando a erosiones y ulceraciones en el espacio nasofaríngeo (Neuber, 2008); y leishmaniasis visceral (LV) o “kala-azar”, la forma más peligrosa de la enfermedad, causada por *Leishmania donovani* en el subcontinente indio y África del Este, y *Leishmania infantum* (= *Leishmania chagasi*) en la región del Mediterráneo y el Nuevo Mundo, principalmente. En el caso de *Leishmania infantum*, los perros actúan como reservorio zoonótico adicional (Guerin *et al.*, 2002). La LV es endémica en 62 países, con un total de 200 millones de personas en riesgo y un estimado de 500.000 casos nuevos cada año a nivel mundial, sobretodo en las zonas rurales del subcontinente indio, Brasil, Sudán y Etiopía (Guerin *et al.*, 2002; Figura 2). Las especies causantes de LV presentan un tropismo preferencial por las vísceras, pudiéndose extender hasta el bazo, hígado, nodos linfáticos y médula ósea (Neuber, 2008; Saporito *et al.*, 2013). Según la OMS, la LV puede presentar períodos de incubación que van desde 10 días a 1 año, y los pacientes inmunocompetentes no tratados pueden presentar dolor abdominal, episodios febriles irregulares, pérdida de peso, anemia, pancitopenia, linfadenopatía, hepatosplenomegalia y potencialmente



**Figura 2.** Distribución mundial de la leishmaniasis visceral. Fuente: Organización mundial de la salud, 2005.

puede conducir a la muerte (Neuber 2008; Saporito *et al.*, 2013; McGwire & Satoskar, 2014); se ha visto que en un 85-90% de pacientes con LV no tratados la enfermedad es fatal (Stockdale & Newton, 2013). En pacientes en condiciones de inmunodepresión, como infección por VIH o tratamientos inmunosupresores, se ve comprometida la capacidad del sistema inmune de responder ante la infección por *Leishmania* y permite la reactivación de la enfermedad desde sitios de latencia del parásito; más precisamente, la epidemia de VIH ha modificado la epidemiología y la clínica de la LV, dado que tanto VIH como *Leishmania* infecta la misma célula hospedera –el macrófago–, estableciendo un círculo vicioso en donde el parásito induce una producción viral más robusta y el virus aumenta la replicación parasitaria (Saporito *et al.*, 2013). En pacientes con SIDA, la infección por *Leishmania* es fulminante y la respuesta al tratamiento se ve notoriamente disminuida (Neuber, 2008). Dado que *Leishmania* establece una infección crónica asintomática por tiempos prolongados en el individuo infectado, es necesario el rastreo del parásito en el organismo antes de iniciar cualquier tratamiento inmunosupresivo que permita el progreso de la leishmaniasis (Saporito *et al.*, 2013). Algunos pacientes satisfactoriamente tratados para LV, y que luego se mantienen asintomáticos por meses o años, desarrollan una proliferación fulminante y progresiva de parásitos dentro de la piel que da lugar a una cuarta manifestación clínica denominada leishmaniasis post-kala-azar dérmica. Estos pacientes sufren hipopigmentación y lesiones maculares, papulares y/o nodulares (McGwire & Satoskar, 2014). Las lesiones son ricas en el parásito, por lo que se cree que esta manifestación de la enfermedad es importante en la transmisión de la LV. De esta manera, entender los aspectos epidemiológicos y clínicos de la leishmaniasis post-kala-azar dérmica puede definir estrategias para controlar la LV (Mukhopadhyay *et al.*, 2014).

### **Profilaxis y tratamiento: estado actual**

El establecimiento de estrategias de prevención efectivas para la LV es un desafío en áreas endémicas, las cuales se encuentran principalmente en las zonas más pobres y remotas del mundo (Croft *et al.*, 2006). Aunque se ha progresado considerablemente en la última década en entender los mecanismos inmunológicos de la leishmaniasis, muy pocas vacunas candidato han avanzado más allá de la fase experimental; de este modo, no disponemos actualmente de vacunas eficaces para ninguna forma de leishmaniasis humana (Nagill & Kaur, 2011). Otros objetivos evidentes de intervención, para prevenir la enfermedad incluyen la población del vector, la población de reservorios animales, así como evitar que el humano sea picado (Stockdale & Newton, 2013). Se ha visto que la utilización de redes de cama con insecticidas de liberación lenta ha reducido significativamente la incidencia de LV en áreas endémicas (Mondal *et al.*, 2013). Adicionalmente, el uso de repelentes como piretroides sintéticos en perros se ha convertido en la herramienta más eficiente para la prevención de la infección por *Leishmania infantum* en estos animales (Otranto & Dantas-Torres, 2013). El uso compartido de jeringas es también una potencial fuente de transmisión antroponótica de leishmaniasis (Cruz *et al.*, 2002), así como también se han reportado

raros casos de transmisión congénita de la enfermedad (Pagliano *et al.*, 2005). Los cambios climáticos y de urbanización implican actualmente que flebotomos infectados tengan acceso a regiones geográficas anteriormente no afectadas, exponiendo nuevas poblaciones a la enfermedad. En Uruguay existe un riesgo potencial de transmisión de LV debido a la presencia reportada de un flebotomo del género *Lutzomyia* en Salto y Bella Unión, reportes de LV en Argentina y el sur de Brasil, y movimiento fluido de individuos y perros a través de las fronteras, por lo que se requiere un sistema de vigilancia activo en el área para mejorar la capacidad de detección y prevención de la enfermedad (Salomón *et al.*, 2011).

La quimioterapia sigue siendo el elemento más importante en el control de la LV. La eficacia de las drogas utilizadas se relacionan con cuatro aspectos particulares de la biología de *Leishmania*: (i) la localización intracelular de la forma amastigota en el fagolisosoma ácido del macrófago; (ii) los requerimientos farmacocinéticos diferenciales de drogas que se distribuyen a hígado, bazo y médula ósea en la LV; (iii) las diferencias significativas en la sensibilidad de las drogas en las especies de *Leishmania* causantes de la enfermedad en humanos y (iv) la influencia de la inmunosupresión asociada a la leishmaniasis, que puede reducir la efectividad de algunas drogas (Barrett & Croft, 2012). Existen numerosos agentes terapéuticos utilizados actualmente para tratar la LV, todos con contraindicaciones e inconvenientes significativos que limitan su uso en zonas endémicas de la enfermedad. Algunos ejemplos son (Figura 3):

*Antimonios pentavalentes*. Actúan directamente sobre procesos moleculares del parásito e incrementan la actividad microbicida del macrófago (McGwire & Satoskar, 2014). El tratamiento dura hasta 30 días y se administra por vía intravenosa o intramuscular. Los efectos secundarios incluyen cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, pancreatitis, anormalidades de electrolitos y pancitopenia. Además, se ha reportado resistencia emergente del parásito, y los costos del tratamiento son elevados (Jain & Jain, 2013).

*Anfotericina B*. Se une al ergosterol de las membranas del parásito causando su inestabilidad (McGwire & Satoskar, 2014). El tratamiento dura entre 15 y 20 días y es administrado por vía intravenosa. Los efectos secundarios incluyen nefrotoxicidad severa, los cuales se ven disminuidos si se formula la droga con compuestos lipoides. No obstante, en este último caso el tratamiento tiene costos muy elevados (Jain & Jain, 2013).

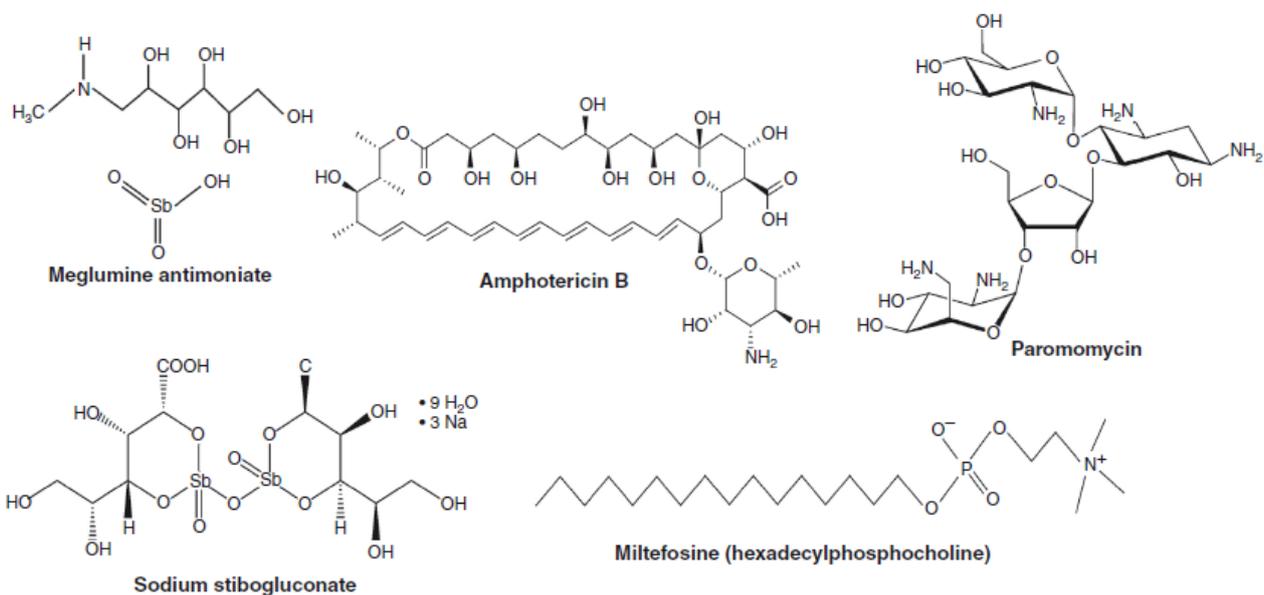
*Paromomicina*. Bloquea la síntesis proteica del parásito uniéndose al ARN ribosomal 16S (McGwire & Satoskar, 2014). La vía de administración es intramuscular y el tratamiento es económicamente accesible y dura 21 días. Sus efectos secundarios incluyen nefrotoxicidad, ototoxicidad y, en menor medida, hepatotoxicidad (Jain & Jain, 2013).

*Miltefosina*. Es el único agente administrado por vía oral, y el tratamiento dura 28 días. Los efectos secundarios incluyen teratogenicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad; además, está contraindicado en casos de embarazo (McGwire & Satoskar, 2014). La edelfosina ha surgido como análogo

alquilolisofosfolípido de la miltefosina, mostrando mayor efectividad contra parásitos promastigotas y amastigotas (Varela *et al.*, 2012).

*Pentamidina*. Interfiere con la biosíntesis de macromoléculas del parásito como ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas. El tratamiento dura entre 21 y 28 días, y sus efectos secundarios incluyen nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, hipoglucemia y efectos sobre la médula osea (McGwire & Satoskar, 2014).

*Sitamaquina*. Es la única droga que ha sido desarrollada exclusivamente para el combate de la LV. La vía oral de administración, su baja resistencia reportada y su costo reducido la hacen un buen candidato, sin embargo presenta importantes efectos secundarios como dolor abdominal, dispepsia, glomerulonefritis e insuficiencia renal (Singh *et al.*, 2012). Además, el uso clínico de este compuesto se ve limitado por estar aún en investigación.



**Figura 3.** Estructuras químicas de agentes quimioterapéuticos antileishmánicos convencionales. Fuente: Jain & Jain, 2013.

La terapia de combinación de drogas ha mostrado resultados promisorios incluyendo tratamiento más eficaz con efectos secundarios reducidos, duración de tratamiento más corta (hasta 8 días), costos accesibles y resistencia emergente reducida. No obstante, la eficacia clínica de la terapia de combinación se sigue estudiando y deberá ser confirmada en el futuro (Jain & Jain, 2013).

Algunos tratamientos convencionales, como el uso de antimonios pentavalentes, ya no pueden ser utilizados en algunas áreas endémicas –por ejemplo en Bihar, India- debido a la aparición de parásitos resistentes (Guerin *et al.*, 2002). En este contexto, el número en aumento de pacientes con LV co-infectados con VIH podrían ser un reservorio potencial: estos pacientes presentan alta carga parasitaria y respuesta inmunológica atenuada, por lo que responden lentamente al tratamiento y puede llevar a la selección de parásitos resistentes. En cuanto al uso de fármacos de larga vida media, como anfotericina B o miltefosina, la posibilidad de resistencia emergente tampoco debe ser ignorada (Croft *et al.*, 2006).

En suma, los fármacos actualmente utilizados presentan inconvenientes significativos, ya sea vía parenteral de administración, larga duración de tratamiento, resistencia emergente, toxicidad y costos elevados que limitan su uso en zonas endémicas de la enfermedad. Además, los fármacos en desarrollo clínico son, o bien reformulaciones de medicamentos anteriores, terapias de combinación, o el resultado de conmutación terapéutica, que no ofrecen realmente nuevas alternativas a los pacientes que sufren de leishmaniasis. Existe, por lo tanto, una necesidad urgente de identificar nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de medicamentos innovadores contra la LV.

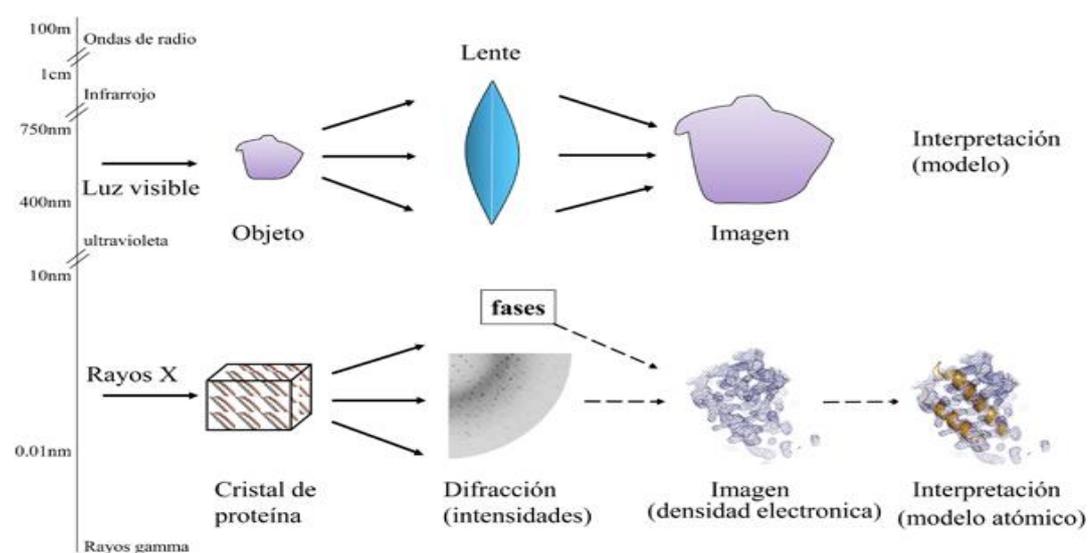
### **Desarrollo racional de nuevos fármacos: la cristalografía de rayos X**

El diseño de nuevos medicamentos es un proceso largo (entre 10 y 15 años) y costoso, que la cristalografía por rayos X permite acelerar. Esta última es una de las técnicas más potentes para determinar la estructura molecular de macromoléculas biológicas, con detalle atómico. En esta estrategia de descubrimiento de nuevas drogas usando cristalografía, debe identificarse uno o más blancos moleculares contra los que el nuevo medicamento será dirigido. Luego, la determinación de la estructura tridimensional del blanco elegido permite diseñar candidatos potenciales de moléculas inhibitoras/activadoras, observando y analizando cuantitativamente con resolución atómica cómo se uniría cuando entrase en contacto con dicho blanco. Los resultados experimentales derivados de la cristalografía deben ser complementados por estudios *in silico* que permitan predecir uniones proteína-fármaco, apuntando a la selección de compuestos candidatos, así como a la optimización de las propiedades fisicoquímicas de los mismos. Las moléculas de interés deben luego ser sintetizadas, para iterar el trabajo cristalográfico así como para lanzar ensayos *in vitro*, biológicos y finalmente clínicos.

Existen dos tipos de sólidos: amorfos y cristalinos. La diferencia entre ellos es que el segundo presenta una estructura periódica y ordenada, mientras que el primero no. Las estructuras de los sólidos cristalinos se definen mejor en términos de celda unidad, ésta consiste en un arreglo periódico y repetitivo, constituido por unidades asimétricas arbitrarias sujetas a operaciones de simetría, y que finalmente construye el objeto cristalino macroscópico (Lieberman *et al.*, 2013). La cristalización de proteínas es principalmente un procedimiento de ensayo y error en el cual la proteína es lentamente precipitada de su solución, y que involucra 4 pasos fundamentales: (i) la proteína debe estar pura y homogénea en solución; (ii) la proteína es disuelta en un solvente adecuado desde el cual debe ser precipitada por sales, compuestos orgánicos u otros agentes precipitantes físicos o químicos; (iii) esta solución de proteína llega a concentraciones sobresaturadas, permitiendo eventualmente (iv) la formación de pequeños agregados que sirven de núcleos de cristalización que posteriormente crecen espontáneamente hasta cristales macroscópicos (Drenth, 2007). Las técnicas más utilizadas para generar cristales se basan en la difusión de vapor: en ella, un pequeño volumen (0,5-10  $\mu\text{L}$ ) de solución concentrada (5-20 mg/mL ó 0,05-0,5 mM) de la proteína de interés es

mezclada con solución precipitante en una relación 1:1 formando una gota, y se deja equilibrar herméticamente, contra un reservorio que contiene dos veces más concentración del mismo precipitante. Esto hará que el agua difunda de la gota al reservorio (deshidratación), aproximándose y eventualmente rebasando el punto de solubilidad de la proteína en la misma. La nucleación es un proceso cinético que compete con la precipitación amorfa, ambos fenómenos llegan luego espontáneamente a estados finales de equilibrio, que en el caso de lograr nucleación cristalina conducirá termodinámicamente al crecimiento de cristales macroscópicos. La aproximación de difusión de vapor tiene dos geometrías más utilizadas, las de “gota sentada” y “gota colgante” (Egli, 2010; Lieberman *et al.*, 2013).

Los rayos X son fotones de alta energía con longitudes de onda de entre 100 y 0,1 Å. La cristalografía de rayos X usa fotones de alrededor a 1 Å, que es la distancia aproximada de la mayoría de los enlaces moleculares covalentes. Así, los rayos X son dispersados cuando su vector de campo eléctrico interactúa con los electrones de la materia. Aunque la dispersión de rayos X por una única molécula es muy débil, moléculas arregladas en una red cristalina periódica permiten la amplificación de la señal. La superposición de los rayos X difractados por las moléculas de un cristal es leída por un detector y aparece como un punto dentro del patrón de puntos en cada dirección dada. Este patrón de difracción contiene la información necesaria para determinar la estructura molecular del cristal, y resulta de las medidas de todas las posibles reflexiones de rayos X (en suficientes orientaciones diferentes). La estructura es determinada mediante una construcción matemática denominada transformada de Fourier, la cual convierte el patrón de difracción de la molécula de interés desde un espacio recíproco, al sistema de coordenadas del espacio real que permite la determinación de mapas de densidad electrónica de dicha molécula (Lieberman *et al.*, 2013). De esta manera, la transformada de Fourier actúa como un “lente” que permite “refocalizar” los rayos X difractados por el cristal y obtener así una “imagen magnificada” del mismo (Figura 4).



