

Producción de tubulinas recombinantes
del parásito *Haemonchus contortus* en
Escherichia coli.



Joaquín Oleaga

Imagen de tapa: Rebaño de ovejas, principales víctimas de la infección con *H. contortus*.

Crédito fotográfico: Mula Eshet / robertharding. Getty Images. Credit #: rh387-476



Tesina de Licenciatura en Bioquímica.

Producción de tubulinas recombinantes del parásito
Haemonchus contortus en *Escherichia coli*.

Joaquín Oleaga.

Tutora: Dra. Mónica Marín.

Evaluadora Externa: Dra. Lucía Turell.

Sección Bioquímica y Biología Molecular,

Facultad de Ciencias,

Universidad de la República,

Uruguay.

Setiembre 2017.

Agradecimientos.

El camino que culmina con este trabajo ha sido largo y de a ratos difícil. Son muchas las personas que aportaron para que todo funcionara y los momentos complicados se superaran. La familia, Beta, los amigos, por siempre estar, demostrando su interés, preocupación y apoyo a pesar de no siempre entender que era lo que hacía ni cuáles eran los problemas. Los compañeros del laboratorio y de la sección, que sin dudas aportaron a que mi tiempo allí fuera más ameno y disfrutable, y siempre estuvieron para asistirme. Mónica por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en el laboratorio y por su invaluable guía durante su todo este tiempo.

A todos ellos va mi agradecimiento.

Índice.

1. Resumen.	1
2. Introducción.	3
2.1. Parásitos gastrointestinales. <i>Haemonchus contortus</i> .	4
2.2. Drogas antihelmínticas y problemas de resistencia.	6
2.3. Tubulinas como blanco de drogas antihelmínticas.	7
2.4. Antecedentes de la expresión de tubulinas recombinantes.	9
3. Objetivos.	11
3.1. Objetivos generales.	12
3.2. Objetivos específicos.	12
4. Materiales.	13
4.1. Plásmidos.	14
4.1.1. pET3a.	14
4.2. Cepas de <i>E. coli</i> .	15
4.2.1. DH5 α (Thermo-Fisher).	15
4.2.2. BL21 Star (DE3) (Thermo-Fisher).	15
4.3. Medios de Cultivo.	15
4.3.1. Medio Luria Broth (LB).	15
4.3.2. Medio Terrific Broth (TB).	15
4.3.3. Medio Autoinductor ZYM-5052.	15
4.4. Anticuerpos.	16
4.5. Resinas y columnas para IMAC.	16
5. Métodos.	17
5.1. Generación de células quimiocompetentes.	18
5.2. Trasformación de células quimiocompetentes.	18
5.3. Amplificación y purificación de plásmidos mediante lisis alcalina	18
5.3.1. Electroforesis en gel de agarosa.	18

5.4. Expresión y purificación de proteínas.	19
5.4.1. Expresión de proteínas.	19
5.4.2. Fraccionamiento de proteínas Solubles/Insoluble.	19
5.4.3. Electroforesis en gel de acrilamida.	20
5.4.4. Purificación por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC).	20
5.4.4.1. Ni-NTA Spin Column (Qiagen).	20
5.4.4.2. Ni-NTA Agarose (Thermo-Fisher).	20
5.5. Western Blot.	21
6. Resultados y Discusión.	22
6.1. Amplificación y purificación de plásmidos mediante lisis alcalina.	23
6.2. Expresión de alfa tubulina en LB a 37 °C.	25
6.3. Expresión de alfa y beta tubulina en TB a 37 °C.	26
6.3.1. Identificación por Western Blot de alfa y beta tubulina.	27
6.4. Expresión de alfa y beta tubulina en ZYM 5052 a 37 °C.	28
6.4.1. Identificación por Western Blot de alfa tubulina.	29
6.4.2. Identificación por Western Blot de beta tubulina.	30
6.5. Expresión de alfa y beta tubulina en ZYM 5052 a 25 °C, con o sin crecimiento previo a 37 °C.	31
6.5.1. Identificación por Western Blot de alfa tubulina.	32
6.5.2. Identificación por Western Blot de beta tubulina.	33
6.6. Expresión de alfa y beta tubulina en ZYM 5052 a 18 °C, por 24, 30 o 48 horas.	34
6.6.1. Identificación por Western Blot de alfa y beta tubulina.	35
6.7. Western Blot de la solubilización de alfa tubulina con 2, 4 y 8 M urea.	37
6.8. Western Blot de la solubilización de alfa y beta tubulina con 8 M urea.	38
6.9. Purificación de alfa tubulina con Ni-NTA Spin Column.	40
6.10. Purificación de alfa tubulina con Ni-NTA Agarose.	41
6.10.1. Identificación por Western Blot de muestras de la purificación de alfa tubulina.	42
6.11. Análisis por espectrometría de masas de las proteínas expresadas.	43

7. Conclusiones.	44
8. Bibliografía.	48
9. Anexo.	53
9.1. Marcadores de peso molecular.	54
9.1.1. ADN.	54
9.1.2. Proteínas.	55
9.2. Secuencias aminoacídicas correspondientes a las proteínas que fueron expresadas.	56
9.3. Informes de Rare Codon Analysis Tool (GenScript) para las construcciones utilizadas.	58
9.4. Alineamiento entre la secuencia nucleotídica salvaje (WT) y la optimizada de las proteínas expresadas.	60
9.5. Análisis por espectrometría de masas de la alfa tubulina.	64
9.5.1. Espectro de masas.	64
9.5.2. Péptidos identificados en el análisis.	65
9.6. Análisis por espectrometría de masas de la beta tubulina.	66
9.6.1. Espectro de masas.	66
9.6.2. Péptidos identificados en el análisis.	67

1. Resumen.

La infección con parásitos gastrointestinales es el principal problema de salud para los animales de pastoreo y es mundialmente una de las mayores amenazas para la viabilidad económica de la cría de ganado. Dentro de las especies más relevantes en este sentido se encuentra *Haemonchus contortus*, uno de los parásitos de mayor impacto en la cría de pequeños rumiantes, principalmente en zonas tropicales y templadas de nuestro planeta.

Desde hace varios años se ha observado un gran incremento de la resistencia de parásitos del ganado al tratamiento con drogas antihelmínticas. Hoy en día la situación se ha agravado tanto que se ha llegado a constatar resistencia frente a todas las drogas existentes y en todas las especies de ganado conocidas en diversos establecimientos en todo el mundo. A pesar de que en años recientes se han desarrollado nuevas drogas, por distintos factores desde 1980 hasta 2008 no se introdujo al mercado ningún tipo de droga antihelmíntica nueva. Por estas razones es necesaria la generación de nuevas drogas antihelmínticas que permitan superar los obstáculos que la resistencia a las drogas disponibles plantea hoy en día.