**Figura 4.** Analogía entre microscopía óptica (arriba) y difracción de rayos X (abajo). A la izquierda se muestra el espectro electromagnético. Fuente: [http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos\\_10/cristalografia-de-rayos-x-de-macromoleculas\\_647](http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/cristalografia-de-rayos-x-de-macromoleculas_647).

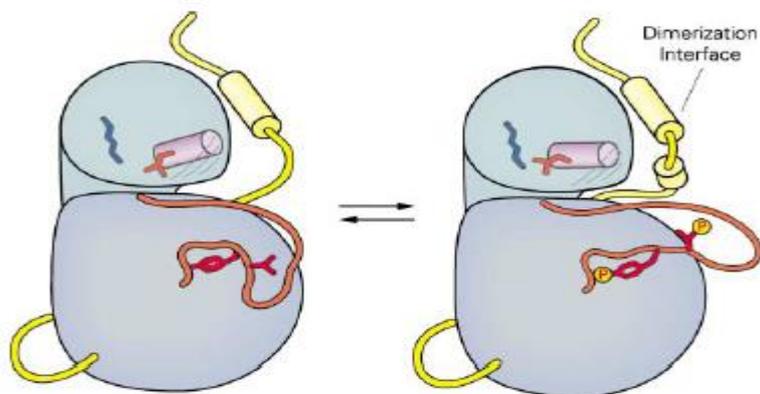
Desafortunadamente, la transformada de Fourier del patrón de difracción, necesaria para generar la estructura del cristal expresada en términos de densidad electrónica, requiere información tanto de las amplitudes como de las fases. El detector sólo es capaz de captar la intensidad (amplitud) de las ondas electromagnéticas difractadas, sin embargo, la información de sus fases se pierde. Para resolver el “problema de las fases”, *i. e.* recuperar la información perdida, se utilizan diversas aproximaciones computacionales (*e. g.*, reemplazo molecular) y/o experimentales (*e. g.*, reemplazo isomorfo con átomos pesados, o bien difracción anómala con rayos X de longitud de onda apropiada para registrar absorción cuántica de los átomos dispersores anómalos), que permiten resolver la estructura (Drenth, 2007; Egli, 2010; Lieberman *et al.*, 2013).

El modelo obtenido tras lo descrito anteriormente incluye distintos tipos de errores en el modelo inicial, ya sea porque se usó reemplazo molecular (por lo que el modelo de búsqueda inicial es en verdad el de una molécula semejante, pero diferente a la estructura problema); o bien, porque cuando se determinan las fases de forma experimental, no se tiene modelo alguno, sino que se traza un primer modelo interpretando el mapa de densidad electrónica experimental. Es así que la etapa de refinamiento es esencial para obtener un modelo estructural final que explique con mínimo error los datos de difracción observados. El refinamiento es así un proceso iterativo de ajuste entre modelo y datos observados, que si se hace en el sentido correcto, muestra un mejoramiento progresivo en el valor justo de las fases, redundando en mapas de densidad electrónica progresivamente mejores y más detallados. El objetivo específico del refinamiento cristalográfico es realizar cambios al modelo atómico de manera de minimizar la diferencia entre los factores estructurales estimados a partir del modelo, y los observados experimentalmente (difracción). El refinamiento consiste en un proceso iterativo que involucra los siguientes pasos: (i) (re)construcción manual; (ii) optimización del modelo (o no, en los casos de contar con resolución atómica, *i. e.*  $\leq 1,2 \text{ \AA}$ ) teniendo en cuenta sus restricciones geométricas; y (iii) cálculo del mapa de densidad electrónica de modelo mejorado (Egli, 2010).

La cristalografía de proteínas es una disciplina que ha venido creciendo sostenidamente durante los últimos 60 años, contribuyendo enormemente en diversas áreas de desarrollo tecnológico: la ingeniería de proteínas, la optimización de antígenos vacunales y, muy particularmente, el descubrimiento y diseño racional de fármacos guiados por la estructura tridimensional de proteínas blanco. El conocimiento detallado –con resolución atómica– de la estructura tridimensional de una proteína de interés abre la posibilidad inmediata al diseño racional de inhibidores, eventualmente útiles como nuevos fármacos. Muchas drogas actualmente disponibles en el mercado fueron diseñadas u optimizadas de esta forma, siendo un caso bien conocido el de Gleevec<sup>TM</sup>, un medicamento eficaz contra la leucemia mieloide crónica, desarrollado a partir de la estructura cristalina de la tirosina quinasa humana Abl, desregulada en los pacientes con este tipo de cáncer.

## MAP quinasas

Las protein-quinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés “mitogen activated protein kinases”) son proteínas quinasas de serina/treonina que median diversos eventos de señalización intracelular en eucariotas como diferenciación, proliferación, movilidad, respuesta al estrés y apoptosis (Waskiewicz & Cooper, 1995). Las MAPKs se clasifican dentro del grupo de quinasas CMGC que además comprenden a las familias de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), quinasas de la glucógeno sintasa (GSK) y quinasas similares a CDK (CLK) (Kannan & Neuwald, 2004). Las MAPKs funcionan al nivel molecular como interruptores, mostrando al menos dos conformaciones que se corresponden a estados catalíticamente activo e inactivo (Huse & Kuriyan, 2002; Figura 5), siendo las MAPKs las últimas a activarse en cascadas de transducción de señales altamente conservadas, que típicamente involucran un módulo central de tres quinasas activadas consecutivamente: una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK, la primer



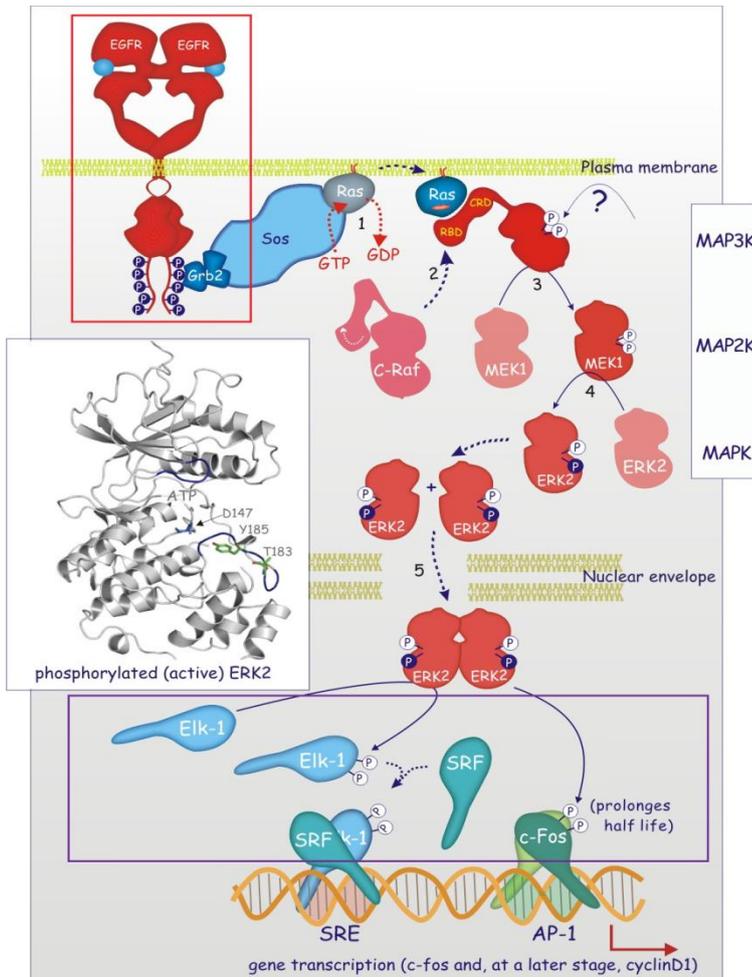
**Figura 5.** Regulación de la MAPK por fosforilación del segmento de activación. Se muestra el estado catalíticamente inactivo (izquierda) y activo (derecha) de la MAPK. Fuente: Huse & Kuriyan, 2002.

quinasa del módulo) es activada por una proteína Ras activa, y fosforila en un residuo de serina y/o treonina a una segunda quinasa, la MAP quinasa quinasa (MAPKK). Finalmente, la MAPKK activa específicamente a la MAPK mediante una doble fosforilación en un residuo de treonina y uno de tirosina -separados por un solo aminoácido- del bucle de activación, que define el denominado subdominio VIII dentro del dominio catalítico conservado de la proteína (Alberts *et al.*, 2002; Huse & Kuriyan 2002; Wang *et al.*, 2005; Kornev *et al.*, 2006; Figura 5). Esta fosforilación da lugar a un cambio conformacional de la MAPK, orientando varios residuos involucrados en la catálisis de modo que permitan la unión del sustrato proteico simultáneamente al ATP (Zhang *et al.*, 1994). Finalmente, la MAPK se inactiva por defosforilación mediante la acción de una fosfatasa, siendo suficiente la eliminación del grupo fosfato de la tirosina, o bien de la treonina (Alberts *et al.*, 2002).

Las vías de señalización mediadas por MAPKs han sido ampliamente estudiadas durante la infección por *Leishmania*, pero casi exclusivamente con foco en las vías de las células del mamífero huésped (Yang *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2011). Se ha prestado menos atención a las MAPKs propias del parásito.

## MAP quinasas en *Leishmania*

Poco se sabe sobre los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la activación de las proteína-quinazas en tripanosomátidos. En eucariotas superiores, la MAPK activada puede traslocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción, o bien fosforilar quinasas citosólicas o proteínas estructurales; sin embargo, en *Leishmania*, si bien se ha determinado mediante análisis genómicos la presencia del triple módulo mencionado anteriormente (Parsons *et al.*, 2005), no se han documentado hasta el momento receptores típicos que conducen a la activación de las cascadas de MAPKs como receptores asociados a proteína G, receptores de tipo tirosina quinasa o bien, proteínas adaptadoras conteniendo dominios SH2 en sus genomas. Tampoco se identifican en sus genomas el conjunto de sustratos típicos de MAPKs de otros eucariotas tales como factores de transcripción (Parsons *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005, Figura 6). Adicionalmente, a pesar de encontrar un número muy importante de genes codificando para MAPKs (ver abajo), se encuentran muy pocos para MAPKKs (Parsons *et al.*, 2005), lo que sugiere mecanismos alternativos de activación de MAPKs en estos protozoos.



**Figura 6.** Diagrama general de la vía de señalización de MAP quinasas en eucariotas superiores. Recuadrados se subrayan los componentes que aún no han sido encontrados en tripanosomátidos, en rojo aquéllos río arriba (receptores de tipo tirosina quinasa, proteínas adaptadoras con dominios SH2), y en violeta los sustratos de MAPKs río abajo (factores de transcripción nucleares). Fuente: <http://www.cellbiol.net/ste/rpimages.php>.

De acuerdo con análisis genómicos, hay 17 MAPKs putativas en *Leishmania spp.*, siendo por lo tanto una de las familias de protein-quinasas más expandidos si se lo compara con los proteomas de mamíferos (Naula *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005). Ya se han reportado implicancias de las MAPKs de *Leishmania* en la detección de señales del ambiente (Wiese, 1998; Morales *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2008; Brumlik *et al.*, 2011) y en el control de la biogénesis de los flagelos (Bengs *et al.*, 2005; Wiese, 2007), regulando las vías de respuesta adaptativa de los parásitos.

Dell y Engel (1994) demostraron que existe una regulación estadio-específica de la fosforilación de quinasas de serina/treonina durante el ciclo de vida de *Leishmania*. Como consecuencia, se observan cambios dramáticos en los patrones de abundancia de fosfoproteínas y en los perfiles de fosforilación durante la diferenciación del estado promastigota a amastigota. Estos cambios del fosfoproteoma están mediados en gran medida por estas quinasas y otras enzimas –por ejemplo, fosfatasas- que actúan de manera estadio-específica; más precisamente, se ha visto que un subconjunto limitado de las MAPKs de *Leishmania major* (LmaMPKs) se fosforilan sólo durante la diferenciación de promastigotas a amastigotas (Morales *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2008). De esta manera, las MAPKs LmaMPK4 (PK4), LmaMPK7 (PK7) y LmaMPK10 (PK10) fueron inicialmente identificadas como candidatos reguladores de la diferenciación y la supervivencia del parásito en el interior de las células huésped (Dr. Gerald Späth, comunicación personal). Estudios posteriores profundizaron en la importancia de estas MAPKs para el parásito, dándoles relevancia como potenciales blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas drogas contra la leishmaniasis.

#### **PK4 como potencial blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos**

El ortólogo de PK4 en *Leishmania mexicana* contiene un motivo treonina-glutamina-tirosina en su bucle de activación (este motivo está muy conservado en todas las MAPKs, como TXY), también identificado en quinasas de *Aedes aegypti* y *Caenorhabditis elegans*. Más aún, la similitud de secuencia de todas estas quinasas con JNK y p38 humanas, las agrupa como quinasas activadas por estrés, sugiriendo una vía funcional de PK4 en parásitos que efectivamente responden a señales de estrés durante su ciclo de vida, en particular disparando diferenciación (Wiese, 2007; Saravanan *et al.*, 2010). Además, se vio que su homólogo en *Trypanosoma brucei* (TbMAPK2, con ~80% de identidad) es requerido para la progresión del ciclo celular y diferenciación desde la forma procíclica en la mosca tse-tse a la forma del torrente sanguíneo del hospedero definitivo mamífero (Müller *et al.*, 2002), lo cual sugiere que la progresión del ciclo celular en promastigotas y amastigotas de *Leishmania mexicana* puede requerir de la actividad de PK4. Adicionalmente, utilizando aproximaciones de “knockout” génico, PK4 demostró ser esencial para la sobrevivencia de *L. mexicana*, al no ser posible la delección de su gen del genoma del parásito. El mutante nulo sólo pudo ser generado por recombinación homóloga en presencia de un plásmido portador del gen salvaje de PK4, retenido por promastigotas y amastigotas en ratones Balb/c infectados sin selección por antibióticos (Kuhn & Wiese,

2005; Wang *et al.*, 2005). Otro interés de trabajar con PK4 radica en la posibilidad de obtener a la enzima en su conformación activa mediante la co-purificación con su MAPKK específica (John von Freyend *et al.*, 2010). Cabe destacar, también, que los ortólogos de PK4 entre especies patógenas del parásito son altamente conservados, con niveles de indentidad de aproximadamente 98%, y carecen de homólogos cercanos entre las MAPKs humanas (Wang *et al.*, 2005; Saravanan *et al.*, 2010). Se han publicado recientemente datos sobre potenciales inhibidores de PK4 de *Leishmania mexicana* guiados por la estructura (Saravanan *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2013); sin embargo, los modelos estructurales utilizados son estrictamente teóricos, modelizados por homología en base a ERK2 humana y posterior rastreo virtual de compuestos. Resulta pertinente el estudio estructural experimental de la quinasa PK4, de forma de obtener datos significativamente más precisos y exactos, al día de hoy ausentes en la literatura. La descripción detallada del sitio activo resulta clave para el diseño racional de inhibidores específicos, que podrán ser iterativamente evaluados resolviendo las estructuras tridimensionales de los complejos correspondientes.

El presente trabajo redundará en forma directa en la puesta a punto de la producción y purificación de PK4 recombinante, lo que permitirá la evaluación de inhibidores en ensayos enzimáticos adecuados.

## **Hipótesis**

La MAP quinasa PK4 de *Leishmania spp.* es una proteína esencial para la supervivencia de los parásitos patógenos del género *Leishmania*. Careciendo de homólogos cercanos entre las MAP quinasa humanas, es un blanco molecular para guiar el desarrollo de nuevos medicamentos antileishmánicos.

## **Objetivo general**

Realizar los trabajos necesarios de clonado, producción y purificación de la MAP quinasa PK4 de *Leishmania major* (LmaMPK4) recombinante, para posteriormente poder realizar estudios estructurales de este blanco esencial de *Leishmania spp.* mediante cristalografía de rayos X.

## **Objetivos específicos**

- (i) Generación de construcciones codificando la enzima LmaMPK4 en vectores de expresión a ser usados en el sistema de *Escherichia coli*.
- (ii) Puesta a punto y optimización de la sobreexpresión de LmaMPK4 recombinante, usando las diferentes construcciones generadas y distintas condiciones de cultivo e inducción.
- (iii) Puesta a punto de un protocolo de purificación a homogeneidad para obtener cantidades suficientes (en la escala de los miligramos) de LmaMPK4 recombinante, para fines cristalográficos.

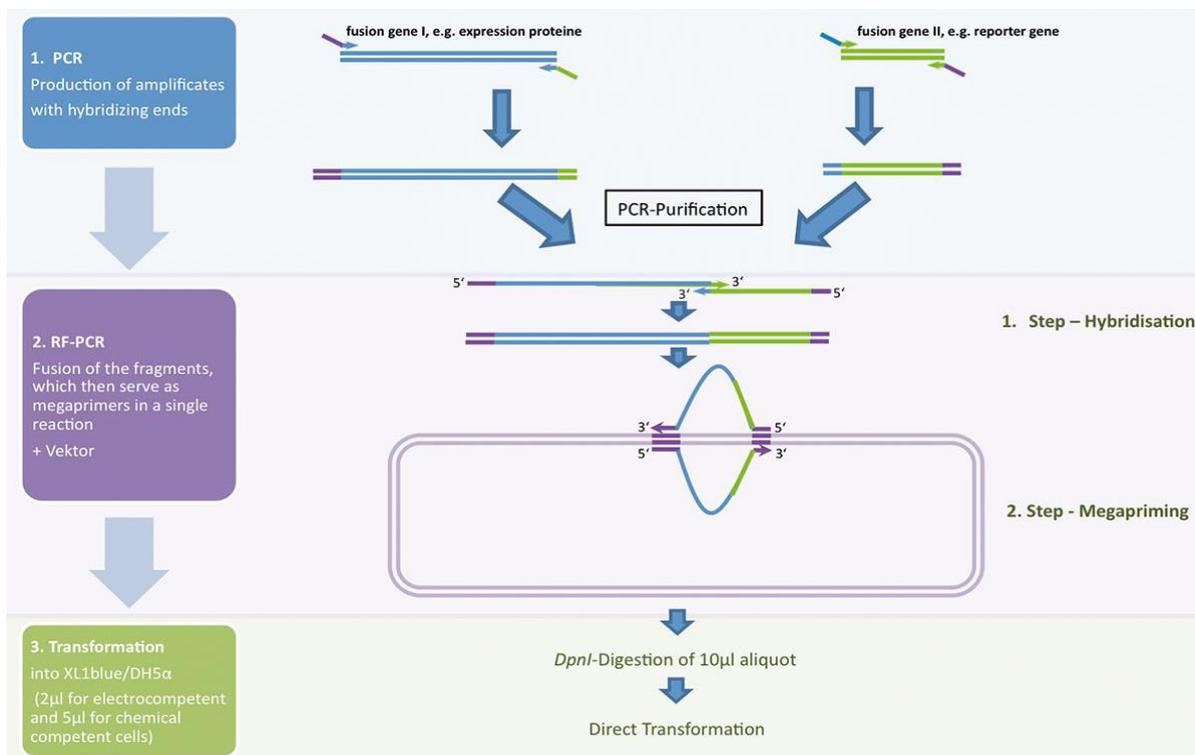
## MATERIALES Y MÉTODOS

**Antes de describir los protocolos detallados que fueron usados para llevar adelante el trabajo, presentaré una síntesis de las estrategias experimentales elegidas, con el fin de servir de guía general para la presentación posterior de RESULTADOS.**

### Estrategia experimental

**Clonado.** Se utilizará el método de clonado sin enzimas de restricción (“restriction free cloning”; Figura 7) con el fin de probar en primera instancia sobreexpresión recombinante en el sistema de *Escherichia coli*. Este es un sistema muy bien conocido, relativamente económico, y con típicamente muy buenos rendimientos finales. En líneas generales, se apuntará a cubrir ensayos con dos promotores distintos (T5 y T7), para rastrear dos perfiles de expresión bien diferentes. Para ello, se seleccionarán los plásmidos de expresión de las líneas pQE (*Qiagen*) y pET (*Novagen*), respectivamente.