Los benzimidazoles constituyen una amplia familia de compuestos con funciones muy variadas incluyendo antiparásitarios. Su mecanismo de acción involucra a las tubulinas, proteínas globulares presentes en todos los organismos eucariotas, que polimerizan formando largos cilindros huecos llamados microtúbulos, cuyas funciones son vitales para la célula. La unión de la droga a las tubulinas inhibe la formación de estas estructuras, generando en consecuencia una ruptura en el transporte de gránulos de secreción o de enzimas citoplasmáticas y eventualmente produciendo la lisis celular.

En este contexto nos planteamos producir y purificar alfa y beta tubulina de *H. contortus* de forma recombinante en *E. coli*, para ser utilizadas en ensayos de polimerización, como forma de screening para evaluar la efectividad de nuevas drogas antihelmínticas de la familia de los benzimidazoles. En este trabajo se logró expresar las dos proteínas de manera insoluble. Con agentes caotrópicos en alta concentración, se obtuvo de manera soluble la alfa tubulina, aunque no así de la beta tubulina. A pesar de que no se lograron todos los objetivos, se obtuvo valiosa información en relación a la expresión de estas proteínas, que servirá como punto de partida para nuevos ensayos de expresión.

2. Introducción.

2.1. Parásitos gastrointestinales. *Haemonchus contortus*.

La infección con parásitos gastrointestinales es el principal problema de salud para los animales de pastoreo ¹ y es mundialmente una de las mayores amenazas para la viabilidad económica de la cría de ganado ²⁻⁴. Estos afectan la salud y el bienestar de sus huéspedes ya que traen como consecuencias anemia, anorexia, capacidad de digestión y de absorción de nutrientes disminuida y deshidratación, que conllevan pérdida de peso y disminución del crecimiento del animal, que implican pérdidas en la producción ^{1,5}. Para ilustrar su importancia, la infección por nemátodos parásitos ha sido considerada la enfermedad infecciosa más importante en ovejas en tres de los países con mayor producción de estos animales, como los son Australia, Sudáfrica y Uruguay ³, y su incidencia también se ha descrito en países donde este rubro es importante como lo son Argentina ⁶, China ⁷ y Nueva Zelanda ⁸, estimándose pérdidas millonarias para la industria a nivel mundial ^{3,9,10}.

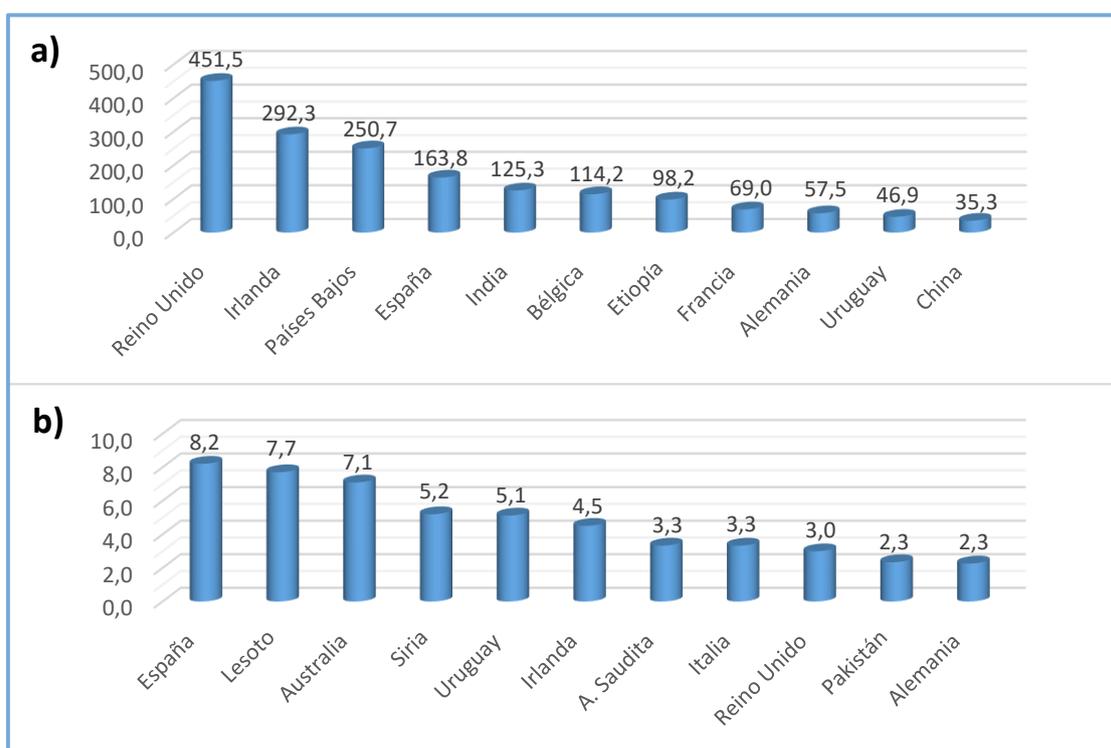


Gráfico 1: a) Principales exportadores a nivel mundial de carne ovina en 2016, no están incluidos Australia (1990 millones) ni Nueva Zelanda (1851 millones). b) Principales exportadores a nivel mundial de lana sucia en 2016. Todos los valores están expresados en millones de dólares. Datos tomados de trademap.org

Dentro de las especies más relevantes en este sentido se encuentra *Haemonchus contortus*, uno de los parásitos de mayor impacto en la cría de pequeños rumiantes, principalmente en zonas tropicales y templadas de nuestro planeta ¹¹⁻¹³. Su hospedero más común son las ovejas, pero puede infectar también cabras, terneros e incluso conejos ¹³. Su importancia se debe a que se trata de un nemátodo hematófago, que en su etapa adulta habita en el abomaso (el cuarto estómago) de estos animales y puede consumir hasta 30 μ L de sangre por día. Dado que en un animal infectado pueden existir miles de gusanos adultos, estos pueden provocar anemia y la subsecuente muerte en animales susceptibles ¹⁴. Los síntomas más claros de la infección por este nemátodo son la pérdida de peso, el edema submandibular, y palidez de las mucosas (Figura 1), principalmente debido a la anemia ¹⁵.



Figura 1: a) Oveja con edema submandibular. b) Demostración del sistema FAMCHA, utilizado para el diagnóstico rápido de anemia en ovinos y otros animales, basado en el color de las mucosas oculares. Imágenes tomadas de: a)<http://linessafarms.com/index.php/2017/04/14/bottle-jaw/> b)<https://agresearchmag.ars.usda.gov/2010/jul/lambs/>

El gran número de individuos que frecuentemente se encuentran en los animales infectados se deben a que este nemátodo posee el ciclo patente y el ciclo de vida más corto de todos los nemátodos gastrointestinales conocidos (Figura 2). Esto significa que el periodo entre la infección del parásito y la producción de huevos por parte de la hembra, y del desarrollo del animal son muy breves. Otro factor que aporta a este hecho es que la hembra de este parásito puede llegar a poner entre 5000 a 15000 huevos por día. Esta gran capacidad de reproducción genera que en un animal infectado promedio exista una variedad genética en la población de parásitos que les permite rápidas adaptaciones a cambios climáticos, cambios internos del hospedero y a tratamientos con antihelmínticos ¹³.

2.2. Drogas antihelmínticas y problemas de resistencia.

Desde hace varios años se ha observado un gran incremento de la resistencia de parásitos del ganado al tratamiento con drogas antihelmínticas ^{16,17}. Se llama así a los fármacos utilizados en el tratamiento de las infecciones por helmintos, también conocidas como helmintiasis. Este es un término genérico utilizado para describir animales de cuerpo largo y blando que viven y se alimentan de un organismo hospedero, y muchas veces como sinónimo de gusano ^{18,19}. Este fenómeno de resistencia no es nuevo, de hecho se conoce desde el comienzo del uso de estas drogas en la década de los 60, ya que se observaba el desarrollo de resistencia a cada droga que ingresaba en el mercado en cuestión de pocos años desde su implementación ²⁰.

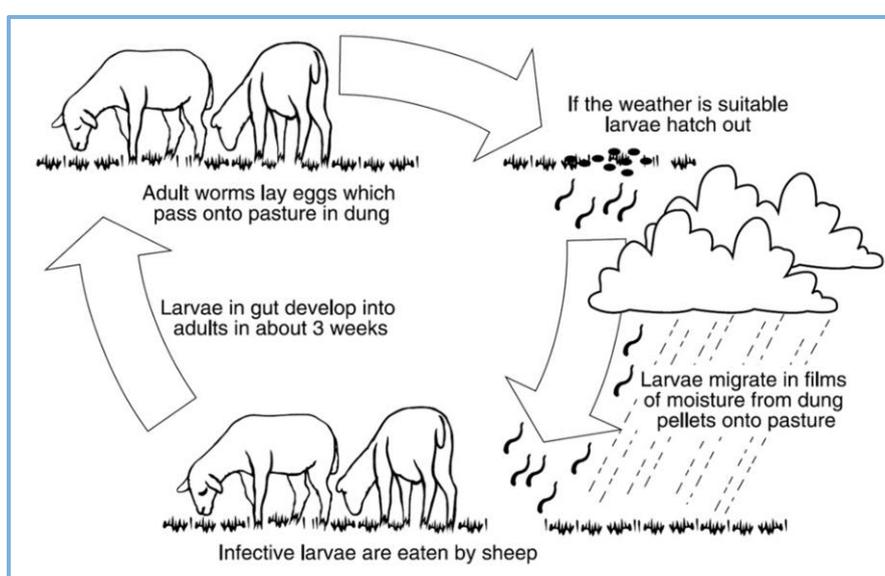


Figura 2: Ciclo de vida del parásito *H. contortus*. La hembra adulta produce huevos que son excretados en las heces del hospedero. Estos eclosionan en la pastura y continúan su desarrollo hasta la tercera etapa larvaria cuando son ingeridas por el hospedero, dentro del cual alcanzan el estadio adulto. Imagen tomada de: www.agric.wa.gov.au/livestock-parasites/barbers-pole-worm-sheep.

El fuerte incremento de resistencia a antihelmínticos puede explicarse mediante principios genéticos. En los tratamientos la presión selectiva ejercida por el uso excesivo de antihelmínticos reduce los nemátodos susceptibles de la población genéticamente diversa presente en el animal, produciéndose un incremento de individuos portadores de genes que confieren resistencia, los cuales pueden ser transmitidos a la progenie ²¹. Estos genes de resistencia se pueden generar

naturalmente de diversas maneras, y a su vez los mecanismos por los cuales estos provocan la resistencia también son variados, incluyendo la alteración de sistemas enzimáticos necesarios para la acción farmacológica de la droga o la disminución del número o afinidad de los receptores, afectando la unión del fármaco al receptor ²². La mayoría de los nemátodos de interés veterinario poseen características genéticas que favorecen el desarrollo de resistencia ^{20,23}, que en conjunto con su gran capacidad de reproducción determinan que la variabilidad genética de estos organismos sea muy elevada ²⁰, favoreciendo la generación de resistencia. En el desarrollo de resistencia gravita el factor humano, ya que debido al bajo costo y la fácil aplicación de estas drogas, sumada a su baja toxicidad y amplio espectro de eficiencia, estas fueron históricamente sobre utilizadas, mal utilizadas o aplicadas incorrectamente, lo que condenó su eficacia a largo plazo ^{3,16}.

Hoy en día la situación se ha agravado tanto que se ha llegado a constatar resistencia frente a todas las drogas existentes y en todas las especies de ganado conocidas en diversos establecimientos en todo el mundo ^{17,20}. Esta problemática tiene importantes consecuencias económicas en la industria de la cría de ganado, que hace peligrar su viabilidad, sobre todo en zonas tropicales y subtropicales, y en la cría de ovejas y cabras ³. Un factor que influyó en el avance de esta problemática fue la falta de innovación en relación a las drogas antihelmínticas. A pesar de que en los últimos años se han desarrollado nuevas drogas, desde 1980 hasta 2008 no se introdujo al mercado ningún tipo de droga antihelmíntica nueva, principalmente debido a la efectividad y poca peligrosidad de las drogas existentes ^{3,17}. Por estas razones es necesaria la generación de nuevas drogas antihelmínticas que permitan superar los obstáculos que la resistencia a las drogas disponibles plantea hoy en día.

2.3. Tubulinas como blanco de drogas antihelmínticas.

Las tubulinas son una familia de proteínas globulares, presentes en todos los organismos eucariotas, que polimerizan formando largos cilindros huecos llamados microtúbulos (Figura 3), partes fundamentales del citoesqueleto de las células. Estas estructuras intervienen en funciones vitales para la célula como el mantenimiento de la estructura celular, la segregación de cromátidas hermanas en la división celular, el transporte activo de vesículas secretoras, organelos, y demás sustancias intracelulares, dándole a estas estructuras una gran importancia sobre el control de muchas funciones esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular ²⁴⁻²⁶. Los componentes principales de los microtúbulos son los heterodímeros de alfa/beta tubulina, que se unen en un arreglo cabeza-cola con otros heterodímeros para formar los llamados protofilamentos, los cuales se unen lateralmente en grupos de 13, para formar los microtúbulos ²⁴. En todos los organismos

eucariotas existen varias isoformas para cada una, aunque generalmente todas consisten en alrededor de 450 aminoácidos y tienen una masa molecular cercana a los 50 kDa ^{24,27}.