Las construcciones se diseñarán de modo de agregar a las proteínas recombinantes una etiqueta de seis histidinas (HisTag) en su extremo N-terminal, etiqueta que puede ser luego removida gracias a la secuencia específica de corte por proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) que reconoce el sitio EXXYXQ/S, introducido también con el fragmento de ADN correspondiente en dichas construcciones. En el caso de PK4 fusionada a otros dominios, la secuencia específica para TEV se encuentra entre el extremo C-terminal de la fusión y el N-terminal de PK4.



**Figura 7.** Método de clonado sin enzimas de restricción (“restriction-free cloning”). Fuente: Unger *et al.*, 2010.

**Expresión de proteínas recombinantes.** El marco abierto de lectura de PK4 se encontrará regulado por un operador *lac*, por lo que la inducción de la expresión se lleva a cabo utilizando el inductor gratuito IPTG, de función análoga a la alolactosa: el IPTG se une al represor LacI, inhibiendo su acción. Una vez que el represor LacI es inactivado, la ARN polimerasa puede comenzar a transcribir las secuencias codificadas río abajo del promotor, en este caso PK4. Se ensayarán dos temperaturas de inducción: 20 °C por 14 hs., o bien 37 °C por 3 hs. Asimismo, se transformarán distintas cepas de *E. coli* con los vectores recombinantes generados, con el fin de definir la mejor combinación, evaluando los rendimientos de proteína recombinante soluble. Para esto se ensayarán las cepas C41, HMS174, TOP10F', BL21 y RosettaBlue.

En el vector de expresión pQE80, PK4 se encontrará bajo control transcripcional de un promotor del bacteriófago T5, que es bien reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*. Por otro lado, en el vector pET28a PK4 se expresará bajo control transcripcional de un promotor T7, reconocido sólo por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (y no por la enzima de *E. coli*). El gen para expresar la RNA polimerasa de T7 está inserto como un fragmento génico exógeno de *E. coli*, aprovechando la capacidad lisogénica del fago  $\lambda$ : el marco abierto de la ARN polimerasa de T7 está incorporada en el genoma del fago  $\lambda$  (denominado por ello  $\lambda$ DE3), bajo control transcripcional de un promotor *lacUV5*, inducible por IPTG. Por lo tanto, para permitir la inducción de expresión de PK4 en pET, la cepa de *E. coli* utilizada para el ensayo debe ser portadora de  $\lambda$ DE3. La proteína recombinante podrá también ser fusionada a otras proteínas, que puedan funcionar de chaperonas en el plegamiento, o bien simplemente funcionando de "guías" inductoras de mayor solubilidad (Sahdev *et al.*, 2008). En este contexto, se utilizará la disulfuro isomerasa DsbC: una proteína periplásmica de *E. coli*, de un tamaño aproximado de 24 kDa, y que cataliza la formación de enlaces disulfuro inter e intramoleculares (Shevchik *et al.*, 1994). Asimismo, se ha documentado la actividad chaperona de DsbC independientemente de su actividad disulfuro isomerasa (Chen *et al.*, 1999). De esta manera, para mejorar los niveles de expresión soluble de PK4, se utilizará una construcción que permite su expresión fusionada a DsbC.

**Purificación de proteínas.** En la primera etapa de enriquecimiento, la fracción soluble de proteínas se purificará por afinidad a metales de transición (particularmente níquel o cobalto), para unir la etiqueta de histidinas de la proteína recombinante. El uso alternativo de estos dos metales será parte de la puesta a punto del protocolo de purificación, y poder así decidir cuál es más efectivo para unir la etiqueta de histidinas, así como cuál disminuye la unión inespecífica de contaminantes. Para eluir la proteína de interés, se empleará en este tipo de cromatografía un gradiente de imidazol, por su habilidad para competir con la etiqueta de histidinas por la unión al metal.

Para fines cristalográficos, es necesario obtener grandes cantidades de proteína pura y homogénea, por lo que es frecuentemente necesario agregar pasos adicionales de purificación. En la segunda etapa de enriquecimiento, la fracción purificada en la etapa anterior se someterá a cromatografía de intercambio

iónico, teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de la proteína recombinante para la selección del pH de la fase móvil y la carga de la fase estacionaria; o bien, a cromatografía de exclusión molecular, teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína recombinante.

### **Protocolos específicos**

#### **Subclonado de la secuencia codificante de PK4 en vectores de expresión**

Contamos con el marco abierto de lectura codificante de PK4 (CDS LmjF19.1440) clonado en el plásmido pGEM (cortesía del grupo de Gerald Späth, Institut Pasteur, Paris). A partir de este clon, se utilizaron los vectores de expresión de *Escherichia coli* pQE80 (Amp<sup>R</sup>, inserto transcripto con un promotor T5, *Qiagen*) y pET28a (Kan<sup>R</sup>, promotor T7, *Novagen*) para el subclonado del gen de PK4. Asimismo, contamos con el gen de PK4 clonado en fusión a la disulfuro isomerasa DsbC de *E. coli* en un vector de expresión pET (Amp<sup>R</sup>, promotor T7; cortesía de Agustín Correa, Unidad de Proteínas Recombinantes, Institut Pasteur de Montevideo).

Las construcciones pQE80-PK4 y pET28a-PK4 se generaron mediante el método de clonado sin enzimas de restricción (“restriction-free cloning”; van den Ent & Löwe, 2006, Unger *et al.*, 2010) en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (*Applied Biosystems*). El método consiste en una doble PCR, utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (*Biolabs*): en primera instancia, se obtuvieron “megaprimers” (MP; en este caso de 1155 pb, correspondientes al marco abierto de lectura completo de PK4), los que quedan así flanqueados por secuencias homólogas al vector de expresión de destino. Para generar los MP se utilizaron los oligonucleótidos cebadores directo 5’ GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCATGGCTCAACTCGTCCCTTAGC 3’ (Tm = 68 °C) y reverso 5’ GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCCCTATTCGTTCAATTGTGAATGGG 3’ (Tm = 70 °C). Los reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados en la primera reacción de amplificación se ilustran en la Tabla 1. Las condiciones de ciclado se especifican en la Tabla 2.

Para verificar el tamaño esperado de los MP se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio (ver Anexo) a 100 V por 30 mins. El tamaño de las bandas se estimó mediante comparación con el marcador *1 kb DNA ladder* (*Invitrogen*) del cual se sembraron 6 µL. Las bandas

**Tabla 1.** Concentraciones y volúmenes de los reactivos en la primera reacción de amplificación de PK4.

Reactivo	Concentración en stock	Volumen utilizado en µL (total = 50 µL)
H <sub>2</sub> O	-	30
<i>Phusion HF Buffer</i> (MgCl <sub>2</sub> 7.5 mM)	5x	10
dNTP	10 mM	2
Oligonucleótido directo	20 µM	2,5
Oligonucleótido reverso	20 µM	2,5
Molde (pGEM-PK4)	60 ng/µL	2
<i>Phusion</i> pol.	2 U/µL	1

**Tabla 2.** Condiciones de ciclado para la primera reacción de amplificación de PK4.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	98	0,5	1
Desnaturalización	98	0,6	35
Hibridización	62	0,5	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	5	1

correspondientes a los MP fueron extraídas del gel y purificadas mediante el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)*, según el protocolo del fabricante. El ADN purificado fue resuspendido en 50 µL de agua destilada estéril y cuantificado mediante seguimiento de absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop 1000 v3.7.1 (Thermo Scientific)*.

En segunda instancia, se realizó el clonado final del gen mediante una segunda amplificación utilizando el MP y el plásmido deseado en la reacción. Los reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción de amplificación se muestran en las Tablas 3 y 4. Las condiciones de ciclado para cada plásmido molde se observan en la Tabla 5.

**Tabla 3.** Concentraciones y volúmenes de los reactivos en la segunda reacción de amplificación de PK4 para el vector pQE80.

Reactivo	Concentración en stock	Volumen utilizado en µL (total = 50 µL)
H <sub>2</sub> O	-	28,5
<i>Phusion HF Buffer (MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM)</i>	5x	10
dNTP	10 mM	2
Molde (pQE80)	30 ng/µL	1,5
<i>Megaprimer PK4</i>	30 ng/µL	7
<i>Phusion pol.</i>	2 U/µL	1

**Tabla 4.** Concentraciones y volúmenes de los reactivos en la segunda reacción de amplificación de PK4 para el vector pET28a.

Reactivo	Concentración en stock	Volumen utilizado en µL (total = 50 µL)
H <sub>2</sub> O	-	28,5
<i>Phusion HF Buffer (MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM)</i>	5x	10
dNTP	10 mM	2
Molde (pET28a)	60 ng/µL	1,5
<i>Megaprimer PK4</i>	30 ng/µL	10
<i>Phusion pol.</i>	2 U/µL	1

**Tabla 5.** Condiciones de ciclado para la segunda reacción de amplificación de PK4.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	98	0,5	1
Desnaturalización	98	0,6	35
Hibridización	55	1	35
Extensión	72	5	35
Extensión final	72	7	1

Para evitar transformar con los plásmidos molde, se procedió a digerir los productos de la segunda amplificación con la enzima de restricción DpnI (*Biolabs*), que degrada sólo ADN metilado (parental). Para ello, se agregó 1 µL de DpnI 20 U/µL a la mezcla total y se incubó por 1,5 horas a 37 °C. Luego, una alícuota de 5 µL del ADN obtenido fue directamente transformado a células quimiocompetentes de *E. coli* de la cepa TOP10F' utilizando el método convencional con calcio, mediante shock térmico de 2 minutos a 42 °C en un bloque *Thermomixer comfort* (*Eppendorf*). Los transformantes se seleccionaron con ampicilina para la construcción pQE80-PK4, y con kanamicina para pET28a-PK4. Se plaqueó en medio sólido LB-agar, en placas de Petri. Finalmente, el ADN plasmídico fue extraído mediante protocolos de preparación de ADN plasmídico a pequeña escala (ver Anexo).

El marco abierto de lectura de PK4 presenta 2 sitios de restricción para cada una de las enzimas BgIII y BamHI. Para verificar la clonación de forma preliminar, las construcciones pQE80-PK4 y pET28a-PK4 fueron sometidas a digestión con BgIII (*Roche*) y BamHI (*Pharmacia*) e incubadas a 37 °C por 1 hora (Tabla 6). Las muestras digeridas se corrieron en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio a 100 V por 30 mins. En caso de observar bandas de 200 y 500 pb aproximadamente, se confirmó la clonación de dichas muestras por secuenciación capilar en el Servicio de Secuenciado del Institut Pasteur de Montevideo.

**Tabla 6.** Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados para la digestión con enzimas de restricción.

Reactivo	Concentración en stock	Volumen utilizado en µL (total = 30 µL)
Construcción (pQE80-PK4; pET28a-PK4)	1180 ng/µL; 60 ng/µL	25
<i>NE buffer 3</i>	10x	3
Albúmina bovina sérica	100x	0,3
BgIII	20 U/µL	1
BamHI	10 U/µL	1

### Bioinformática

Se analizó la secuencia aminoacídica de PK4 con el software *ProtParam* de *Expasy Tools* (disponible en <http://web.expasy.org/protparam/>) a modo de obtener información teórica de la proteína como peso molecular y punto isoeléctrico.

El diseño de los vectores recombinantes se realizó a través del programa *Vector NTI Advance 11.0* (*Invitrogen*).

El alineamiento de secuencias se realizó utilizando el software *ClustalW Sequence Alignment* de *ExPASy Tools* (disponible en <http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>). Se emplearon las secuencias aminoacídicas ortólogas de PK4 de *Leishmania major* (XP\_001682732.1), *Leishmania braziliensis* (XP\_001564264.1), *Leishmania infantum* (CAM67358.1) y *Leishmania mexicana* (CAC07958.1), disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Se realizó modelado por homología de PK4 utilizando el software *Bioinformatics Toolkit* de *Max Planck Institute for Developmental Biology* (disponible en <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). Se empleó como template la MAPK PK3 de *Leishmania donovani*, con la cual presenta una identidad de secuencia del 40%.

### Expresión de PK4 en *Escherichia coli*

Con el fin de definir la mejor combinación, evaluando los rendimientos de proteína recombinante soluble, se transformaron las cepas de *E. coli* TOP10F', BL21 (DE3, pLysS), C41 (DE3), HMS174 (DE3) y RosettaBlue (DE3, pLysS) con los vectores recombinantes pQE80-PK4 y pET28a-PK4 extraídos previamente. Adicionalmente, contamos con la construcción pETDsbC-PK4 transformado en la cepa Rosetta de *E. coli*.

Las células conteniendo las construcciones fueron crecidas en precultivos con medio Luria-Bertani (LB, ver Anexo) suplementado con ampicilina (50 mg/mL) para pQE80-PK4 y pETDsbC-PK4, y kanamicina (50 mg/mL) para pET28-PK4, durante 14 horas con agitación constante a 220 rpm. Luego, se inoculó el precultivo en medio LB suplementado con antibiótico en una relación 1 mL precultivo en 10 mL de LB finales para ensayos de expresión a corta escala, y 3 mL precultivo en 500 mL y 1000 mL finales de LB para ensayos a gran escala. Para la construcción pETDsbC-PK4, se preparó el cultivo con medio *Terrific Broth* (TB, permite un mayor crecimiento celular que LB). De esta manera, los cultivos se crecieron por 3 horas a 37 °C a modo de obtener una DO<sub>600</sub> aproximada de 0,6; esto permite obtener bacterias en la fase exponencial de su curva de crecimiento en cultivo. Posteriormente, los cultivos fueron inducidos con IPTG (1 mM) a distintas condiciones, las cuales se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Condiciones de expresión evaluadas para los vectores recombinantes.

Construcción	Temperatura (°C)	Tiempo de inducción (hs)	Cepas ( <i>E. coli</i> )
pQE80-PK4	37	3	TOP10F', BL21, HMS174, C41, RosettaBlue
	20	14	BL21, HMS174
pET28a-PK4	37	3	BL21, HMS174, C41, RosettaBlue
pETDsbC-PK4	37	3	Rosetta
	20	14	Rosetta

### Fracionamiento de proteínas solubles y evaluación del rendimiento por SDS-PAGE

Una vez completada la inducción, se procedió a cosechar las células por centrifugación a 5000 g por 15 mins. en una centrífuga 5804R (*Eppendorf*). Las células fueron resuspendidas en tampón de lisis (150 mM NaCl; 25

mM Tris.HCl pH 8; lisozima 1 mg/mL; *cocktail* de inhibidores de proteasas –Roche–) a razón de 5 mL cada 1 g seco de células; para completar el lisado, se sonicó las muestras en el sonicador *BRANSON Digital Sonifier*, empleando 6 pulsos de 1 minuto y 30% de amplitud, con intervalos de descanso de 1 minuto. La separación de fracciones soluble e insoluble se realizó luego de la lisis por centrifugación a 4 °C, 15000 g por 30 mins. La fracción insoluble se resuspendió en urea 8 M para posteriores análisis por electroforesis, empleando el criterio de 5 mL de urea cada 1 g seco de pellet.

Los ensayos de expresión se evaluaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturalizantes (dodecil sulfato de sodio –SDS–), utilizando geles discontinuos: un gel concentrador y uno separador (ver Anexo). Se prepararon las muestras correspondientes a las fracciones no inducidas e inducidas (total, soluble e insoluble) con el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol (4x) y se calentaron a 100 °C por 5 mins. Luego, se sembraron en el gel entre 10 y 20  $\mu$ L de muestra a modo de poner a punto la cantidad de proteína sembrada, y se corrió con buffer de corrida 1x a una intensidad de 20 mA. Finalmente, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante 1 hora, y desteñidos con agua y solución de ácido acético (10%) y etanol (50%) durante media hora. Los tamaños de las proteínas se estimaron mediante comparación con el estándar de peso molecular *ColorPlus Prestained Protein Ladder (Biolabs)*, del cual se sembraron 8  $\mu$ L en cada gel.

### **Puesta a punto de la purificación de PK4 a homogeneidad**

Las fracciones solubles seleccionadas fueron utilizadas como fuente de la proteína blanco PK4 a ser purificada por métodos de cromatografía líquida en condiciones nativas. En la primera etapa de enriquecimiento, la fracción soluble de proteínas fue purificada por afinidad con una columna de 1 mL (para cultivos de 10 mL) ó 5 mL (para cultivos de 500-1000 mL) de níquel quelado a ácido iminodiacético inmovilizado *HisTrap High Performance (GE Healthcare)*, para unir la etiqueta de histidinas de la proteína recombinante; para ello, se utilizó en primera instancia la bomba peristáltica de flujo *Pump P-1 (GE Healthcare)* para adsorber la muestra a la columna de níquel, lavando previamente la columna con agua destilada estéril y equilibrando con buffer A (NaCl 500 mM, Tris.HCl pH 8 50 mM) a un flujo de 1 mL/min durante 20 minutos. Luego, se pasó la totalidad de la fracción soluble de proteínas por la columna a idéntico flujo. El “*flow-through*”, o la fracción de la muestra no adherida a la columna, se guardó a 4 °C para posteriores análisis electroforéticos. En segunda instancia, se utilizó el sistema de purificación *ÄKTA purifier (GE Healthcare)*; las proteínas solubilizadas con buffer A se cargaron a la misma columna, equilibrada con el mismo buffer, a un flujo controlado de 1 mL/min. Una vez que los componentes no adsorbidos a la columna eluyeron completamente (*i. e.*, que la medida de absorbancia tomara un valor aproximado de 0 UA), se procedió a eluir la muestra de interés empleando un gradiente creciente de buffer B (NaCl 500 mM, Tris.HCl pH 8 50 mM, imidazol 500 mM) lineal (de 4 a 100% en 30 mins. o 1 h.) o escalonado (escalones de 20, 40, 65

y 100%) con flujo de 1 mL/min. Las muestras eluidas fueron colectadas en microplacas de 30 nm en eluatos de 0,5 ó 1 mL, y se guardaron a 4 °C. En algunos casos, se realizó alternativamente cromatografía de afinidad a cobalto con una columna *HiTrap TALON Crude* de 1 mL (*GE Healthcare*) procediendo de idéntica manera. Se realizó análisis por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida de las eluciones. En caso de haber obtenido la proteína de interés soluble en cantidades considerables pero con impurezas, se pasó al siguiente paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna *HiLoad 26/60 Superdex 200* (*GE Healthcare*). La corrida se realizó utilizando 10 mL de muestra, con buffer Tris.HCl pH 8 50 mM y NaCl 150 mM, empleando un flujo de 1 mL/min. La purificación se realizó siguiendo el protocolo del fabricante.