Los microtúbulos son estructuras altamente dinámicas, ya que alternan continuamente fases de elongación y acortamiento. Este comportamiento, conocido como inestabilidad dinámica, está controlado por una molécula de GTP que está unida a la beta tubulina en el extremo del microtúbulo. Cuando esta se encuentra como GTP inhibe el desarmado del microtúbulo, pero cuando esta se hidroliza y se genera GDP la estabilidad disminuye y el microtúbulo ingresa en un estado de despolimerización ^{28,29}. Esta característica es vital para el mantenimiento de las funciones en las que participa.

Diversas drogas pueden afectar la polimerización de las tubulinas, ya sea inhibiendo la formación de microtúbulos o estabilizando su estructura, y estas son utilizadas en diversos tratamientos, como en el cáncer o para combatir nemátodos y otros parásitos, ya que provocan la muerte de células específicas ^{4,25}. Los benzimidazoles son una amplia familia de compuestos que producen variados efectos y son utilizados como antimicrobianos, anticoagulantes, anti inflamatorios y antiparásitarios ³⁰.

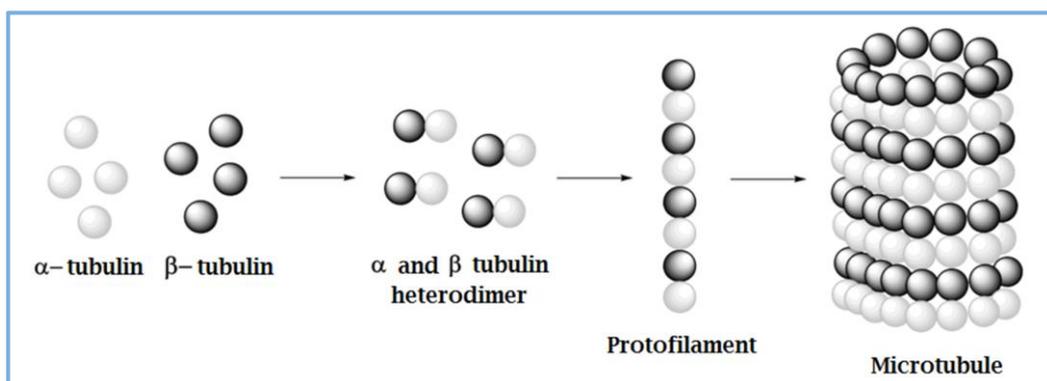
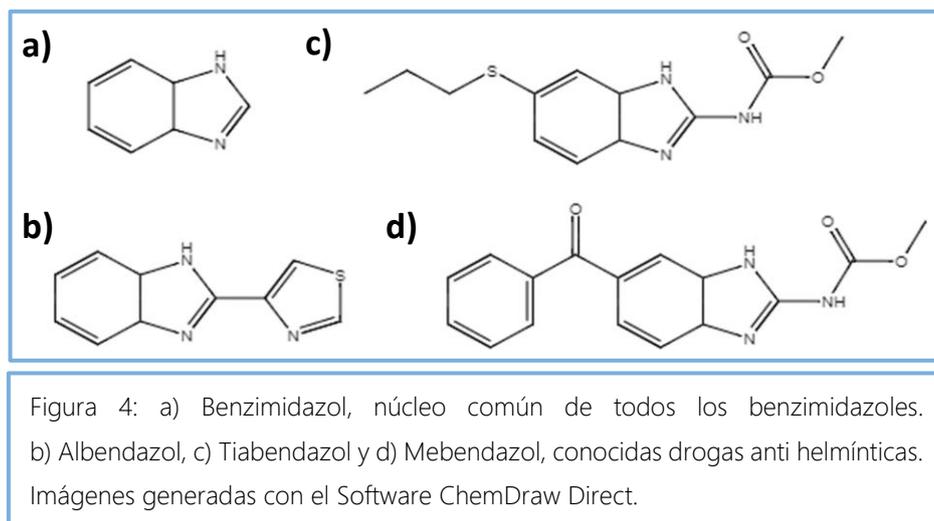


Figura 3: Estructura simplificada y esquemática de los microtúbulos. De izquierda a derecha se esquematizan los monómeros de alfa o beta tubulina, los heterodímeros de alfa y beta tubulina, los protofilamentos formados por uniones entre heterodímeros y finalmente un microtúbulo formado por la asociación entre protofilamentos. Imágenes obtenidas de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Formation_of_Microtubule.png.

En el caso particular de los benzimidazoles utilizados como drogas antihelmínticas, como son el Albendazol, Mebendazol y Tiabendazol (Figura 4), se ha demostrado que la unión de la droga a las tubulinas inhibe la formación de microtúbulos, generando en consecuencia una ruptura en el transporte de gránulos de secreción o de enzimas citoplasmáticas y eventualmente produciendo la lisis celular ^{26,31,32}. También existen otras drogas antihelmínticas cuyo mecanismo de acción no depende de su interacción con los elementos del citoesqueleto ^{31,33}.



2.4. Antecedentes de la expresión de tubulinas recombinantes.

Las tubulinas han sido tradicionalmente obtenidas en gran escala mediante purificación a partir de extractos de tejidos de animales ricos en estas, en particular tejido cerebral de mamíferos como vacas, cerdos u ovejas, donde las tubulinas pueden llegar a representar el 20% de las proteínas totales ^{34,35}. Pero debido a la gran cantidad de proteínas que interaccionan con las tubulinas en la formación de los microtúbulos, en particular las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y las proteínas motoras de los microtúbulos, la obtención de tubulinas puras requiere de varias etapas de purificación que, a pesar de ser efectivas, determinan que el procedimiento consuma mucho tiempo y esfuerzo ^{34,36}.

La obtención de estas proteínas a partir de otras fuentes generalmente es poco eficiente, ya sea debido a su baja concentración en el tejido o en la especie con la que se esté trabajando, o por la poca cantidad de material de partida con que se cuenta. En el caso de parásitos como *H. contortus*, la purificación de estas ha demostrado ser dificultosa y poco redituable, dado que la concentración de estas proteínas en huevos, y sobre todo en larvas y gusanos adultos, es muy baja ^{37,38}. A pesar de que hoy en día se cuenta con nuevos métodos de purificación que pueden facilitar la obtención de

tubulinas puras, en comparación con los métodos tradicionales ³⁹, la solución predilecta de los científicos a este problema ha sido la expresión de tubulinas recombinantes.

La obtención de tubulinas recombinantes de diferentes organismos, y en diferentes sistemas de expresión como *E. coli* ³⁸, *S. cerevisiae* ³⁴ o Baculovirus-Célula de insecto ⁴⁰, se ha llevado a cabo desde hace varios años. La expresión de tubulinas de ratón ⁴¹, humanos ^{40,42}, plantas, como morrón (*Capsicum annuum*) ⁴³ y papa (*Solanum tuberosum* L.) ⁴⁴, y parásitos como *Trypanosoma danilewskyi* ⁴⁵, *Onchocerca volvulus* ⁴⁶ y *Haemonchus contortus* ⁴⁷, son algunos de los ejemplos. En el caso particular de este último ya desde 1993 existen antecedentes de su expresión en *E. coli* ^{38,47-49}, y su uso principalmente es en la evaluación de eficiencia antihelmíntica para determinados fármacos. La expresión se ha ido perfeccionando desde la obtención de las proteínas en cuerpos de inclusión en los primeros trabajos publicados, hasta la obtención soluble y funcional de las mismas proteínas en trabajos más recientes.

3. Objetivos.

3.2. Objetivos generales.

- El objetivo general de este trabajo es producir alfa y beta tubulina de *H. contortus* en *E. coli* para el desarrollo de un ensayo que permita evaluar la capacidad antihelmíntica de ciertas drogas mediante la inhibición in vitro de su polimerización.

3.1. Objetivos específicos.

- Expresar alfa y beta tubulina de *H. contortus* en *E. coli*.
- Evaluar la solubilidad de las proteínas en distintas condiciones de cultivo.
- Optimizar la expresión de ambas proteínas.
- Poner a punto la purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad (IMAC Ni-NTA).

4. Materiales.

4.1. Plásmidos.

4.1.1. pET3a.

Vector utilizado para clonar las secuencias nucleotídicas codificantes de la alfa tubulina y la beta tubulina (Anexo 9.2. y 9.4.), las cuales fueron optimizadas y sintetizadas por GenScript® para la expresión de estas en *E. coli*. En ambos casos la secuencia codificante de la proteína se insertó entre los sitios de restricción BamHI y NdeI del plásmido. La expresión de proteínas en este plásmido se encuentra bajo la regulación del promotor T7, y el marcador de selección que posee es resistencia a Ampicilina.

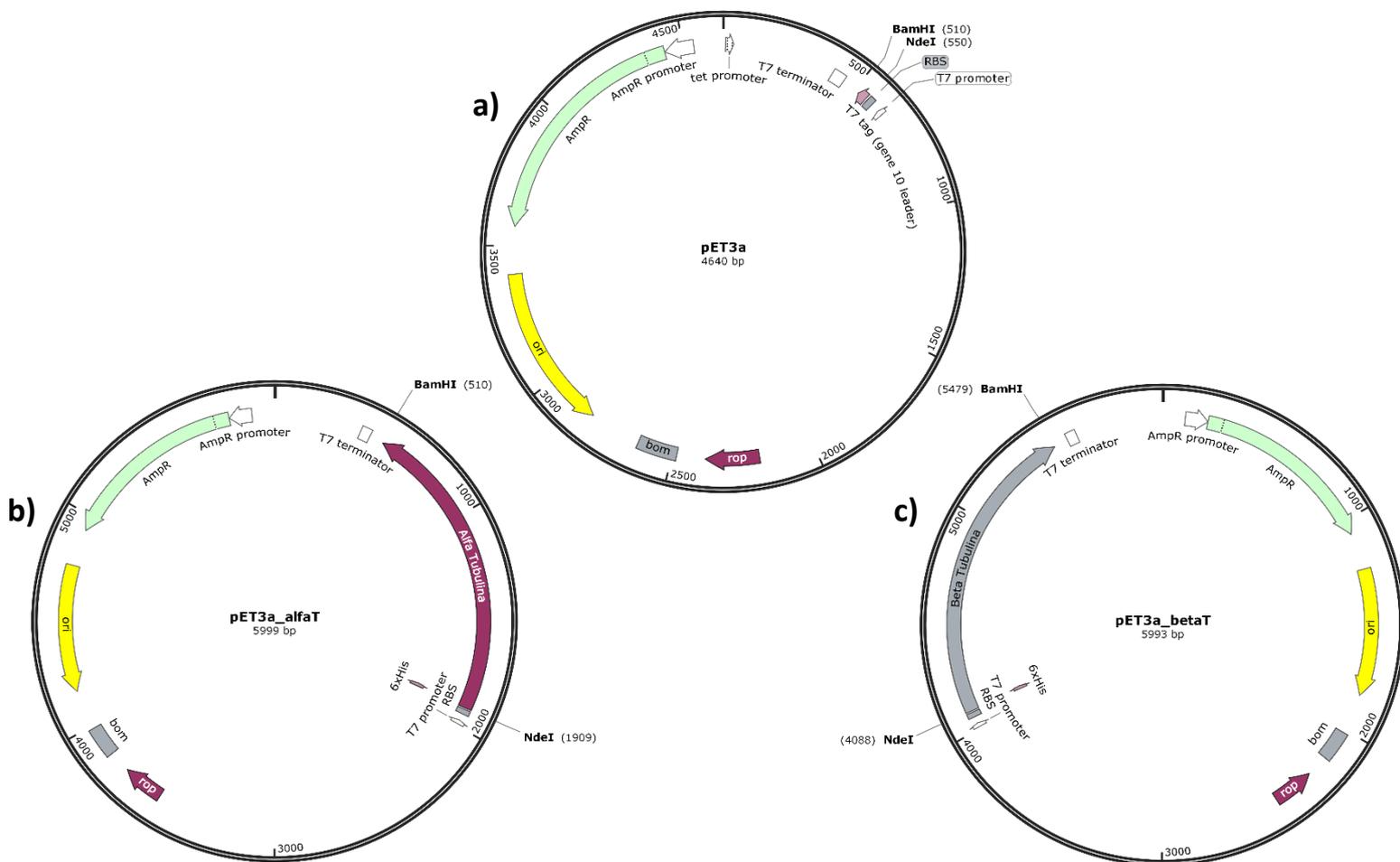


Figura 5: Esquemas de los plásmidos utilizados en el trabajo. a) Vector pET3a empleado como base para las construcciones utilizadas para la expresión de proteínas. b) Construcción utilizada para la expresión de alfa tubulina. c) Construcción utilizada para la expresión de beta tubulina.

4.2. Cepas de *E. coli*.

4.2.1. DH5 α (Thermo-Fisher).

Cepa utilizada para la amplificación de DNA plasmídico de pET3a_Alfat y pET3a_Betat. Esta cepa permite alcanzar una alta eficiencia de transformación gracias a las mutaciones endA1 y reA1, asociadas a una menor degradación por endonucleasas y a una menor recombinación homóloga, respectivamente.

4.2.2. BL21 Star (DE3) (Thermo-Fisher).

Cepa utilizada para la expresión de alfa tubulina y beta tubulina. Esta cepa fue modificada para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor T7. A su vez incluye una mutación en el gen RNAsa E que reduce el nivel de expresión de RNAsas endógenas, incrementando la estabilidad de los mRNAs.

4.3. Medios de cultivo.

4.3.1. Medio Luria Broth (LB) ³⁹. Para preparar 100 mL: Cloruro de Sodio (NaCl), 0,5 g, Triptona, 1,0 g. Extracto de levadura, 0,5 g.

4.3.2. Medio Terrific Broth (TB) ³⁹. Para preparar 100 mL: Triptona, 1,2 g. Extracto de levadura, 2,4 g. Glicerol, 0,4 mL. $\text{KH}_2\text{PO}_4:\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,17M:0,72M, 10,0 mL.