Como paso adicional o alternativo de purificación, y teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de la proteína de interés, se realizó cromatografía de intercambio aniónico en condiciones nativas. Pevio a este paso de purificación, se realizó un desalado de la muestra con la columna *PD-10 Desalting Column* (*GE Healthcare*), que contiene 8,3 mL de medio *Sephadex G-25*, siguiendo el protocolo del fabricante (protocolo de gravedad). Las muestras sin sales se purificaron en el sistema *ÄKTA purifier* utilizando una columna *MonoQ* (*GE Healthcare*) siguiendo el protocolo del fabricante.

### **Inmunoensayos y espectrometría de masa**

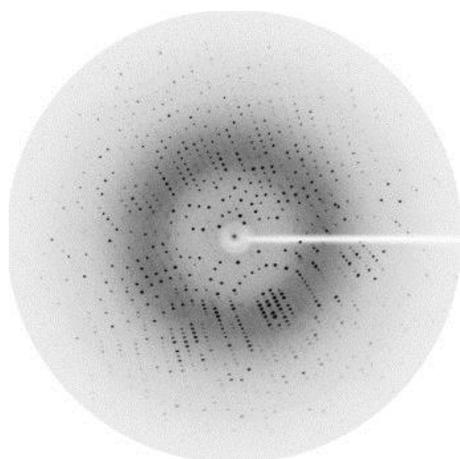
Para verificar la presencia de PK4 en los eluatos de la purificación, se realizó con ellos electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y se transfirió a membrana de nitrocelulosa *Amersham Hybond-P* (*GE Healthcare*) mediante electroforesis húmeda en una cuba de transferencia *TE22* (*Amersham Biosciences*) a 50 mA durante 14 horas, con buffer de transferencia 10x con etanol 10%. Una vez completa la transferencia, se incubó la membrana con solución de bloqueo (BSA 3%) durante 30 minutos con agitación constante. El inmunoensayo indirecto se realizó en primera instancia incubando con 1 µL de anticuerpo primario (anti-HisTag, 1000x) en 5 mL solución de bloqueo durante 2 horas, y en segunda instancia con 1 µL de anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa, 10000x) en 10 mL de solución de bloqueo incubando durante 30 minutos. Entre cada instancia de incubación se realizó lavado con buffer PBS 1x Tween 0,1%, recambiando el buffer 3 veces y lavando cada vez por 5 minutos, con agitación constante y fuerte. El último lavado, posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se hizo únicamente con PBS 1x. Las membranas se revelaron usando placas *Hyperfilm ECL High Performance Chemiluminescence* (*Amersham Biosciences*) y el kit de sustrato quimioluminiscente *Supersignal* (*Thermo Scientific*) con luminol y peróxido de hidrógeno, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis MS y MS/MS de las bandas de proteínas extraídas de geles de poliacrilamida se realizó en un equipo MALDI-TOF-TOF (*Applied Biosystems*), en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo.

### Rastreo preliminar de condiciones de cristalización

La proteína recombinante PK4 purificada fue concentrada utilizando dispositivos centrifugables *Vivaspin* (*Sigma*) de 20 mL, centrifugando en tandas de 10 mins a 5000 rpm y 4 °C hasta obtener un volumen final de 1 mL, y determinando la concentración final de proteína por espectrofotometría a 280 nm.

A modo de obtener cristales únicos, de calidad adecuada para hacer experimentos de difracción de rayos X, se realizó un rastreo preliminar de condiciones de cristalogénesis. En primer lugar, se realizó un ensayo de precrystalización utilizando el kit *Pre-Crystallization Test HR2-140 & HR2-142* en placas *VDX* (*Hampton Research*) siguiendo el protocolo del fabricante para determinar la concentración de proteína apropiada para el rastreo de cristalogénesis. Una vez realizado, se utilizó el robot de cristalización *Honeybee963* (*Digilab Genomic Solutions*) para rastrear 384 condiciones iniciales independientes de cristalogénesis (Kit JCSGI, II, III y IV, *Qiagen*) por difusión de vapor en gota sentada a 20 °C, utilizando placas robóticas *CrystalQuick* (*Greiner, Hampton Research*). En este contexto, se sembró en las placas 2 gotas de 150 nL en paralelo, una con proteína únicamente y otra con proteína, AMP-PCP 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Las condiciones iniciales con las cuales se obtuvieron cristales se componían de 0,1 M CAPS pH 10,5 y 40% (v/v) MPD (condición 1); y 1 M LiCl<sub>2</sub>, 0,1 M Tris pH 8,5 y 20% (p/v) PEG 6000 (condición 2), en reservorios de 90 µL. Para determinar las condiciones a optimizar, las placas fueron visualizadas tres días después con el equipo *Cryscam* (*Art Robbins*) para la selección de candidatos. Posteriormente, las condiciones seleccionadas fueron optimizadas manualmente por difusión de vapor en gota colgante en placas *VDX* a 4 °C. Para ello, en la condición 1 se varió el pH utilizando CAPS 0,1 M pH 9,5; pH 10 y pH 11, mientras que en la condición 2 no hubo variantes en la preparación de la gota colgante, con respecto a la gota sentada. Se realizó difracción de rayos X de los cristales seleccionados en el equipo *MicroMax 007 HF* (*Rigaku*), y se determinó la presencia de la proteína de interés en los cristales de acuerdo al patrón de difracción obtenido. En general, el patrón consiste en puntos de intensidad variable y cercanos entre sí, ya que cuanto menor sea el espacio entre átomos en el cristal (espacio real), menor será la distancia entre los puntos detectados (espacio recíproco; Figura 8).

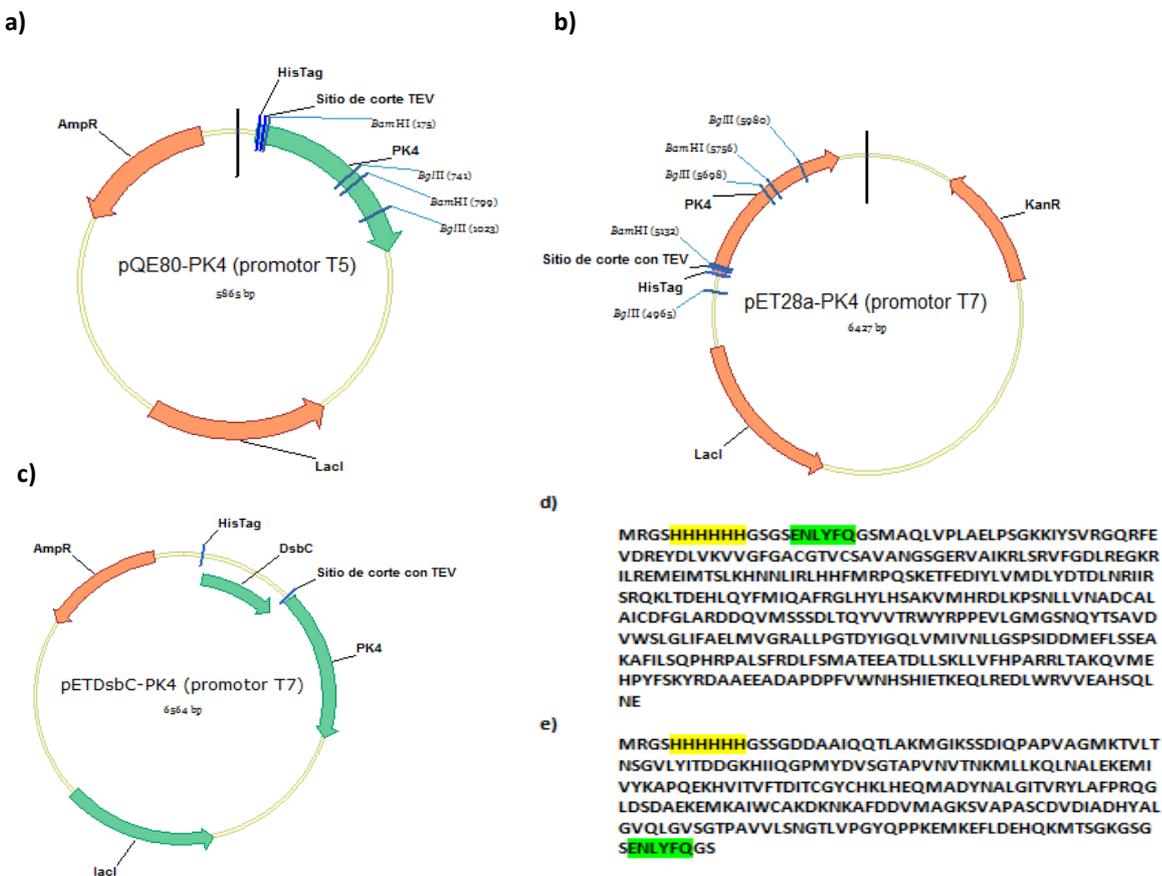


**Figura 8.** Ejemplo de patrón de difracción de rayos X esperado para una molécula proteica. Fuente: [http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte\\_07.html](http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_07.html).

## RESULTADOS

### Construcciones recombinantes generadas y secuencia aminoacídica de PK4

Se clonó el marco abierto de lectura de PK4 en los vectores de expresión pQE80 y pET28a mediante el método de clonado sin enzimas de restricción (Figura 9a, b respectivamente). A su vez se nos cedió generosamente una construcción en fusión con la proteína DsbC en pET (Figura 9c; Agustín Correa, Unidad de Proteínas Recombinantes, Institut Pasteur de Montevideo). La secuencia aminoacídica de PK4 recombinante consta de 385 aminoácidos, un peso molecular teórico de 44 kDa y un punto isoeléctrico de 6,34 (Figura 9d). La fusión DsbC-PK4 posee 605 aminoácidos, un peso molecular teórico de 68 kDa y un punto isoeléctrico de 6,21. La secuencia de DsbC recombinante se incluye en la Figura 9e.

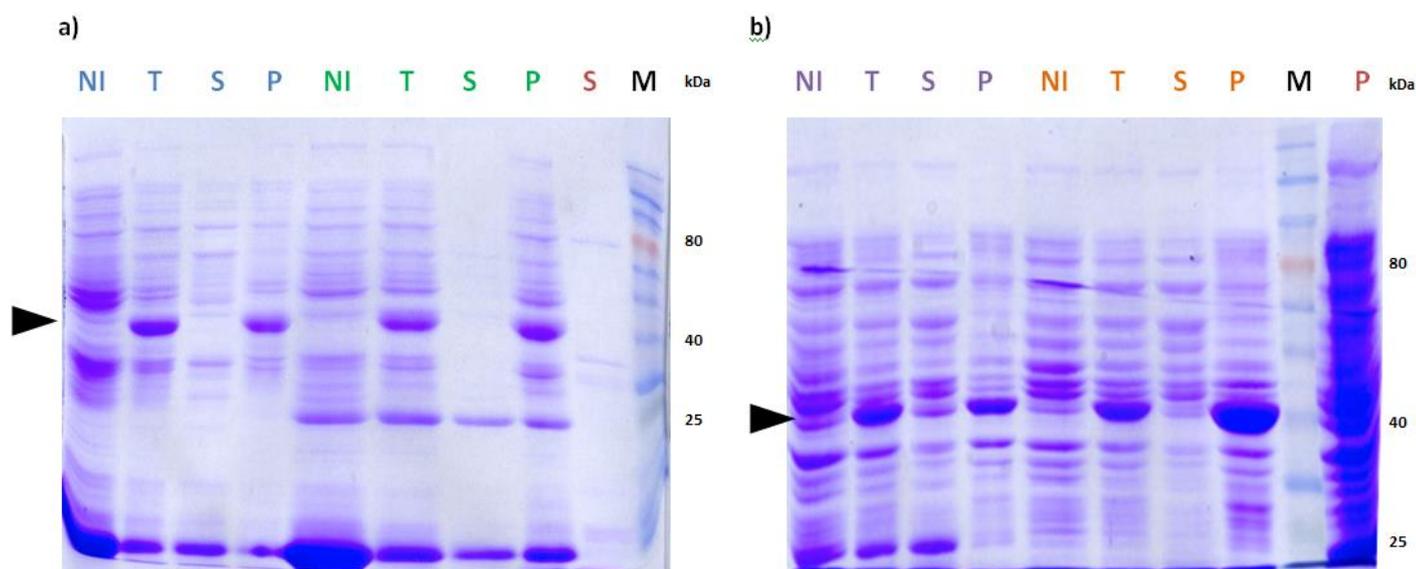


**Figura 9.** Vectores recombinantes generados por el método de clonado sin enzimas de restricción. **(a)** pQE80-PK4. **(b)** pET28a-PK4. **(c)** pETDsbC-PK4. Se observan los sitios de restricción para las enzimas *BglIII* y *BamHI*. AmpR: resistencia a ampicilina; KanR: resistencia a kanamicina; lacl: represor lac; HisTag: etiqueta de histidinas. Se muestran también las secuencias aminoacídicas de las proteínas recombinantes PK4 **(d)** y DsbC **(e)**. Las etiquetas de histidinas se observan subrayadas en amarillo y las secuencias de corte con TEV en verde.

### Expresión y purificación de PK4 en vector pQE80

Se realizó un ensayo de expresión a pequeña escala (10 mL de cultivo) a 37 °C mediante inducción con IPTG 1 mM utilizando las cepas BL21, TOP10F', HMS174, C41 y RosettaBlue, y se analizó el extracto total y las fracciones soluble e insoluble por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes

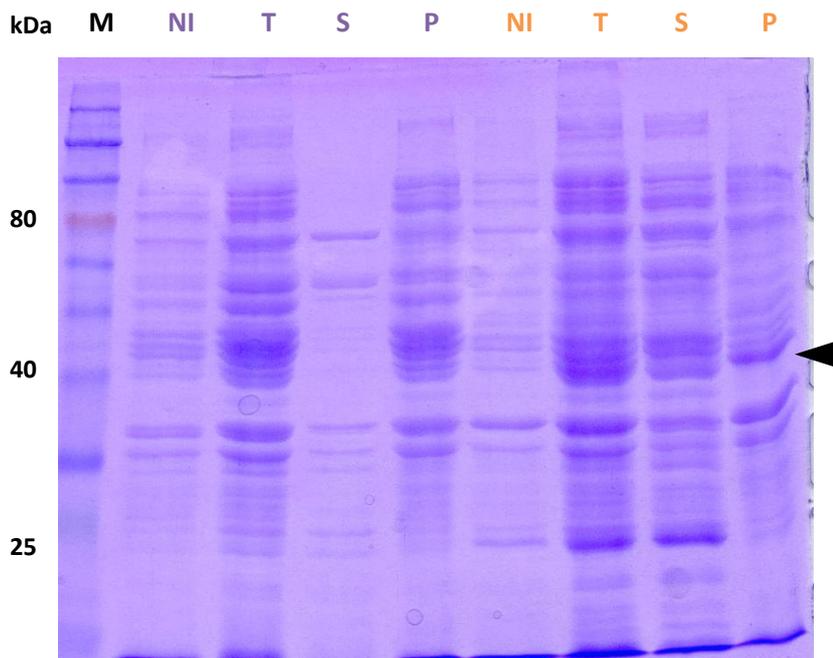
o SDS-PAGE (Figura 10a, b). En estas condiciones, se logró sobreexpresar PK4 en todas las cepas, pero mayoritariamente en forma insoluble. Se observó, sin embargo, una tenue banda a la altura de los 44 kDa en las fracciones solubles de BL21 y HMS174. En consecuencia, se seleccionaron ambas cepas para llevar a cabo el ensayo de expresión a corta escala (10 mL de cultivo) a 20 °C, en búsqueda de obtener un mejor rendimiento de PK4 soluble.



**Figura 10.** Análisis por SDS-PAGE (10% acrilamida) de la expresión de PK4 en vector pQE80 a 37 °C por 3 hs. en las cepas: **(a)** TOP10F' (azul), RosettaBlue (verde) y C41 (rojo); **(b)** BL21 (violeta), HMS174 (naranja) y C41 (rojo). Para la inducción se utilizó IPTG 1 mM. Se sembraron 15 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo, con previa desnaturalización a 100 °C por 5 mins. Las flechas negras indican la banda correspondiente a PK4 (peso molecular teórico: 44 kDa). NI: fracción no inducida; T: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; M: marcadores de peso molecular.

Las fracciones obtenidas tras el ensayo de expresión a 20 °C por 14 hs. fueron también analizadas por SDS-PAGE (Figura 11). En este caso se observó una banda a la altura del tamaño esperado de PK4 en ambas fracciones solubles, de mayor intensidad a la obtenida induciendo a 37 °C. La banda de mayor intensidad correspondiente a proteína soluble fue observada en la fracción de la cepa BL21. Sin embargo, la expresión de PK4 en todos los casos siguió siendo mayoritariamente insoluble.

A modo de obtener grandes cantidades de proteína pura, se seleccionó la fracción soluble de BL21 inducida a 20 °C, realizando ensayos a mayor escala (500 mL de cultivo), para ser purificada en condiciones nativas por cromatografía de afinidad a níquel o cobalto inmovilizado, dos metales de transición divalentes. Para esto, se empleó un gradiente lineal creciente de buffer B, el cual contiene imidazol 500 mM. Para todos los casos se empleó una concentración inicial de 4% de buffer B (20 mM imidazol), a los fines de minimizar uniones inespecíficas a la columna. Se realizó en primer lugar purificación por afinidad a níquel de la fracción soluble de BL21, donde se obtuvo un pico de absorbancia al llegar a 30% de buffer B (Figura 12a). Para verificar la pureza de los eluatos, se analizaron por SDS-PAGE los picos de absorbancia obtenidos (Figura 12b) y se analizó la presencia de la etiqueta de histidinas presente en PK4 mediante Western blot, utilizando

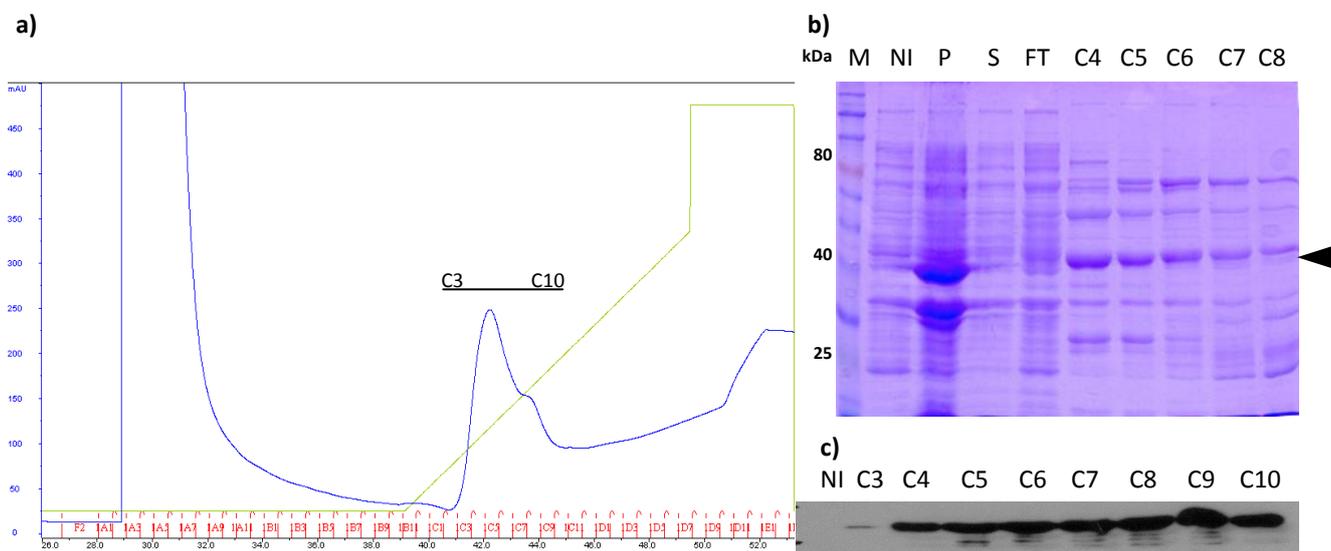


**Figura 11.** Análisis por SDS-PAGE (10% acrilamida) de la expresión de PK4 en vector pQE80 a 20 °C por 14 hs en las cepas de *E. coli* HMS174 (violeta) y BL21 (naranja). Para la inducción se utilizó IPTG 1 mM. Se sembraron 10  $\mu$ L de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol en cada pocillo, con previa desnaturalización a 100 °C por 5 mins. La flecha negra indica la banda correspondiente a PK4 (peso molecular teórico: 44 kDa). NI: fracción no inducida; T: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; M: marcadores de peso molecular.