4.3.3. Medio autoinductor ZYM-5052 ⁵⁰. Para preparar 100 mL: Triptona, 1,0 g. Extracto de levadura, 0,5 g. Sulfato de Magnesio (MgSO_4) 1M, 200 μL . Oligoelementos 1000X, 20 μL . Solución 5052 25X, 4,0 mL. Solución M 25X, 4,0 mL.

La composición de las soluciones utilizadas para preparar este medio son:

- Solución 5052 25X: Glucosa 12,5%, Lactosa 12,5%, Glicerol 5%.
- Solución M 25X: Na_2HPO_4 0,625 M, KH_2PO_4 0,625 M, NH_4Cl 1,25 M, Na_2SO_4 0,125 M.
- Oligoelementos 1000X: FeCl_3 50 mM, CaCl_2 20m M, MnCl_2 10 mM, ZnSO_4 10 mM, CoCl_2 2 mM, CuCl_2 2 mM, NiCl_2 2 mM, Na_2MoO_4 2 mM, $\text{Na}_2\text{-SeO}_3$ 2 mM, H_3BO_3 2 mM.

4.4. Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron Mouse anti-His Antibody, General Electric, en una dilución 1/3000, Mouse anti-Alfa Tubulina de *H. contortus* AA4.3, en una dilución 1/2000 y Mouse anti-Beta Tubulina de *H. contortus* E7, en una dilución 1/2000, mientras que el anticuerpo secundario utilizado en todos los casos fue el anticuerpo conjugado a HRP Goat Anti-Mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, en una dilución 1/3000.

4.5. Resinas y columnas para IMAC.

En este trabajo se realizaron cromatografías de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) para la purificación de proteínas. Para esto se emplearon las columnas comerciales Ni-NTA Spin Column (Qiagen) y la resina comercial Ni-NTA Agarose (Thermo-Fisher) en experimentos separados.

5. Métodos.

5.1. Generación de células quimiocompetentes.

Para la generación de células quimiocompetentes se hacen precultivos de las células a utilizar en 3 mL de LB y se incuban overnight (ON) a 37°C. Al día siguiente se inoculan 3 mL de LB con 20 µL del cultivo obtenido por incubación ON. Este cultivo nuevo se incuba 4 horas a 37 °C con agitación y luego se transfiere 1 mL a un eppendorf estéril, que se enfría en hielo por 10 minutos. A continuación se colectan las células centrifugando a 4000 rpm y 4 °C por 2 minutos y se remueve el sobrenadante. Las células se resuspenden en 1 mL de CaCl₂ 100 mM frío, se colectan centrifugando a 4000 rpm y 4 °C por 5 minutos, y se descarta el sobrenadante. Finalmente se resuspenden las células en 100 µL de CaCl₂ 100 mM frío, que se incuban en hielo por 30 minutos antes de transformar.

5.2. Transformación de células quimiocompetentes.

Para la incorporación de los plásmidos en las cepas de *E. coli* utilizadas, a las células previamente incubadas en hielo se le agregan 2 µL de la solución que contiene el plásmido y se las incuba en hielo durante 20 minutos. A continuación se les realiza un shock térmico a 42 °C durante 90 segundos y se las incuba en hielo durante 2 minutos más. Luego se les agrega 350 µL de LB estéril y se incuban a 37 °C por 50 minutos con agitación a 200 rpm. Finalmente se plaquean 100 µL de células en placas de LB con Ampicilina y la placa se incuba ON a 37 °C en estufa.

5.3. Amplificación y purificación de plásmidos mediante lisis alcalina.

La amplificación de ADN plasmídico se realiza a partir de un cultivo bacteriano de 3 mL en medio LB con Ampicilina 100 µg/mL, incubado a 37 °C toda la noche. La posterior extracción de los plásmidos se realiza mediante el método de lisis alcalina, utilizando el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) y el protocolo recomendado por el fabricante.

5.3.1. Electroforesis en gel de agarosa.

Se realizan geles de agarosa al 0,8 % en buffer TAE 0,5X y adicionando el agente intercalante GelRed (BIOTIUM, Cat #: 41003).

5.4. Expresión y purificación de proteínas.

5.4.1. Expresión de proteínas.

La expresión de proteínas se realizó en varios medios y ensayando varias temperaturas y tiempos de cultivo. En primera instancia se realizó un ensayo de expresión en 4 mL de medio LB, incubando por 2 horas a 37 °C y agitación a 200 rpm antes de la inducción con IPTG 0,5 mM, luego de la cual se dejaba creciendo el cultivo otras 2 horas en las mismas condiciones. Como control se realizó otro cultivo en 3 mL de medio LB, el cual creció por 4 horas a 37 °C y agitación a 200 rpm, sin el agregado de IPTG. También se realizaron ensayos de expresión en 50 mL de medio TB, que fueron incubados ON a 37 °C, utilizando IPTG en concentración 1 mM para la inducción de la expresión de las proteínas de interés. Finalmente se realizaron ensayos de expresión en 50 y 100 mL de medio autoinductor ZYM-5052 incubando a 37 °C ON, a 37 °C por 2 o 4 horas y posterior crecimiento 25 °C ON y a 18 °C por 24, 30 y 48 horas, siempre con agitación a 200 rpm.

5.4.2. Fraccionamiento de proteínas Solubles/Insoluble.

Para el fraccionamiento de los cultivos celulares, el cultivo se centrifuga a 6000 rpm y 4 °C por 15 minutos. Se recupera el sedimento y, conociendo la masa del recipiente en que se centrifugó, se determina el peso húmedo de las células obtenidas. El sedimento se resuspende en buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM pH 8,3 o Tris-HCl 20 mM pH 8,3) según la relación 3 mL de buffer por cada gramo de células. El recipiente que contenía el sedimento se lava con buffer de lisis según la relación 2 mL de buffer por cada gramo de células. A la suspensión de células se agrega cocktail inhibidor de proteasas (Complete EDTA free, Roche) 25X hasta una concentración 1X. La ruptura celular se realiza mediante ultrasonido, utilizando un sonicador (Sonic Ruptor 250, OMNI International) con los siguientes parámetros: 40 % de amplitud, 20 pulsos por minuto, realizando cuatro rondas de 3 minutos cada una con pausas de 3 minutos entre rondas. Luego el cultivo se centrifuga a 15000 rpm a 4 °C por 15 minutos. El sobrenadante obtenido contiene la fracción de proteínas solubles del extracto. El precipitado, correspondiente a la fracción de proteínas insolubles, se resuspende en el mismo volumen utilizado para resuspender el sedimento inicial con buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.3 con concentraciones crecientes de urea (1 M, 2 M, 4 M, 6 M y finalmente 8 M), centrifugando a 15000 rpm y 4 °C por 15 minutos entre cada una.

5.4.3. Electroforesis en gel de acrilamida.

El análisis de las proteínas en las distintas fracciones se realizó mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando geles de 1 mm de espesor y una concentración de acrilamida del 10%. Las electroforesis se realizaron a 90 V hasta que las muestras ingresan al gel separador y luego se continuaron a 120V hasta que el frente de avance haya alcanzado el final del gel.

5.4.4. Purificación por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC).

5.4.4.1. Ni-NTA Spin Column (Qiagen).

Para la purificación de proteínas con tag de histidinas en columnas Ni-NTA Spin Column se siguieron las recomendaciones del fabricante. La columna se equilibra con 600 μ L de buffer Tris-HCl 20 mM, NaH_2PO_4 0,1 M, urea 7M, pH 8.0 y se la centrifuga a 890 xg por 2 minutos con la tapa abierta. Se carga 400 μ L de la solución que contiene la proteína de interés y se centrifuga la columna a 270 xg por 5 minutos con la tapa abierta. Se recolecta la fracción no retenida (Percolado), la cual se vuelve a cargar en la columna y se repite el paso de centrifugación anterior. El proceso desde que se carga la solución que contiene la proteína de interés se repite una vez más. A continuación se agregaron 600 μ L de buffer Tris-HCl 20 mM, NaH_2PO_4 0,1 M, urea 8 M, pH 6,3, se centrifuga la columna a 890 xg por 2 minutos con la tapa abierta y se recolecta la fracción no retenida (Lavado). El proceso de lavado se repite una vez más. Finalmente se agregan 150 μ L de buffer Tris-HCl 20 mM, NaH_2PO_4 0,1 M, urea 8 M, pH 4.5, se centrifuga la columna a 890 xg por 2 minutos con la tapa abierta y se recolecta la fracción no retenida (Eluato). El proceso de elución se repite dos veces más.

5.4.4.2. Ni-NTA Agarose (Thermo-Fisher).

Para la purificación de proteínas con tag de histidinas con resina Ni-NTA Agarose, se cargan 750 μ L de resina dentro de la columna de purificación, la cual se fija verticalmente y se deja asentar completamente. La columna se lava con 2,25 mL de agua destilada y se equilibra con 2,25 mL de Denaturing Binding Buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, urea 8 M, pH 7,8). Luego se agrega la fracción proteica a purificar a la resina, dejando transcurrir la etapa de unión (Binding) ON a 4 °C, con agitación leve. A continuación se fija la columna verticalmente y la resina se dejó se asentar completamente. Se lava la columna con 1,5 mL de Denaturing Binding Buffer. Se guarda el

sobrenadante (Percolado 1). Se repite el paso anterior y se guarda el sobrenadante (Percolado 2). Luego se lava la columna con 1,5 mL de Denaturing Wash Buffer pH 6 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, urea 8 M, pH 6,0) y se guarda el sobrenadante (Lavado 1). Se repite el paso anterior y se guarda el sobrenadante (Lavado 2). Se lava la columna con 1,5 mL de Denaturing Wash Buffer pH 5,3 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, urea 8 M, pH 5,3) y se guarda el sobrenadante (Lavado 3). Se repite el paso anterior y se guarda el sobrenadante (Lavado 4). Finalmente se eluyen las proteínas con 3,0 mL de Denaturing Elution Buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, urea 8 M, pH 4,0), recogiendo los eluatos en fracciones de 0,5 mL. Este protocolo fue diseñado en función de las recomendaciones proporcionadas por el fabricante en el manual de usuario.

5.5. Western Blot.

Para la realización de Western Blots las proteínas se resuelven mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Luego se realiza la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (General Electrics) sometiendo al gel a una corriente de 400 mA por una hora, en un dispositivo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). La membrana se bloquea se realiza con solución de bloqueo (leche en polvo descremada 5% en buffer TBST) a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se incuba la membrana con el anticuerpo primario por 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Se realizan 4 lavados de 10 minutos cada uno en buffer TBST. Luego se incuba la membrana con el anticuerpo secundario (conjugado a HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Se realizan 4 lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Para detectar la actividad de HRP se utiliza el sustrato comercial Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific (Cat#: 32106), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los revelados se registraron con un equipo GBOX (Syngene) con un tiempo de exposición de 5 minutos.

6. Resultados y discusión.

6.1. Amplificación y purificación de plásmidos mediante lisis alcalina.

Las secuencias nucleotídicas codificantes de la alfa tubulina (GenBank: L02108.1) y la beta tubulina (GenBank: M76493.1) de *H. contortus* fueron optimizadas, sintetizadas y clonadas en el plásmido pET3a por la compañía GenScript® (véase Fig. 5). El proceso de optimización consiste en que la secuencia nativa de las proteínas, o de la construcción planteada, es modificada mediante el algoritmo OptimumGene™ de dicha compañía, el cual aplica una serie de criterios buscando adaptar la secuencia nucleotídica al organismo en el cual se va a expresar la proteína, en nuestro caso *E. coli*. Para esto introduce de forma aleatoria el primer y segundo codón más utilizado de acuerdo a la utilización de codones del hospedero, también optimizan el contenido GC, eliminan elementos de acción en cis, sitios de corte de enzimas de restricción que puedan interferir con el posterior clonado en el plásmido de expresión y secuencias tipo Shine-Dalgarno internas que puedan estar presentes en la CDS (<http://www.genscript.com/codon-opt.html>), con el objetivo de obtener mejores resultados en la expresión. En el Anexo 9.3. se muestra el informe obtenidos por la herramienta Rare Codon Analysis Tool (GenScript), realizado previo al pedido de los plásmidos, en el que se informan aquellos aspectos que se pueden mejorar con la optimización de secuencia. En el Anexo 9.4. se observa una comparación entre las secuencias nucleotídicas nativas y optimizadas para ambas proteínas.

Tras la obtención de los plásmidos, el primer paso de trabajo fue amplificarlos para tener un stock del ADN para su futura utilización. Para ello se realizó la transformación de *E. coli*/DH5 α . A partir de las bacterias transformadas, se hicieron cultivos en 4 mL de medio LB, que se incubaron ON a 37°C, para la purificación del ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina. La preparación de plásmidos fue analizada en una electroforesis en gel de agarosa. Se analizaron cuatro muestras, dos extracciones de plásmido para cada tubulina (Figura 6). Estas extracciones fueron de 40 μ L cada una y su concentración fue cuantificada por nanodrop, obteniendo se los siguientes resultados:

Muestra	Conc. de ADN (ng/ μ L)	Abs. 260/280 nm	Rendimiento (ng/mL)	Muestra	Conc. de ADN (ng/ μ L)	Abs. 260/280 nm	Rendimiento (ng/mL)
α 1	61,4	1,85	614	β 1	56,6	1,80	566
α 2	68,2	1,70	682	β 2	57,0	1,79	570

Tabla 1: Resultados de la cuantificación de las muestras obtenidas de la purificación de ADN plasmídico. Se muestran la concentración de ADN obtenida expresada en ng/ μ L, la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm y el rendimiento expresado en ng de ADN por mL de cultivo.