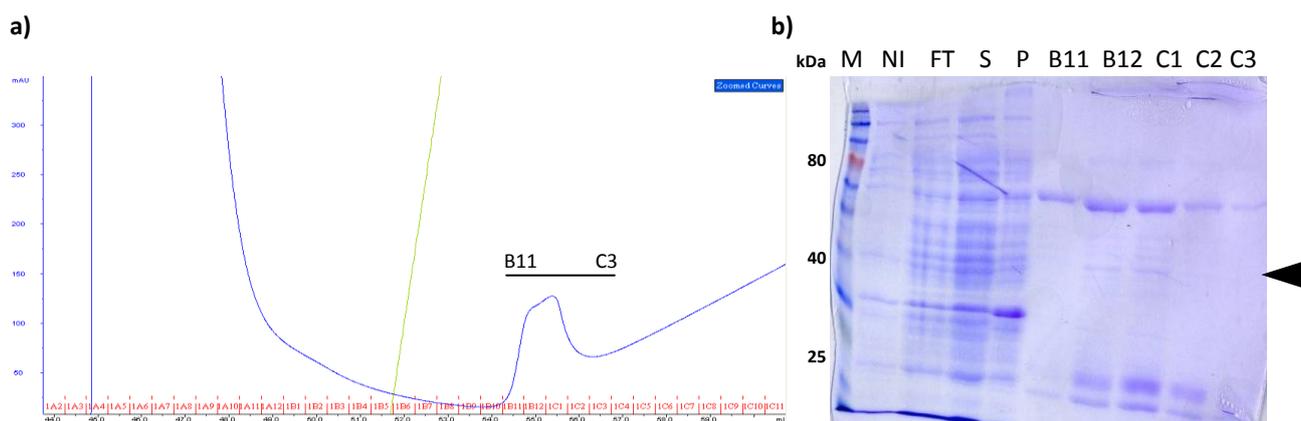
un anticuerpo específico anti-Histidinas (Figura 12c). Se observa en el gel una banda intensa a la altura de los 44 kDa en los eluatos C4 a C8, sin embargo ésta no corresponde a PK4 sino otra banda, más tenue, inmediatamente por debajo y observada con claridad en el carril correspondiente al eluato C8. De esta manera, se determinó la presencia PK4 en forma soluble, en bajas cantidades. Adicionalmente, se determinó tras purificación por afinidad a níquel que la proteína eluye con contaminantes. Para dar una idea semicuantitativa del rendimiento obtenido de PK4, partiendo de 500 mL de cultivo, y con un paso de purificación por cromatografía de afinidad a níquel, se obtuvieron aproximadamente 10  $\mu$ g de PK4, de acuerdo a SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, teniendo en cuenta que una banda tenue corresponden aproximadamente a 50 ng de proteína. Para poder planear estudios estructurales precisamos llegar a obtener 5-10 mg de proteína; de allí el interés de optimizar significativamente los rendimientos de expresión. También se trabajó en optimizar las condiciones de lisado celular, incrementando las amplitudes de los ciclos de sonicated y la concentración de lisozima empleada (ver Métodos para protocolo de lisado puesto a punto).

Con el fin de optimizar el paso de purificación por afinidad a metal inmovilizado, se empleó alternativamente cromatografía de afinidad a cobalto (Figura 13a). El pico de absorbancia, también obtenido con 30% de buffer B, fue analizado por SDS-PAGE (Figura 13b), donde se observó que PK4 también eluye en bajas cantidades y con contaminantes. Adicionalmente, teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de PK4 (~6,2), se realizó cromatografía de intercambio iónico a pH 8,5 con buffer A (Tris 20 mM pH 8,5 con NaCl 100 mM) y un

gradiente lineal de buffer B (Tris 20 mM pH 8,5 con NaCl 500 mM) para permitir la elución de PK4 por aumento de fuerza iónica. Dado que a pH 8,5 la proteína se encuentra cargada negativamente, se empleó una matriz cargada positivamente para permitir su adsorción (intercambio aniónico). El análisis por SDS-PAGE de los eluatos correspondientes a los picos de absorbancia no reveló presencia detectable de PK4 (datos no mostrados).



**Figura 12.** (a) Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de BL21 tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA<sub>280</sub> vs mL elución); gráfico verde: gradiente lineal de imidazol (4-100% en 30 mins.). (b) Evaluación del pico de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos C4 a C8. Se incluyó en el análisis las fracciones no inducida (NI), insoluble (P), soluble (S) y “flowthrough” o componentes no adsorbidos a la columna (FT). Se sembraron 10 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo. En todos los casos se desnaturizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha negra indica la banda correspondiente a PK4 (peso molecular teórico: 44 kDa). (c) Western blot anti-etiqueta de histidinas de las eluciones C3 a C10 y la fracción no inducida. La señal de anticuerpo secundario se observó a la altura de 44 kDa aproximadamente. Se sembraron 15 µL de muestra en el gel transferido a membrana.

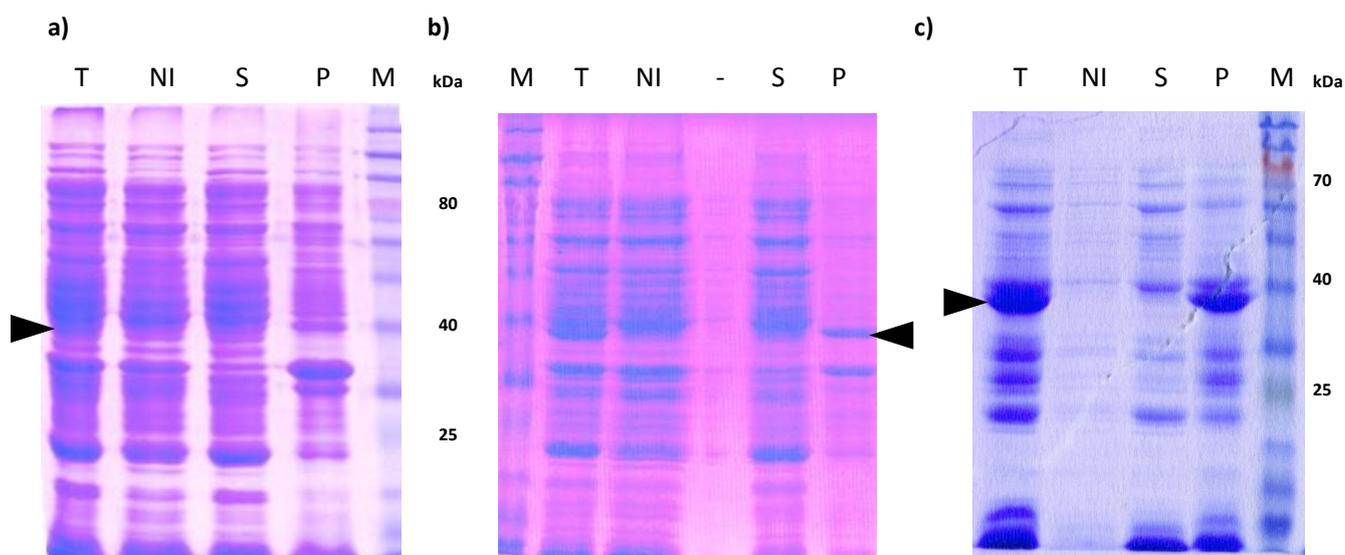


**Figura 13.** (a) Cromatograma de purificación por afinidad a cobalto de fracción soluble de BL21 tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA<sub>280</sub> vs mL elución); gráfico verde: gradiente lineal de imidazol (4-100% en 30 mins.). (b) Evaluación del pico de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos B11 a C3, sembrando 20 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis las fracciones no inducida (NI), soluble (S), insoluble (P) y “flowthrough” (FT), sembrando 10 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo. En todos los casos se desnaturizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha negra indica la banda correspondiente a PK4 (peso molecular teórico: 44 kDa).

### Expresión y purificación de PK4 en vector pET28a

Con el fin de obtener un mayor rendimiento de PK4 soluble, se realizó inducción de la expresión de la proteína bajo el control transcripcional de un promotor que emplea una polimerasa de distinto origen. Se realizaron ensayos de expresión a pequeña escala (10 mL de cultivo) a 37 °C mediante inducción con IPTG utilizando las cepas BL21, C41 y RosettaBlue, y se analizó el extracto total y las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE (Figuras 14a, b, c). Se logró sobreexpresar PK4 en todas las cepas, sin embargo, el uso de la ARN polimerasa T7 no resultó en una mejora del rendimiento de expresión soluble, ya que el análisis por gel mostró expresión de PK4 en forma mayoritariamente insoluble, excepto en la cepa BL21 donde la proteína no logró sobreexpresarse.

De cualquier modo, se decidió proceder con un ensayo de purificación por afinidad a níquel partiendo de mayor volumen de cultivo (500 mL), induciendo a 37 °C, y utilizando la cepa RosettaBlue de *E. coli*. El perfil de elución mediante gradiente lineal de imidazol no reveló presencia detectable de PK4 (datos no mostrados).



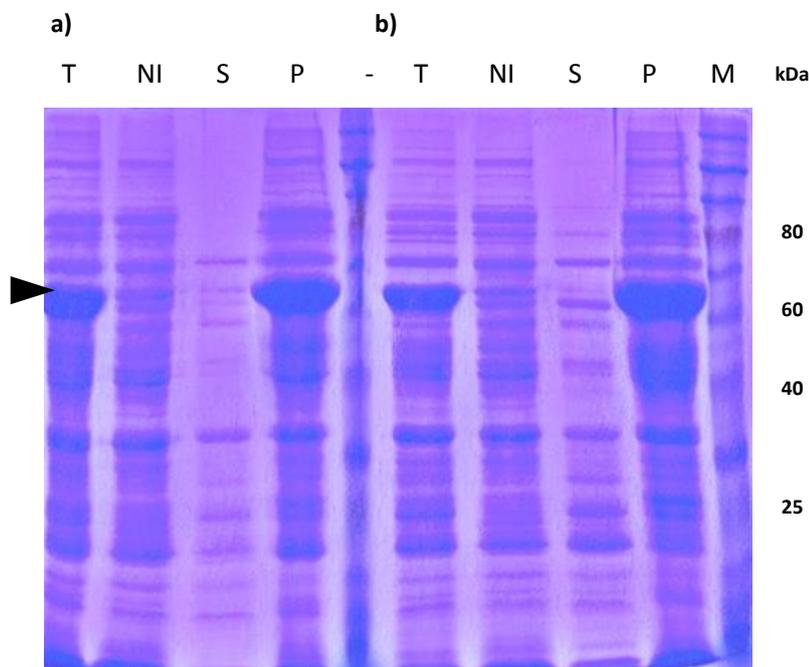
**Figura 14.** Análisis por SDS-PAGE (10% acrilamida) de la expresión de PK4 en vector pET28a a 37 °C por 3 hs. en las cepas: **(a)** BL21, **(b)** C41 y **(c)** RosettaBlue. Para la inducción se utilizó IPTG 1 mM. Se sembraron 10  $\mu$ L de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol en cada pocillo, excepto para BL21 (5  $\mu$ L muestra) y RosettaBlue (20  $\mu$ L muestra), con previa desnaturalización a 100 °C por 5 mins en todos los casos. Las flechas negras indican la banda correspondiente a PK4 (peso molecular teórico: 44 kDa). NI: fracción no inducida; T: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; M: marcadores de peso molecular.

### Expresión y purificación de PK4 con fusión a DsbC

Es posible que especies proteicas heterólogas para *E. coli*, no puedan ser adecuadamente expresadas, debido a plegamientos incorrectos de la proteína y/o estrés celular, resultando en definitiva en la formación de agregados hidrofóbicos o cuerpos de inclusión (Xu *et al.*, 2008). Para facilitar su plegamiento y/o aumentar su solubilidad, se utilizó una construcción recombinante DsbC-PK4 clonada en un vector pET,

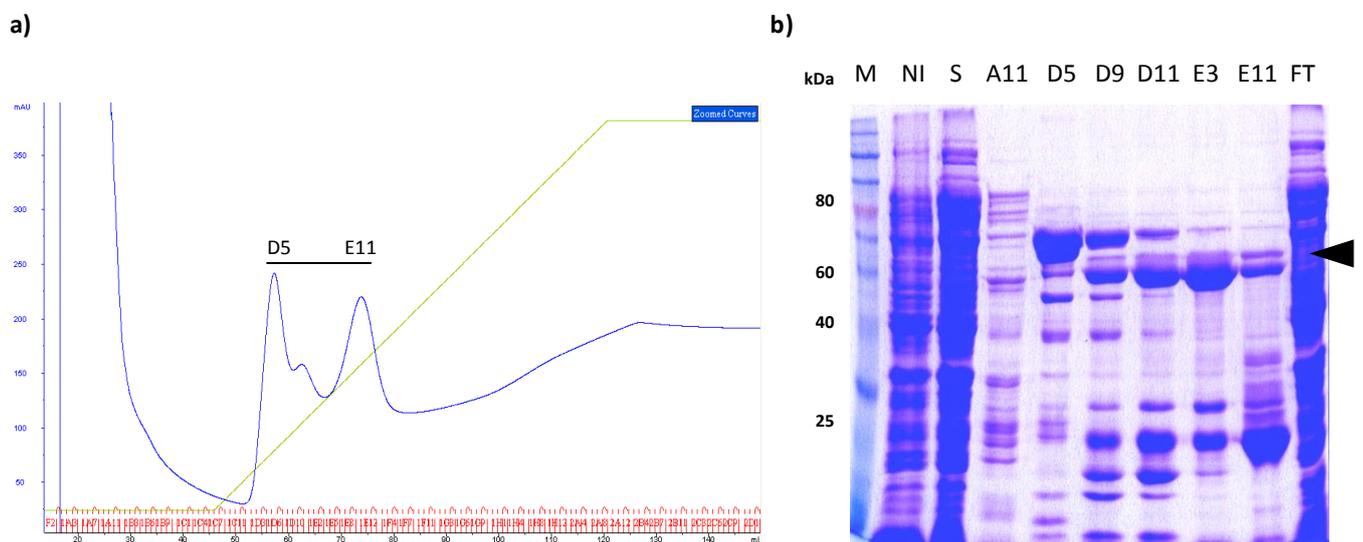
donde se encuentra bajo control transcripcional de un promotor T7 y regulado por un operador *lac*, por lo que también es inducible por IPTG. Se realizaron ensayos de expresión de la fusión con 10 mL de cultivo tanto a 37 °C por 3 horas, como a 20 °C por 14 horas. La etiqueta de histidinas agregada al extremo amino terminal de DsbC recombinante interrumpe su traslocación al periplasma, truncando la secuencia señal de traslocación (DDAAIQQLAKMGIKSSDIQ) y recluyendo a la proteína recombinante fusionada a PK4 en el citoplasma bacteriano. Las muestras no inducida, total, soluble e insoluble fueron posteriormente analizadas por SDS-PAGE; el objetivo en este caso apuntaba así a observar una banda de tamaño aproximado de 68 kDa (Figura 15a, b). Se observó que la expresión de PK4 fusionada a DsbC siguió siendo mayoritariamente insoluble, aunque pudiéndose apreciar una tenue banda a la altura del peso esperado, en la fracción soluble tanto a 20° como a 37 °C.

Teniendo en cuenta el análisis por SDS-PAGE, para la purificación por afinidad a níquel se realizó ensayo de expresión con 1 L de cultivo a 20 °C. A modo de poner a punto el protocolo de purificación de la fusión DsbC-PK4, se empleó gradiente de imidazol tanto lineal (4 a 100% en 1 hora) como escalonado (escalones de 20, 40, 65 y 100%). El perfil de elución por gradiente lineal de imidazol mostró tres picos de absorbancia solapados a 18, 30 y 40% de imidazol agregado, respectivamente (Figura 16a). Los picos fueron analizados por SDS-PAGE, donde se observó en el análisis de los tres picos una banda tenue rondando los 65 kDa que corresponde a DsbC-PK4, obteniéndose en mayores cantidades que en la purificación de PK4 sin fusión, aunque aún en presencia de contaminantes. Se observó que DsbC-PK4 migra en el gel entre dos bandas



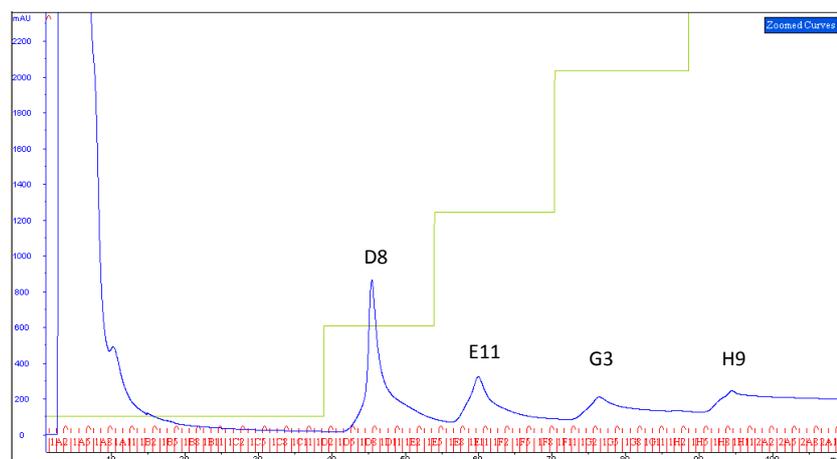
**Figura 15.** Análisis por SDS-PAGE (10% acrilamida) de la expresión de DsbC-PK4 en vector pET, cepa Rosetta. **(a)** 37 °C por 3 hs. y **(b)** 20 °C por 14 hs. Para la inducción se utilizó IPTG 1 mM. Se sembraron 15 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo, con previa desnaturalización a 100 °C por 5 mins. La flecha negra indica la banda correspondiente a DsbC-PK4 (peso molecular teórico: 68 kDa). NI: fracción no inducida; T: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; M: marcadores de peso molecular.

intensas correspondientes a dos contaminantes mayoritarios que eluyen de forma reproducible (Figura 16b). Alternativamente, tras ensayo de expresión con 1 L de cultivo a 20 °C por 14 hs, se realizó purificación por afinidad a níquel empleando escalonado de imidazol, partiendo inicialmente desde 4% de imidazol y aumentando su concentración de forma escalonada a 20, 40, 65 y 100% de imidazol (Figura 17a). El perfil de elución mostró cuatro picos de absorbancia de aproximadamente 900, 300, 200 y 250 mUA en los escalones de 20, 40, 65 y 100% de imidazol, respectivamente. Los picos fueron analizados por SDS-PAGE (Figura 17b), donde se vio que DsbC-PK4 eluye a concentraciones de 40, 65 y 100% de imidazol, siendo la fracción más pura la obtenida a una concentración de 100% de imidazol. También se observaron las bandas intensas a 20 y 40% de imidazol, correspondientes a los contaminantes mayoritarios que eluyen de manera reproducible. Se determinó por espectrometría de masa la presencia de DsbC-PK4 soluble (Figuras 18, 19) y la identidad de estos contaminantes: la decarboxilasa de UDP-glucuronato (dUGA; peso molecular teórico: 73 kDa) y la chaperonina GroEL/ES (peso molecular teórico: 55 kDa) de *E. coli*. La banda mayoritaria observada a la altura de los 25 kDa corresponde a DsbC nativa monomérica. Partiendo de un cultivo de 1 L e induciendo a 20 °C por 14 hs, se eligió proceder realizando escalonado de imidazol. Para intentar deshacernos del contaminante dUGA, que eluye a una concentración de 20% de imidazol, se partió inicialmente con 20% de buffer B y posteriormente se emplearon escalones de 40, 65 y 100% (Figura 20a), donde en todos se había constatado la elución de DsbC-PK4 (Figura 18). El perfil de elución muestra dos picos de absorbancia (de 600 y 400 mUA, aproximadamente), que fueron analizados por SDS-PAGE (Figura 20b). Se observó en el gel la presencia de bandas a la altura del tamaño esperado de DsbC-PK4, de mayor intensidad que las observadas en gel tras la

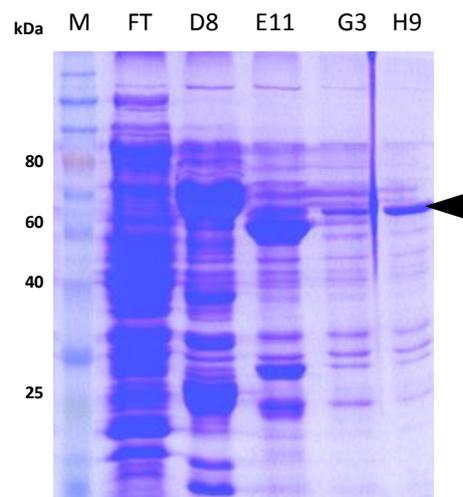


**Figura 16. (a)** Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de Rosetta tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA<sub>280</sub> vs mL elución); gráfico verde: gradiente lineal de imidazol (4-100% en 1 h.). **(b)** Evaluación del pico de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos A11, D5, D9, D11, E3 y E11, sembrando 20 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis las fracciones no inducida (NI), soluble (S), insoluble (P) y “flowthrough” (FT), sembrando 10 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo. En todos los casos se desnaturalizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha negra indica la banda correspondiente a DsbC-PK4 (peso molecular teórico: 68 kDa).

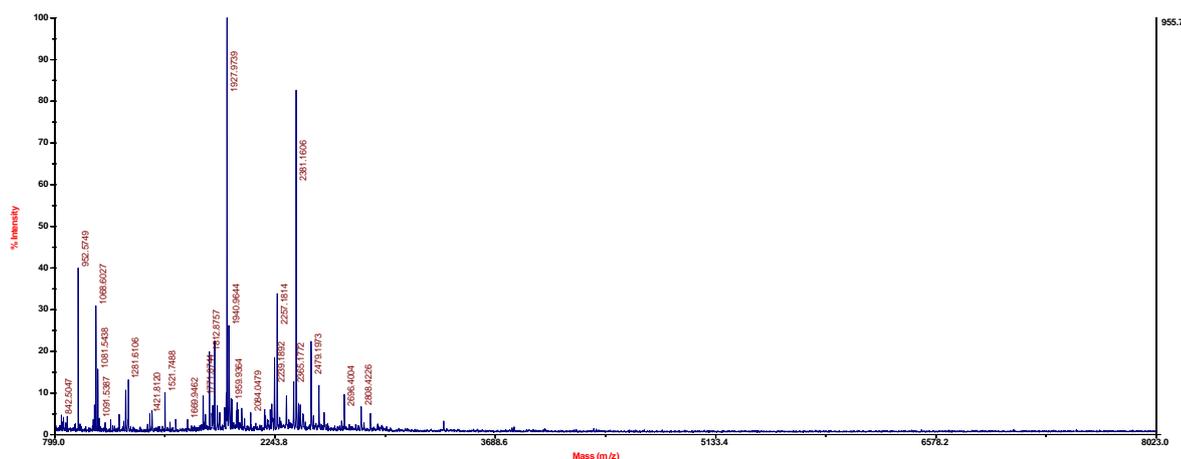
a)



b)



**Figura 17. (a)** Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de Rosetta tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA<sub>280</sub> vs mL elución); gráfico verde: gradiente escalonado de imidazol (4, 20, 40, 65 y 100%). **(b)** Evaluación del pico de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos D8, E11, G3 y H9, sembrando 20  $\mu$ L de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis el “flowthrough” (FT), sembrando 10  $\mu$ L de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol. En todos los casos se desnaturalizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha negra indica la banda correspondiente a DsbC-PK4 (peso molecular teórico: 68 kDa).



**Figura 18.** Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo (MALDI-TOF-TOF). Caracterización de la identidad de la banda correspondiente a DsbC-PK4 extraída del gel de poliacrilamida mediante espectrometría de masa, realizada en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo.

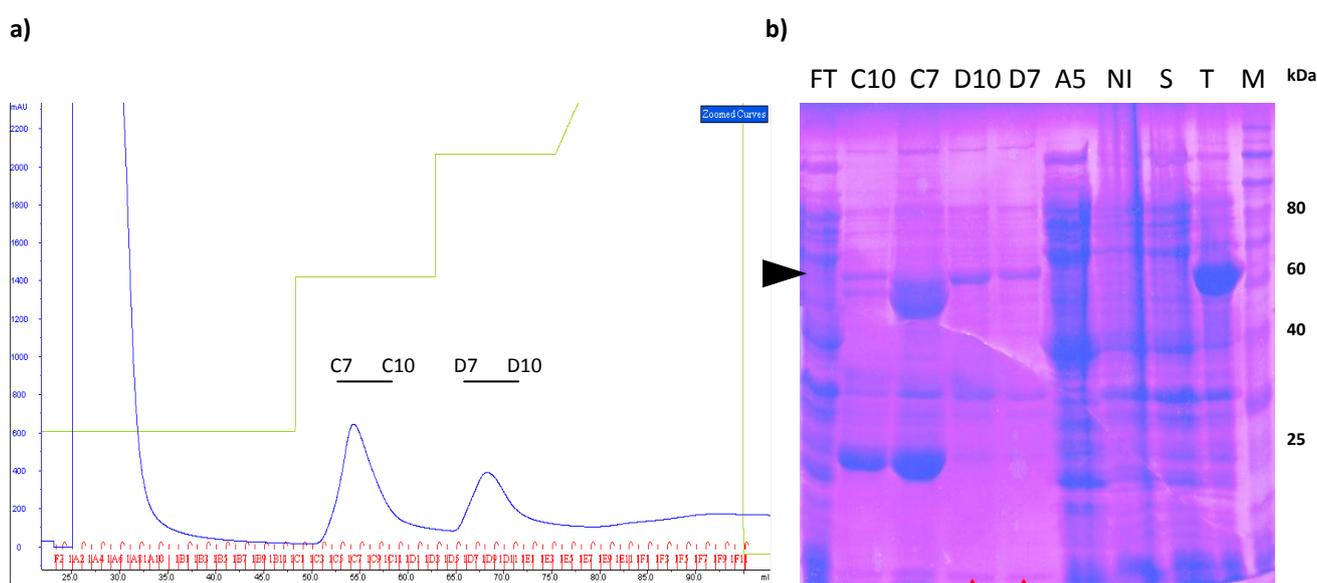
```

1 MRGSHHHHHH GSSGDDAAIQ QTLAKMGIKS SDIQPAPVAG MKTVLTNSGV
51 LYITDDGKHI IQGPMYDVSG TAPVNVTKM LLKQLNALEK EMIVYKAPQE
101 KHVITVFTDI TCGYCHKLHE QMADYNALGI TVRYLAFPRQ GLDSDAEKEM
151 KAIWCARDKN KAFDDVMAGK SVAPASCDVD IADHYALGVQ LGVSGTPAVV
201 LSNGLVPGY QPKEMKEFL DEHQKMTSGK GSGSENLYFQ GSMAQLVPLA
251 ELPSSGKKIYS VRGQRFVDR EYDLVKVVG F GACGTVC SAV ANSGSERVAI
301 KRLSRVFGDL REGKRILREM EIMTSLKHNN LIRLHHFMRP QSKETFEDIY
351 LVMDLYDTDL NR IIRSRQKL TDEHLQYFMI QAFRGLHYLH SAKVMHRDLK
401 PSNLLVNADC ALAICDFGLA RDDQVMSSSD LTQYVVTWY RPPEVLGMGS
451 NQYTSAVDVW SLGLIFAEML VGRALLPGTD YIGQLVMIVN LLGSPSIDDH
501 EFLSSEAKAF ILSQPHRPAL SFRDLFSMAT EEATDLLSKL LVFHPARRLT
551 AKQVMEHPYF SKYRDAAEEA DAPDPFVWNH SHIETKEQLR EDLWRVVEAH
601 SQLNE

```

**Figura 19.** Péptidos identificados por espectrometría de masa. Se indican en rojo los aminoácidos identificados con el análisis de la banda correspondiente a DsbC-PK4 recombinante, extraída del gel de poliacrilamida. Los aminoácidos identificados se muestran sobre la secuencia de DsbC-PK4 clonada. Se obtuvo una cobertura de secuencia del 38%.

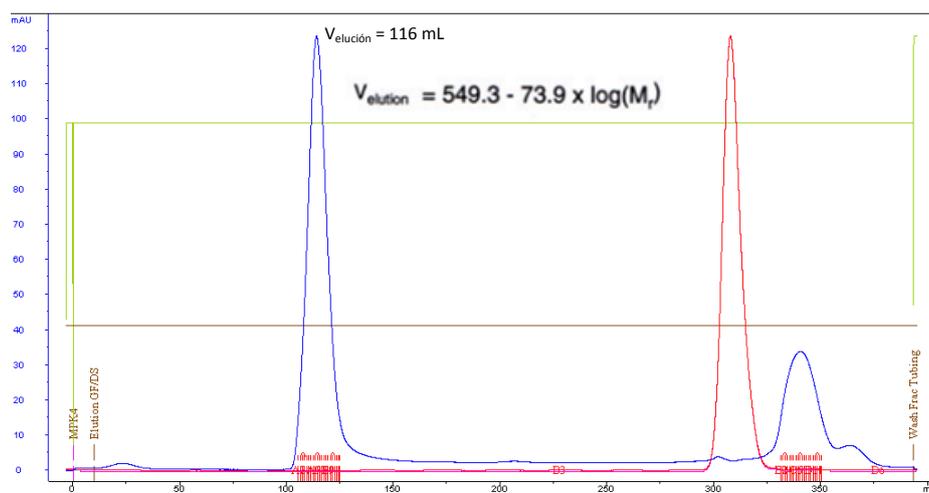
purificación de PK4 sin fusión. La fusión eluyó tanto en el escalón de buffer B 40% como de 65%, siendo mayoritaria la elución en éste último. No se observó posterior elución de la fusión tal como se vio en la Figura 17b, donde DsbC-PK4 eluye con la menor cantidad de contaminantes a 100% de imidazol. Cabe aclarar que la banda intensa correspondiente al eluato C7, rondando los 60 kDa, corresponde al contaminante GroEL/ES, y no a DsbC-PK4. Se observa claramente que dicha proteína migra inmediatamente por debajo de DsbC-PK4 en el eluato C10 (Figura 20b). De esta manera, es la primera vez que se obtiene PK4 soluble en cantidades significativas, de acuerdo a lo analizado por SDS-PAGE e identificado por espectrometría de masa. El corte con la proteasa TEV resultó en la precipitación de PK4, por lo que se trabajó con la fusión en la búsqueda de obtener cristales que difracten rayos X. Así, fueron seleccionados los eluatos D6 a D13 (10 mL de muestra) para el paso de purificación adicional.



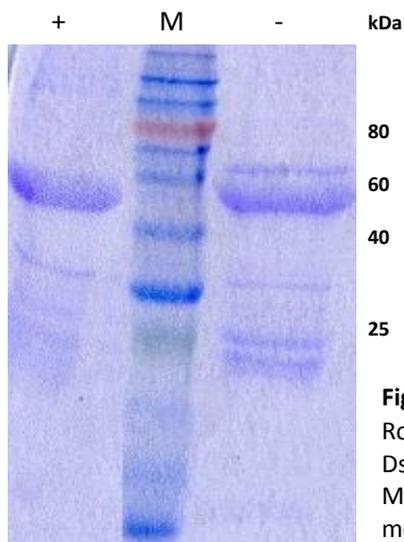
**Figura 20. (a)** Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de Rosetta tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA280 vs mL elución); gráfico verde: gradiente escalonado de imidazol (20-40-65-100%). **(b)** Evaluación de los picos de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos A5, C7, C10, D7 y D10. Se sembraron 20  $\mu$ L de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis el extracto total (T) y las fracciones no inducida (NI), soluble (S), insoluble (P) y “flowthrough” o componentes no adsorbidos a la columna (FT), donde se sembraron 5  $\mu$ L de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol. En todos los casos se desnaturalizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha negra indica la banda correspondiente a DsbC-PK4 (peso molecular teórico: 68 kDa). Las flechas rojas indican los carriles correspondientes a los eluatos empleados para el segundo paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular.

El paso adicional de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular por gel filtración, en condiciones nativas. El perfil de elución (Figura 21) mostró un pico de absorbancia a 280nm de aproximadamente 120 mUA a los 116 mL de volumen total eluído. El cálculo del peso molecular de DsbC-PK4, sustituyendo su volumen de elución en la ecuación observada en la Figura 20a correspondiente a la curva de calibración de la columna, determinó que el tamaño aproximado de DsbC-PK4 es de 730 kDa, por lo que podría tratarse de un decámero. Ensayos paralelos de dispersión de luz visible fueron consistentes con una estructura cuaternaria decamérica de la fusión DsbC-PK4 (datos no mostrados; Agustín Correa,

comunicación personal). De esta manera, pensamos que los monómeros del decámero DsbC-PK4 pueden estar interaccionando mediante puentes disulfuro: las condiciones oxidantes pudieron ser aportadas por el buffer utilizado en la cromatografía de afinidad, que otorga un pH 8 que hace muy reactivos a los tioles (Nozach et al., 2013). Para verificar esta hipótesis, se analizó la fusión por SDS-PAGE con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 22). El análisis por gel muestra idéntica migración de DsbC-PK4 con y sin agente reductor, lo cual descarta posibles interacciones mediante enlaces disulfuro covalentes y, por ende, una fuente de heterogeneidad.



**Figura 21.** Segundo paso de purificación por gel filtración de los eluatos D7 a D10 correspondientes a la cromatografía de afinidad a níquel mediante gradiente escalonado de imidazol (Figura 18). Se utilizó la columna *26/60 HiLoad Superdex 200*. Gráfico azul: perfil de elución; gráfico rojo: conductancia. En la parte superior de la figura se observa la ecuación de la función de calibración de la columna.  $V_{elution}$ : volumen de elución en mL;  $\log(M_r)$ : logaritmo decimal del peso molecular.



**Figura 22.** Análisis por SDS-PAGE (10% acrilamida) de fracción insoluble de cepa Rosetta con (+) y sin (-) agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) tras sobreexpresión de DsbC-PK4 con IPTG 1 mM. Las muestras fueron previamente resuspendidas en urea 8 M, y desnaturizadas calentando a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular.

En colaboración con Agustín Correa, se probaron construcciones adicionales que permiten la expresión de PK4 fusionada a dominios conocidos por mejorar niveles de expresión soluble de proteínas blanco; en este

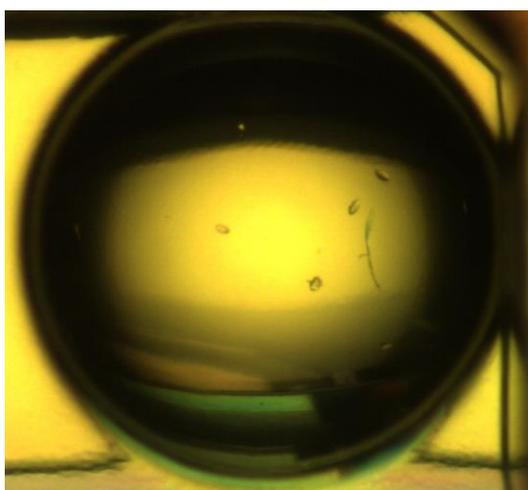
contexto, se sobreexpresó PK4 fusionada por su dominio N-terminal a la proteína de unión a maltosa (MBP), lo cual no resultó en un aumento significativo de rendimiento de PK4 soluble (datos no mostrados).

Las fracciones correspondientes al pico obtenido en la cromatografía de exclusión molecular fueron acumuladas reduciéndose en una única muestra, para luego ser concentrada con dispositivos centrifugables. El análisis espectrofotométrico a 280 nm determinó que, tras dos pasos de purificación y concentración de la muestra, se obtuvieron 8 mg/mL de DsbC-PK4. Sin embargo, este valor no es representativo de su cantidad total, debido a que la muestra presenta contaminantes minoritarios que, a su vez, pueden interferir con la cristalogénesis de la proteína de interés.

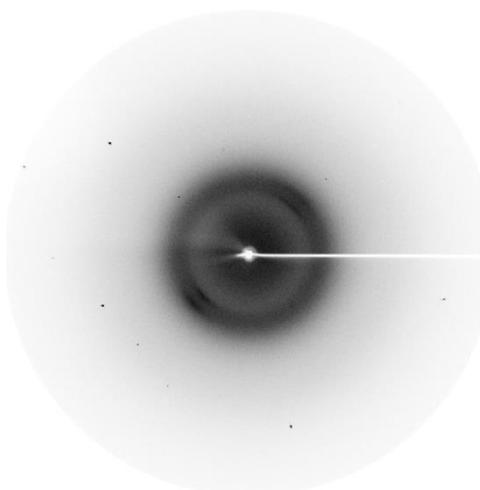
### Rastreo preliminar de condiciones de cristalización de DsbC-PK4

Se rastrearon 384 condiciones iniciales independientes de cristalogénesis por difusión de vapor en gota sentada a 20 °C. La proteína DsbC-PK4 estaba disuelta en el buffer de elución de la columna de gel filtración. En el ensayo se obtuvieron pequeños cristales (Figuras 23a, 24a) en dos condiciones diferentes del rastreo de cristalogénesis, conteniendo respectivamente 0,1 M CAPS pH 10,5 y 40% (v/v) MPD (Figura 23); y 1 M LiCl<sub>2</sub>, 0,1 M Tris pH 8,5 y 20% (p/v) PEG 6000 (Figura 24) en sus respectivos reservorios. En ambos casos, los cristales se formaron en la gota compuesta de muestra proteica (DsbC-PK4), AMP-PCP 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Los cristales seleccionados fueron sometidos a difracción por rayos X, donde los patrones de difracción (Figuras 23b, 24b) mostraron que ninguno de los cristales se componen de nuestra proteína de interés, debido a la ausencia de un patrón de difracción esperable para una proteína del tamaño y complejidad de DsbC-PK4. Probablemente, los cristales obtenidos correspondan a sales o pequeños péptidos que no corresponden a la proteína de interés.

a)

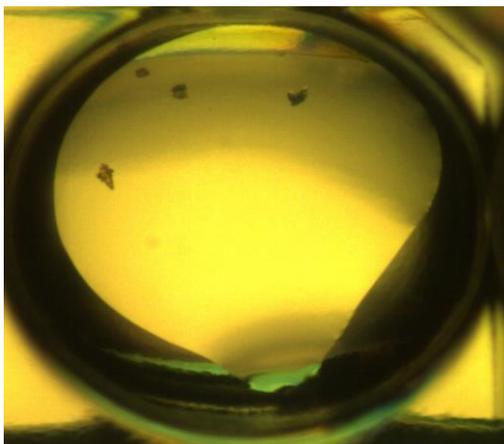


b)

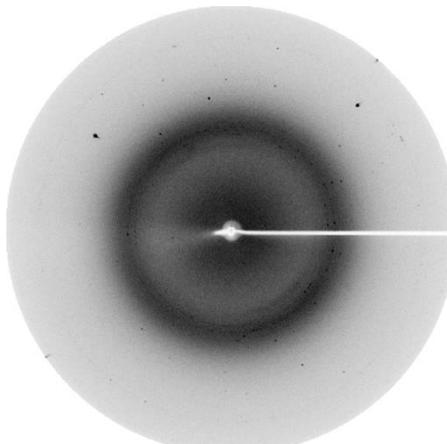


**Figura 23. (a)** Cristales obtenidos en el rastreo de cristalogénesis de la muestra con DsbC-PK4 en gota sentada, en reservorio de 90  $\mu$ L compuesto de 0,1 M CAPS pH 10,5 y 40% (v/v) MPD. Los cristales se formaron en la gota compuesta de muestra proteica (DsbC-PK4), AMP-PCP 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. **(b)** Patrón de difracción de rayos X obtenido para los cristales.

a)



b)



**Figura 24. (a)** Cristales obtenidos en el rastreo de cristalogénesis de la muestra con DsbC-PK4 en gota sentada, en reservorio de 90  $\mu\text{L}$  compuesto de 1 M  $\text{LiCl}_2$ , 0,1 M Tris pH 8,5 y 20% (p/v) PEG 6000. Los cristales se formaron en la gota compuesta de muestra proteica (DsbC-PK4), AMP-PCP 5 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. **(b)** Patrón de difracción de rayos X obtenido para los cristales.

## DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró clonar el marco abierto de lectura de PK4 recombinante de *Leishmania major* en los vectores de expresión pQE80 y pET28a, mediante el método de clonado sin enzimas de restricción. Los ensayos de sobreexpresión en el sistema de expresión procariota de *E. coli* mostraron en general ser exitosos, resultando en la producción recombinante de proteína del tamaño esperado. Sin embargo, también se observó que la proteína se agrega mayoritariamente en cuerpos de inclusión insolubles, lo que en definitiva resulta en una escasa producción de proteína soluble, en todo caso insuficiente para estudios cristalográficos y estructurales. Es por ello que se procedió a ensayar una serie de variaciones, de acuerdo a protocolos convencionales, que buscan modificar parámetros críticos de la sobreexpresión recombinante en bacterias. De manera general, estas modificaciones procuran disminuir la síntesis de proteínas o bien, en particular, la velocidad de síntesis de la proteína blanco. Frecuentemente esto redundaba en mayor oportunidad de plegamiento correcto, con lo que, aun si disminuye el rendimiento total de proteína producida, en casos favorables la fracción de proteína soluble aumenta significativamente. La inducción de expresión en pequeña escala fue así ensayada a distintas temperaturas y tiempos (37 °C por 3 h, o bien 20 °C por 14 h), aunque resultando en rendimientos bajos y similares de PK4 soluble. La temperatura seleccionada para los ensayos a gran escala fue de 20 °C sin embargo, pues se observó un ligero incremento en la proporción de PK4 soluble en relación a 37 °C. El uso de distintos promotores también apunta al mismo objetivo de ensayar distintas cinéticas de expresión proteica, por ejemplo usando un promotor más fuerte como T7, y otro algo más débil como T5. Los resultados indican que el rendimiento de expresión soluble de PK4, es muy semejante comparando ambos promotores, aunque queda pendiente el ensayo de sobreexpresión a 20 °C utilizando el promotor T7. En fin, los ensayos de expresión de PK4 fusionada a la disulfuro isomerasa DsbC, fueron un intento diferente, dirigido a aumentar la solubilidad de PK4 por acción “guiada” por una proteína “solubilizadora”. La fusión recombinante con la disulfuro isomerasa de *E. coli* DsbC resultó efectivamente en un aumento del rendimiento soluble de PK4, sugiriendo la utilidad de la actividad chaperona previamente documentada de DsbC. Con este sistema en fusión, se logró obtener el resultado más positivo, dado que por vez primera se lograron cantidades importantes de proteína soluble, al cabo de la primera etapa de purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Tras realizar un segundo paso de purificación (cromatografía de gel filtración) la fusión eluye como una forma aparentemente decamérica. Tras análisis por gel de acrilamida descartamos que las interacciones entre DsbC y PK4 ocurran mediante enlaces disulfuro. Sin embargo, en definitiva demostramos que este efecto estaba asociado a la presencia de DsbC, y no a un genuino efecto chaperona, dado que digiriendo la fusión con la proteasa TEV, inmediatamente PK4 precipitaba. La necesidad de una molécula chaperona para aumentar el rendimiento soluble de PK4 pueden

explicar la co-elución reproducible de la proteína GroEL/ES en la purificación por afinidad a níquel de la fusión recombinante. GroEL/ES es una chaperonina de *E. coli* que colabora interaccionando con proteínas de gran tamaño –tal como DsbC-PK4– y facilitando su correcto plegamiento (Chaudhuri *et al.*, 2009). En este contexto, es posible que GroEL/ES esté interaccionando con DsbC-PK4 dando lugar a una molécula de carácter decamérica. Asimismo, el homodímero de la proteína nativa presenta en su estructura tridimensional una hendidura hidrofóbica, que puede interactuar con residuos hidrofóbicos expuestos de proteínas mal plegadas (McCarthy *et al.*, 2000). Es posible que esté ocurriendo una oligomerización de proteínas mediante la interacción de los dominios N-terminales de DsbC entre ellos, y a su vez, de las hendiduras hidrofóbicas de DsbC con PK4. Estudios previos han documentado que la oligomerización de DsbC puede no ser siempre dimérica, sino que también es capaz de formar tetrámeros *in vitro* bajo condiciones oxidantes, que están relacionados con su actividad chaperona (Santos *et al.*, 2012).

El corte con la proteasa TEV de la fusión con DsbC resultó en la precipitación de PK4, por lo que la búsqueda preliminar de condiciones de cristalogénesis se realizó utilizando a PK4 fusionada a DsbC, de quien ya se conoce la estructura tridimensional (McCarthy *et al.*, 2000). Este rastreo permitió seguir los protocolos estado del arte para crecer cristales de macromoléculas, pero sólo pudimos identificar dos condiciones de cristalización, que revelaron no corresponder a PK4. Los patrones de difracción obtenidos con dichos *hits* iniciales resultaron en perfiles propios de pequeñas moléculas, con reflexiones muy intensas y muy separadas (correspondientes a una celda cristalina muy pequeña, incompatible con el tamaño de una especie macromolecular como PK4).

En relación a perspectivas futuras para continuar estos estudios en función de los objetivos planteados, nos interesa mencionar algunas líneas de acción pertinentes. El estudio estructural de biomoléculas mediante cristalografía de rayos X requiere de la obtención de grandes cantidades de la proteína de interés, de forma soluble, pura y homogénea. Los sistemas de expresión procariotas, como *E. coli*, suelen ser el hospedero predilecto para la expresión de proteínas heterólogas ya que ofrecen ventajas como facilidad de uso, bajo costo, tiempos de generación cortos y escalabilidad para la producción industrial de proteínas recombinantes (Zerbs *et al.*, 2014). No obstante, cuando se trata de sobreexpresar proteínas de origen eucariota, pueden aparecer dificultades debido a la ausencia de maquinaria postraduccional (*i. e.*, acetilación, metilación, fosforilación, glicosilación, etc.), que puede resultar en la producción de proteína inactiva y formación concomitante de cuerpos de inclusión insolubles (Sahdev *et al.*, 2008). No se puede descartar que en el caso que nos ocupa con PK4 de *Leishmania*, modificaciones estructurales postraduccionales sean efectivamente imprescindibles para su correcto plegamiento y funcionalidad. Se ha documentado en *E. coli* que la expresión en forma soluble de quinasas de serina/treonina aumenta, cuando se las co-expresan con sus respectivos activadores específicos río arriba, en la cascada de señalización (Yue *et al.*, 2000). En este contexto, como siguiente paso podríamos intentar la co-expresión de MKK5, MAPKK

específica para PK4 (John von Freyend *et al.*, 2010) procurando aumentar la solubilidad de nuestra proteína de interés en un sistema de expresión procarionta. De ser exitosa, esta aproximación permitiría, simultáneamente, obtener PK4 en su conformación fosforilada (estado activo en MAPKs), para posteriores análisis de eventuales inhibidores mediante ensayos enzimáticos (John von Freyend *et al.*, 2010) y estudios estructurales de complejos. Adicionalmente, pueden evaluarse también ensayos de expresión en sistemas eucariotas que aporten la maquinaria de modificación postraduccional que permita el correcto plegamiento de PK4, resultando en un aumento de su solubilidad.

Se podrá también, en paralelo, emplear ortólogos de PK4 de otras especies patógenas de *Leishmania*. El alineamiento múltiple de cuatro ortólogos pertenecientes a las especies *L. major* (utilizada en este trabajo), *L. mexicana*, *L. infantum* y *L. braziliensis* muestra la gran similitud entre las secuencias, sin embargo, algunos cambios puntuales poco conservativos de LmaPK4 respecto a sus homólogos (Figura 25, puntos simples) pueden dar pauta de que podrían eventualmente verse diferencias de comportamiento físicoquímico, que resulten en diferente solubilidad en sobre-expresión heteróloga, así como luego en cristalización. De esta manera, alguno de los ortólogos puede derivar en la producción de proteína en forma soluble y cristizable.

```
LmaPK4      MAQLVPLAELPSGKKIYSVRGQRFQFEVDREYDLVKVVGFGACGTVC SAVANGSGERVAIKR
LmxPK4      MTQLVPLAELPSGKKIYSVRGQRFQFEVDROQYDLVKVVGFGACGTVC SAVVNGSGERVAIKR
LinPK4      MAQLVPLVLELPSGKKIYSVRGQQFEVDROQYDLVKVVGFGACGTVC SAVANGSGERVAIKR
LbrPK4      MTQLVPLAELPSGKKIYSVRGQGFQFEVDREYDLVKIIGFGAYGTVC SAVANRSGERVAIKR
*.:*****.***** *****.:*****.:***** *****.* *****
```

```
LmaPK4      LSRVFGDLREGKRILREMEIMTSLKHNNLIRLHHFMRPQSKETFEDIYLVMDLYDSDLNR
LmxPK4      LSRVFGDLREGKRILREMEIMTSLKHNNLIRLHHFMRPQSKETFEDIYLVMDLYDSDLNR
LinPK4      LSRVFGDLREGKRILREMEIMTSLKHNNLIRLHHFMRPQSKETFEDIYLVMDLYDSDLNR
LbrPK4      LSRVFGDLREGKRILREMEIMTSLKHSNLRLLHHFMRPQSKETFEDIYLVMDLYDSDLNR
*****.*****.:*****.:*****.:*****
```

```
LmaPK4      IIRSRQKLTDEHLQYFMIQAFRGLHYLHSAKVMHRDLKPSNLLVNADCALAICDFGLARD
LmxPK4      IIRSRQKLTDEHLQYFMIQAFRGLHYLHSAKVMHRDLKPSNLLVNADCALAICDFGLARD
LinPK4      IIRSRQKLTDEHLQYFMIQAFRGLHYLHSAKVMHRDLKPSNLLVNADCALAICDFGLARD
LbrPK4      IIRSRQKLTDEHLQYFMIQAFRGLHYLHSAKVMHRDLKPSNLLVNADCALAICDFGLARD
*****
```

```
LmaPK4      DQVMSSSDLTQYVVTRWYRPPPEVLGMGSNQYTSADVWSLGLIFAEMLVGRALLPGTDYI
LmxPK4      DQVMSSSDLTQYVVTRWYRPPPEVLGMGSNQYTSADVWSLGLIFAEMLVGRALLPGTDYI
LinPK4      DQVMSSSDLTQYVVTRWYRPPPEVLGMGSNQYTSADVWSLGLIFAEMLVGRALLPGTDYI
LbrPK4      DQVMSSSDLTQYVVTRWYRPPPEVLGMGFNQYTSADVWSLGLIFAEMLVGRALLPGTDYI
***** *****.:*****
```

```
LmaPK4      GQLVMIVNLLGSPSIDDMEFLSSEAKAFILSQPHRPALSFRDLFPMATEEATDLLSKLLV
LmxPK4      GQLVMIVNLLGSPSIDDMEFLSSEAKAFILSQPHRPALSFRDLFPMATEEATDLLSKLLV
LinPK4      GQLVMIVNLLGSPSIDDMEFLSSEAKAFILSQPRRALSFRDLFPMATEEATDLLSKLLV
LbrPK4      EQLVMIVNLLGSPSIDDMEFLSSEARAFILSQPHRPALPFRDLFPMATEEATDLLSKLLV
*****.:*****.:*****.*****
```

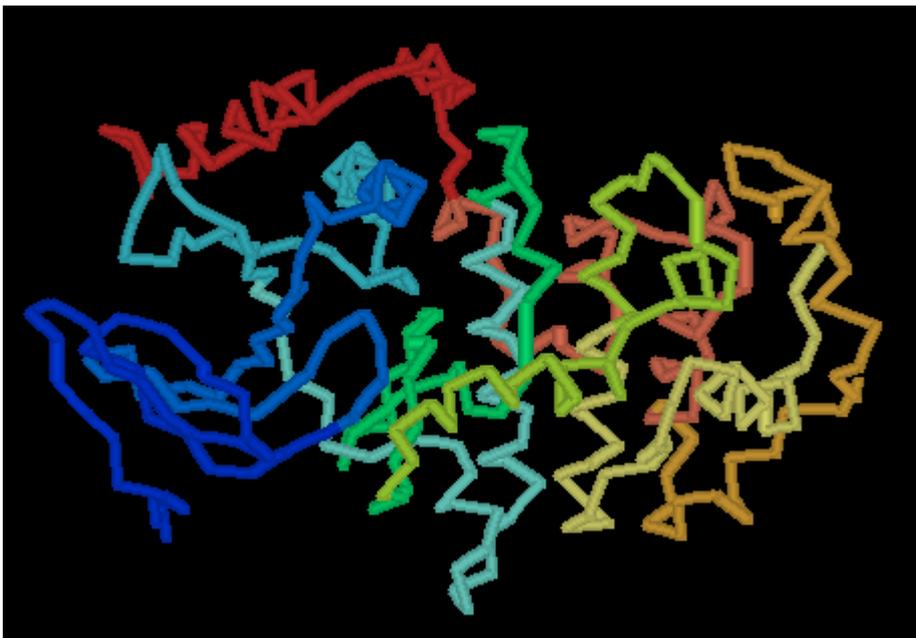
```
LmaPK4      FHPARRLTAKQVMEHPYFSKYRDAAEEADAPDPFVWNHSHIETKEQLREDLWRVVEAHSQ
LmxPK4      FHPARRLTAKQVMEHPYFSKYRDAAEEADAPDPFVWNHSHIETKEQLREDLWRVVEAHSQ
LinPK4      FHPARRLTAKQVMEHPYFSKYRDAAEEADAPDPFVWNHSHIETKEQLREDLWRVVEAHSQ
LbrPK4      FHPARRLTAKQVMEHPYFSKYRDPAAEEADAPNPFVWNHSHIETKAQLREDLWRVVEAYSH
```

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*.\*:  
 (continúa)

LmaPK4            LNE  
 LmxPK4           LNE  
 LinPK4           SNG  
 LbrPK4           SNE  
 \*

**Figura 25.** Alineamiento de secuencias aminoacídicas usando el programa *ClustalW* de ortólogos de PK4 en *Leishmania major* (LmaPK4), *L. mexicana* (LmxPK4), *L. infantum* (LinPK4) y *L. braziliensis* (LbrPK4). Asteriscos (\*) indican residuos conservados; puntos simples (.) indican posiciones revelando sustituciones poco conservativas; puntos dobles (: ) indican sustituciones conservativas.

La Figura 26 muestra un modelado estructural de PK4 por homología a un parólogo de la proteína perteneciente a *Leishmania donovani*, PK3, con la cual presenta un 40% de identidad de secuencia (el modelo molde fue elegido como la proteína de mayor nivel de identidad con PK4). A partir de dicho modelo, es posible visualizar el sitio catalítico putativo, así como bucles importantes para la regulación de esta MAP quinasa. Una vez que se cuente con una estructura experimental de la proteína PK4, obtenida por cristalografía de rayos X, podremos confirmar estas predicciones y estudiar en detalle sitios candidatos para interactuar con compuestos inhibidores (competitivos y no competitivos), de manera de asistir en su diseño racional, o bien en la optimización de compuestos existentes. Las regiones candidatas a estudio pueden ser el sitio de unión a ATP, así como también otros “bolsillos” proteicos, en particular aquellos implicados en regulación de la actividad catalítica (como lo son el bucle de activación, o bien otros sitios alostéricos de regulación), y/o el sitio de unión al sustrato proteico. Estos sitios regulatorios o específicos de sustrato, están usualmente menos conservados, pero ofrecen interesantes oportunidades para el diseño de compuestos con mayor especificidad, y/o disminuyendo las tasas de aparición de resistencia (Noble *et al.*, 2004).



**Figura 26.** Modelado estructural de PK4 por homología a PK3 de *Leishmania donovani* (40% de identidad de secuencia aminoacídica). Azul: extremo N-terminal; rojo: extremo C-terminal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science 4° ed., New York: 1392 pp.

Barrett MP, Croft SL (2012): Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br Med Bull* 104: 175-196.

Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M (2005): LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology* 55 (5): 1606-1615.

Bhattacharya P, Gupta G, Majumder S, Adhikari A, Banerjee S, Halder K, Bhattacharya Majumdar S, Ghosh M, Chaudhuri S, Roy S, Majumdar S (2011): Arabinosylated Lipoarabinomannan Skews Th2 Phenotype towards Th1 during *Leishmania* Infection by Chromatin Modification: Involvement of MAPK Signaling. *Plos ONE* 6 (9): e24141. doi:10.1371/journal.pone.0024141.

Brumlik MJ, Pandeswara S, Ludwig SM, Murthy K, Curiel TJ (2011): Parasite Mitogen-Activated Protein Kinases as Drug Discovery Targets to Treat Human Protozoan Pathogens. *Journal of Signal Transduction*: doi:10.1155/2011/971968.

Chaudhuri TK, Verma VK, Maheshwari A (2009): GroEL assisted folding of large polypeptide substrates in *Escherichia coli*: Present scenario and assignments for the future. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 99: 42-50.

Chen J, Song JL, Zhang S, Wang Y, Cui DF, Wang CC (1999): Chaperone activity of DsbC. *J Biol Chem* 274: 14393-14399.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006): Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (1): 111-126.

Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J (2002): *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359: 1124-1125.

Dell KR, Engel JN (1994): Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64: 283-292.

Dostálová A, Volf P (2012): *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* 5:276. doi: 10.1186/1756-3305-5-276.

Drenth J (2007): Principles of Protein X-Ray Crystallography. *Springer 3<sup>o</sup> ed.*, New York: 332 pp.

Egli M (2010): Diffraction Techniques in Structural Biology. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 7-13: doi 10.1002/0471142700.nc0713s41.

Forestier CL (2013): Imaging host-*Leishmania* interactions: significance in visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* 35: 256-266.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson A (2002): Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2: 494-501.

Gupta CL, Khan KA, Khan F, Tiwari AK (2013): Homology Modeling of LmxMPK4 of *Leishmania mexicana* and Virtual Screening of Potent Inhibitors against It. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* 5: 136-144.

Huse M, Kuriyan J (2002): The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* 109: 275-282.

Jain K, Jain NK (2013): Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today* 18 (23-24): 1272-1281.

John von Freyend S, Rosenqvist H, Fink A, Melzer IM, Clos J, Jensen ON, Wiese M (2010): LmxMPK4, an essential mitogen-activated protein kinase of *Leishmania mexicana* is phosphorylated and activated by the STE7-like protein kinase LmxMKK5. *International Journal for Parasitology* 40: 969-978.

Kannan N, Neuwald AF (2004): Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2 $\alpha$ . *Protein Science* 13: 2059-2077.

Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Ten Eyck LF (2006): Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *PNAS* 103 (47): 17783-17788.

Kuhn D, Wiese M (2005): LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Molecular Microbiology* 56 (5): 1169-1182.

Lieberman RL, Peek ME, Watkins JD (2013): Determination of Soluble and Membrane Protein Structures by X-Ray Crystallography. *Methods in Molecular Biology* 955: 475-493.

Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A (2006): *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* 8: 1922-1931.

McCarthy AA, Haebel PW, Törrönen A, Rybin V, Baker EN, Metcalf P (2000): Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nature Structural Biology* 7 (3): 196-199.

McGwire BS, Satoskar AR (2014): Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med* 107: 7-14.

Mondal D, Huda MM, Karmoker MK, Ghosh D, Matlashewski G, Nabi SG, Kroeger A (2013): Reducing visceral leishmaniasis by insecticide impregnation of bed-nets, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 19 (7): 1131-1134.

Morales MA, Renaud O, Faigle W, Shorte SL, Späth GF (2007): Over-expression of *Leishmania major* MAP kinases reveals stage-specific induction of phosphotransferase activity. *International Journal for Parasitology* 37: 1187-1199.

Morales MA, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, Späth G (2008): Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* 8: 350-363.

Mukhopadhyay D, Dalton JE, Kaye PM, Chatterjee M (2014): Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends Parasitol* 30 (2): 65-74.

Müller IB, Domenicali-Pfister D, Roditi I, Vassella E (2002): Stage-specific Requirement of a Mitogen-activated Protein Kinase by *Trypanosoma brucei*. *Molecular Biology of the Cell* 13: 3787-3799.

Nagill R, Kaur S (2011): Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. *International Immunopharmacology* 11: 1464-1488.

Naula C, Parsons M, Mottram JC (2005): Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 1754 (1-2): 151-159.

Neuber H (2008): Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges* 6: 754-765.

Noble ME, Endicott JA, Johnson LN (2004): Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science* 303: 1800-1805.

Nozach H, Fruchart-Gaillard C, Fenaille F, Beau F, Pereira Ramos OH, Douzi B, Saez NJ, Moutiez, Servent D, Gondry M, Thai R, Cuniasse P, Vincentelli R, Dive V (2013): High throughput screening identifies disulfide isomerase DsbC as a very efficient partner for recombinant expression of small disulfide-rich proteins in *E. coli*. *Microbial Cell Factories* 12 (37): doi 10.1186/1475-2859-12-37.

Otranto D, Dantas-Torres F (2013): The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol* 29 (7): 339-345.

Pagliano P, Carannante N, Rossi M, Gramiccia M, Gradoni L, Saverio Faella F, Battista Gaeta G (2005): Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 229-233.

Parsons M, Ruben L (2000): Pathways Involved in Environmental Sensing in Trypanosomatids. *Parasitology Today* 16 (2): 56-62.

Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC (2005): Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6 (127): doi.10/1186/1471-2164-6-127.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D (2008): In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321 (5891): 970-974.

Reiner SL, Locksley RM (1995): The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13: 151-177.

Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G (2009): Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in Parasitology* 25 (11): 505-510.

Rodríguez NE, Gaur Dixit U, Allen L-AH, Wilson ME (2011): Stage-Specific Pathways of *Leishmania infantum* *chagasi* Entry and Phagosome Maturation in Macrophages. *PLoS ONE* 6 (4): e19000.  
doi:10.1371/journal.pone.0019000.

Rogers ME, Bates PA (2007): *Leishmania* manipulation of Sand Fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission. *PLoS Pathog* 3 (6): e91. doi:10.1371/journal.ppat.0030091.

Salomón OD, Basmajdian Y, Fernández MS, Santini MS (2011): *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 (3): 381-382.

Santos CA, Toledo MA, Triviella DB, Beloti LL, Schneider DR, Saraiva AM, Crucello A, Azzoni AR, Souza AA, Aparicio R, Souza AP (2012): Functional and structural studies of the disulfide isomerase DsbC from the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals a redox-dependent oligomeric modulation *in vitro*. *FEBS Journal* 279: 3828-3843.

Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C (2013): Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *International Journal of Infectious Diseases* 17: e572-e576.

Saravanan P, Santhosh KV, Mohan CG, Patra S, Kumar Dubey V (2010): Mitogen-activated protein kinase 4 of *Leishmania* parasite as a therapeutic agent. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 5662-5670.

Sahdev S, Khattar SK, Singh Saini K (2008): Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307: 249-264.

Shevchik V, Condemine G, Robert-Baudouy J (1994): Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *The EMBO Journal* 13 (8): 2007-2012.

Singh N, Kumar M, Singh RK (2012): Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* 5 (6): 485-497.

Stockdale L, Newton R (2013): A review of preventative method against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis* 7 (6): e2278. doi: 10.1371/journal.pntd.0002278.

Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010): Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology* 172: 34-44.

Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, Muñoz DL, Robledo SM, Muskus CE, López-Abán J, Muro A, Vélez ID, Mollinedo F (2012): In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania spp.* and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (4): e1612. doi: 10.1371/journal.pntd.0001612.

van den Ent F, Löwe J (2006): RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J Biochem Biophys Methods* 67: 67-74.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T (2004): Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *J Immunol* 173: 6521-6525.

Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ, Descoteaux A (2009): The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog* 5 (10): e1000628 doi: 10.1371/journal.ppat.1000628

Wang Q, Melzer IM, Kruse M, Sander-Juelch C, Wiese M (2005): LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Kinetoplastid Biology and Disease* 4 (6): doi:10.1186/1475-9292-4-6.

Waskiewicz AJ, Cooper JA (1995): Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphate regulation in mammals and yeast. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 798-805.

Wiese M (1998): A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *The EMBO Journal* 17 (9): 2619-2628.

Wiese, M (2007): *Leishmania* MAP kinases – Familiar proteins in an unusual context. *International Journal for Parasitology* 37: 1053-1062.

Xu Y, Lewis D, Perry Chou C (2008): Effect of folding factors in rescuing unstable heterologous lipase B to enhance its overexpression in the periplasm of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 1035-1044.

Yue BG, Ajuh P, Akusjärvi G, Lamond AI, Kreivi JP (2000): Functional coexpression of serine protein kinase SRPK1 and its substrate ASF/SF2 in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 28 (5): e14.

Zerbs S, Giuliani S, Collart F (2014): Small-Scale Expression of Proteins in *E. coli*. *Methods in Enzymology* 536: 117-131.

Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1994): Atomic structure of the MAP kinase ERK 2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367: 704-711.

## ANEXO

### Cepas

BL21 (DE3) pLysS: *F ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)* λDE3 pLysS(Cm<sup>R</sup>)

HMS174 (DE3): *F<sup>-</sup> recA1 hsdR(r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>)* λDE3 Rif<sup>R</sup>

TOP10F': *F(lacI<sup>Q</sup>Tn10 Tet<sup>R</sup>) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*

RosettaBlue (DE3) pLysS: *endA1 hsdR17(r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* λDE3 *F'(proA+B+lacI<sup>Q</sup>ZΔM15::Tn10)* pLysSRARE(Cm<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)

C41 (DE3): *F ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)* λDE3

Rosetta: *ompT lon lacY dcm* Cm<sup>R</sup>

### Abreviaturas

F<sup>-</sup>: contiene plásmido F.

F(): contiene plásmido F con genes cromosomales del hospedero producto de eventos de recombinación previos, indicados entre paréntesis.

r<sub>B/K</sub><sup>+/-</sup>: B/K define la cepa. +/- indica si la cepa tiene o no el sistema de restricción.

m<sub>B/K</sub><sup>+/-</sup>: B/K define la cepa. +/- indica si la cepa tiene o no el sistema de modificación (metilación).

hsdS(): restricción y metilación de ciertas secuencias (entre paréntesis) son eliminadas de la cepa. Si se transforma ADN de estas secuencias de la cepa en otra cepa salvaje, serán degradadas.

hsdR(): para transformación eficiente de ADN clonado sin metilar mediante PCR.

araD: mutación en L-ribulosa-fosfato 4-epimerasa que bloquea el metabolismo de arabinosa.

Δ(): deleción cromosomal de los genes mostrados entre paréntesis.

dcm: abolición de metilación de citosina en el segundo C de sitios CCWGG.

endA1: para preparaciones de ADN más limpias y mejores resultados en aplicaciones río abajo debido a la eliminación de la digestión no específica de la endonucleasa I.

gal: mutantes no metabolizan la galactosa.

gyrA96: mutación en ADN girasa, confiere resistencia a ácido nalidíxico.

lacI<sup>Q</sup>: sobreproducción del represor lac, contiene una deleción de 15 pb para crear sitio -35 óptimo en el promotor río arriba de *lacI*.

lacY: deficiente en transporte de lactosa, deleción de la permeasa de lactosa (proteína M).

lacZΔM15: deleción parcial del gen lacZ que permite complementación en alfa del gen b-galactosidasa, requerido para seleccón azul/blanco en placas Xgal. Deleción en porción N-terminal de lacZ (aa 11-41).

lon: deleción de la proteasa lon.

mcrA: mutación que elimina restricción de ADN metilado en secuencia C<sup>m</sup>CGG.

mcrB: mutación que elimina restricción de ADN metilado en secuencia R<sup>m</sup>C.

mrr: mutación que elimina restricción de ADN metilado en secuencia C<sup>m</sup>AG o G<sup>m</sup>AC.

nupG: gen regulador que permite expresión constitutiva de genes de síntesis de desoxiribosa, permite entrada de plásmidos grandes.

ompT: mutación en la proteasa VII de la membrana externa, reduciendo proteólisis de proteínas expresadas.

proAB: requiere prolina

recA1: reduce recombinaciones no deseadas en ADN clonado, deficiencia en reparación de ADN.

rpsL: mutación en la proteína ribosomal S12 que confiere resistencia a streptomicina.

Amp<sup>R</sup>: resistente a ampicilina.

Kan<sup>R</sup>: resistente a kanamicina.

DE3: el hospedero es un lisógeno de λDE3, por tanto porta una copia cromosomal de la ARN polimerasa T7 bajo el control de un promotor *lacUV5*. Estas cepas son adecuadas para la producción de proteínas codificadas en genes clonados en vectores pET, por inducción mediante IPTG.

pLysS: contiene plásmido pLysS, que porta resistencia a cloramfenicol y liozima del fago T7, efectivo al atenuar actividad de la ARN polimerasa T7, para mejor inhibición de la expresión en condiciones de no inducción.

Φ80: contiene el profago lambdaoide con una deleción lacZΔM15.

Rif<sup>R</sup>: resistente a rifampicina.

Tet<sup>R</sup>: resistente a tetraciclina.

Cm<sup>R</sup>: resistente a cloramfenicol.

Tn10: transposón que confiere resistencia a tetraciclina.

IPTG: isopropil tio-b-D-galactopiranósido.

pb: pares de bases.

### **Medios de cultivo de *E. coli***

Medio Luria-Bertani (LB): triptona (digestión pancreática de caseína) 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5 g/L. Se esteriliza por autoclavado. Para la preparación de medios sólidos se agrega agar 1,5 %.

Medio Terrific Broth (TB): triptona 12 g/L; extracto de levadura 24 g/L; glicerol 4 mL. Se esteriliza por autoclavado.

### **Protocolo de preparación de ADN plasmídico en pequeña escala (“miniprep”)**

Se inoculan 3 mL de un precultivo crecido por 14 hs a 37 °C con agitación constante.

Se bajan las células por centrifugación por 1 min a 13000 rpm.

Se resuspenden en 300 µL de solución 1 (25 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA).

Se agregan 3 µL de RNAsa y se incuba a temperatura ambiente durante 5 mins.

Se agregan 300 µL de solución 2 (0,2 N NaOH; SDS 1 %) y se invierte 5 veces.

Se agregan 300 µL de solución 3 (30 mL KOAc 5 M; 5,75 mL ác. acético; c.s.p. 50 mL de H<sub>2</sub>O mili Q)

Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 mins.

Se recupera el sobrenadante y se agregan 0,8 volúmenes de isopropanol.

Se centrifuga a 16000 g a 4 °C durante 30 mins. Se descarta sobrenadante y se lava el pellet con etanol 70%, dejando secar en estufa a 37 °C por 10 mins.

El pellet seco se resuspende en 50 µL de H<sub>2</sub>O mili Q.

### **Soluciones para geles de agarosa**

Buffer TAE 1x, a partir del stock 50x con 242 g Tris.Base; 51,5 mL ác. acético; 100 mL EDTA 0,5 M pH 8; 1% de agarosa. En todos los casos se utilizaron 20 µL de bromuro de etidio.

### **Soluciones para geles de poliacrilamida**

Gel separador: 1,9 mL de H<sub>2</sub>O; 1,7 mL acrilamida 30%; 1,3 mL Tris.HCl 1,5 M pH 8,8; 50 µL SDS 10%; 50 µL PSA 10%; 2 µL TEMED. Volumen total = 5 mL.

Gel concentrador: 2,1 mL H<sub>2</sub>O; 0,5 mL acrilamida 30%; 0,38 mL Tris 1 M pH 6,8; 30 µL SDS 10%; 30 µL PSA 10%; 3 µL TEMED. Volumen total = 3 mL.

### **Soluciones para Western blot**

Buffer de transferencia para membranas de nitrocelulosa 10X: 480 mM Tris-Base; 390 mM Glicina; SDS 0,375%; etanol 20% (v/v).

### **Marco abierto de lectura de PK4 recombinante**

ATG GCA GGA TCG **CAT CAC CAT CAC CAT CAC** GGA TCA GGA TCG **GAA AAC CTG TAT TTT CAG** GGA TCC ATG  
GCT CAA CTC GTC CCT TTA GCT GAA CTG CCC AGC GGC AAA AAA ATA TAT AGT GTC CGG GGG CAG CGT TTC  
GAA GTG GAC AGG GAA TAT GAT CTG GTC AAG GTT GTT GGA TTT GGT GCG TGT GGC ACT GTT TGT TCG GCG  
GTC GCG AAC GGG TCG GGT GAG CGA GTG GCG ATC AAG CGG TTG TCG CGT GTT TTT GGT GAT CTT CGT GAA  
GGG AAA CGA ATT TTG CGG GAG ATG GAG ATA ATG ACG TCG CTG AAG CAC AAT AAT CTG ATT CGC CTC CAC  
CAC TTC ATG CGG CCG CAG TCA AAG GAG ACG TTT GAG GAC ATT TAC TTG GTG ATG GAT CTT TAT GAC ACA

GAT TTA AAT CGT ATT ATA CGA AGT CGG CAG AAA CTC ACT GAT GAG CAT CTG CAG TAT TTT ATG ATT CAA  
GCG TTC CGC GGA TTG CAT TAC CTT CAC TCT GCC AAG GTG ATG CAT CGC GAT CTG AAG CCG AGC AAC TTG

(continúa)

CTT GTA AAT GCG GAC TGC GCG CTA GCA ATC TGC GAT TTT GGG CTG GCT CGT GAT GAT CAA GTC ATG AGC  
TCG TCA GAT CTC ACA CAG TAC GTC GTA ACA CGG TGG TAC AGA CCC CCT GAG GTA CTC GGG ATG GGA TCC  
AAT CAG TAC ACG AGC GCG GTA GAT GTC TGG AGC CTT GGT CTG ATC TTT GCG GAG CTA ATG GTG GGG CGT  
GCC TTG CTT CCG GGA ACA GAT TAT ATT GGA CAG CTA GTG ATG ATT GTC AAC CTA TTA GGG TCC CCG TCC  
ATA GAT GAC ATG GAG TTT CTG AGC TCA GAA GCA AAG GCG TTT ATT CTC TCT CAG CCG CAT CGG CCG GCT  
CTC TCC TTC AGA GAT CTT TTT TCA ATG GCT ACA GAA GAG GCC ACT GAC CTT CTG TCG AAG CTG CTA GTT  
TTC CAT CCA GCG AGA CGA TTA ACT GCG AAG CAA GTG ATG GAA CAT CCA TAT TTT TCG AAG TAC AGA GAT  
GCC GCA GAA GAA GCT GAC GCT CCT GAT CCG TTT GTG TGG AAT CAT AGC CAT ATA GAA ACC AAG GAG CAA  
CTC CGT GAG GAT TTG TGG CGG GTT GTT GAA GCC CAT TCA CAA TTG AAC GAA TAG

**Figura S1.** Marco abierto de lectura de PK4 recombinante clonado en pQE80 y pET28a. Se muestra en amarillo la secuencia codificante de la etiqueta de histidinas, y en verde la secuencia codificante del sitio de corte con TEV.