Las bandas observadas en el gel eran bandas únicas, que migraban como si tuvieran un tamaño entre los 8000 y 10000 pares de bases, considerando el marcador de peso molecular utilizado. No se observaron otras bandas contaminantes de mayor o menor PM (véase Fig. 6). El hecho de que se observara una única banda en cada carril y que todas las bandas se observaran en alturas similares dio la idea que las preparaciones de plásmidos eran de buena calidad. Esto confirmó la información proporcionada por las relaciones de absorbancia a 260 y 280 nm medidas para las muestras, las cuales se presentaron en el entorno de 1,8 (véase Tabla 1), valor esperado para soluciones de ADN puras.

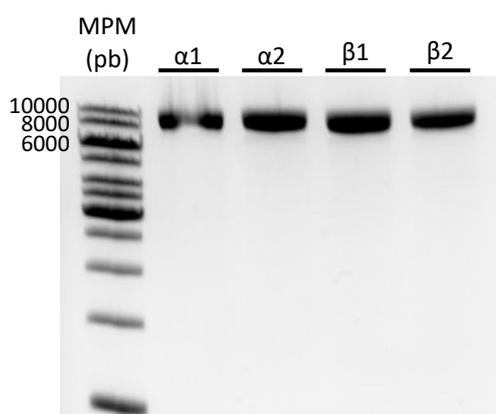


Figura 6: Análisis por electroforesis en gel de agarosa 0,8% del ADN plasmídico de las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina o pET3a_BetaTubulina, obtenido mediante lisis alcalina utilizando el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Carril 1 MPM, carriles 2 y 3 extracciones de pET3a_AlfaTubulina, carriles 4 y 5 extracciones de pET3a_BetaTubulina. Marcador de peso molecular (MPM): 1Kb DNA Ladder (Cat #: N3232L), New England Biolabs.

Lo llamativo fue el tamaño aparente de los plásmidos, ya que el tamaño real de ambos es cercano a las 6000 pares de bases. Este comportamiento tal vez pueda deberse a dos factores, el primero de ellos es el efecto que tiene el agente utilizado para teñir el ADN, en este caso GelRed, sobre la migración de las muestras en el gel, ya que es conocido que el ADN puede migrar más rápido si el proceso de tinción se realiza previo a la electroforesis, observándose las bandas como si tuvieran un mayor peso molecular al real. Es por esto que el fabricante recomienda realizar el proceso luego de correr las muestras. El otro factor refiere a las diferencias en los estados de superenrollamiento entre las muestras analizadas y el marcador de peso molecular, ya que los tamaños indicados por el marcador corresponden a fragmentos de ADN lineales y el ADN en las muestras analizadas se encuentra en estado superenrollado. Estos dos estados tienen capacidad de migración diferentes,

siendo el ADN superenrollado el que encuentra menor resistencia al avance, y por lo tanto migrará más que un fragmento del mismo tamaño en estado lineal.

Posteriormente se observó que la transformación con estos plásmidos fue exitosa y que se logró expresar las tubulinas con estas cepas transformadas, lo cual constituyó la confirmación de que los plásmidos purificados eran los deseados y que las muestras tenían la calidad adecuada para este objetivo.

6.2. Expresión de alfa y beta tubulina en LB a 37 °C.

Para la expresión de las proteínas de interés se transformaron células de *E. coli* BL21 Star (DE3). En primera instancia a partir de las cepas transformadas se generaron cultivos en medio LB, los cuales fueron incubados a 37 °C por 4 horas, y la inducción de la expresión se realizó con IPTG en concentración 0,5 mM luego de 2 horas de crecimiento. Como control se realizaron cultivos con estas mismas células en los cuales no se realizó la inducción con IPTG. Para determinar si las tubulinas se habían expresado se analizaron las proteínas de los extractos totales mediante una electroforesis desnaturante en gel de acrilamida (SDS-PAGE). Para esto se cargaron en cada carril 15 µL de muestras compuestas por 10 µL de la fracción proteica, 10 µL de agua y 5 µL de buffer de carga.

A pesar de que las muestras no migraron de buena manera, no se observaron diferencias en los patrones de proteínas entre los cultivos en los que se realizó la inducción y aquellos en los que no se realizó, sobre todo en el entorno de los 50 kDa del marcador de peso molecular, peso molecular aproximado de ambas proteínas (Figura 7). Esto nos llevó a probar otro medio de cultivo.

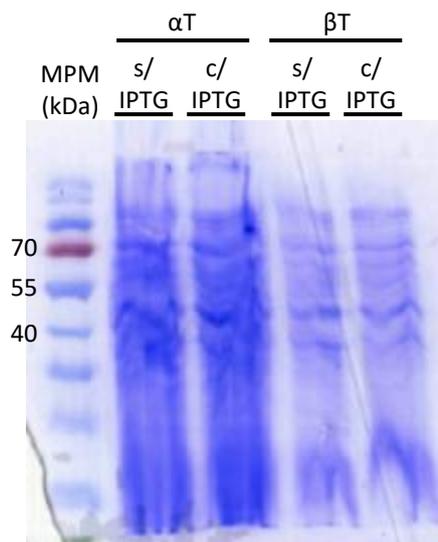


Figura 7: Análisis por electroforesis SDS-PAGE 10% de los extractos totales de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformadas con plásmidos pET3a_AlfaTubulina (α T) o pET3a_BetaTubulina (β T). Se analizaron cultivos en los que se realizó la inducción de la expresión (con IPTG) y cultivos en los que no se realizó (sin IPTG). Carril 1 MPM, carril 2 α T sin IPTG, carril 3 α T con IPTG, carril 4 β T sin IPTG, carril 5 β T con IPTG. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

6.3. Expresión de alfa y beta tubulina en TB a 37 °C.

El siguiente ensayo de expresión se llevó a cabo en medio Terrific Broth (TB). Los cultivos fueron incubados durante 8 horas a 37 °C, induciendo la expresión con IPTG 1 mM, habiendo pasado 4 horas de crecimiento. Posteriormente, los extractos proteicos fueron fraccionados en fracciones solubles (FS) y fracciones insolubles (FI), tal como se describe en métodos. Estas fracciones fueron analizadas, junto con el extracto total (ET) de los cultivos, mediante SDS-PAGE (Figura 8). Allí se observó claramente la expresión de beta tubulina en grandes cantidades, pero de manera insoluble, ya que se observaron bandas definidas en el entorno de los 50 kDa en los carriles correspondientes al extracto total y la fracción de proteínas insolubles. La expresión de la alfa tubulina no se descartó pero no se observaron bandas claras que evidenciaran su presencia, como las observadas para la beta tubulina.

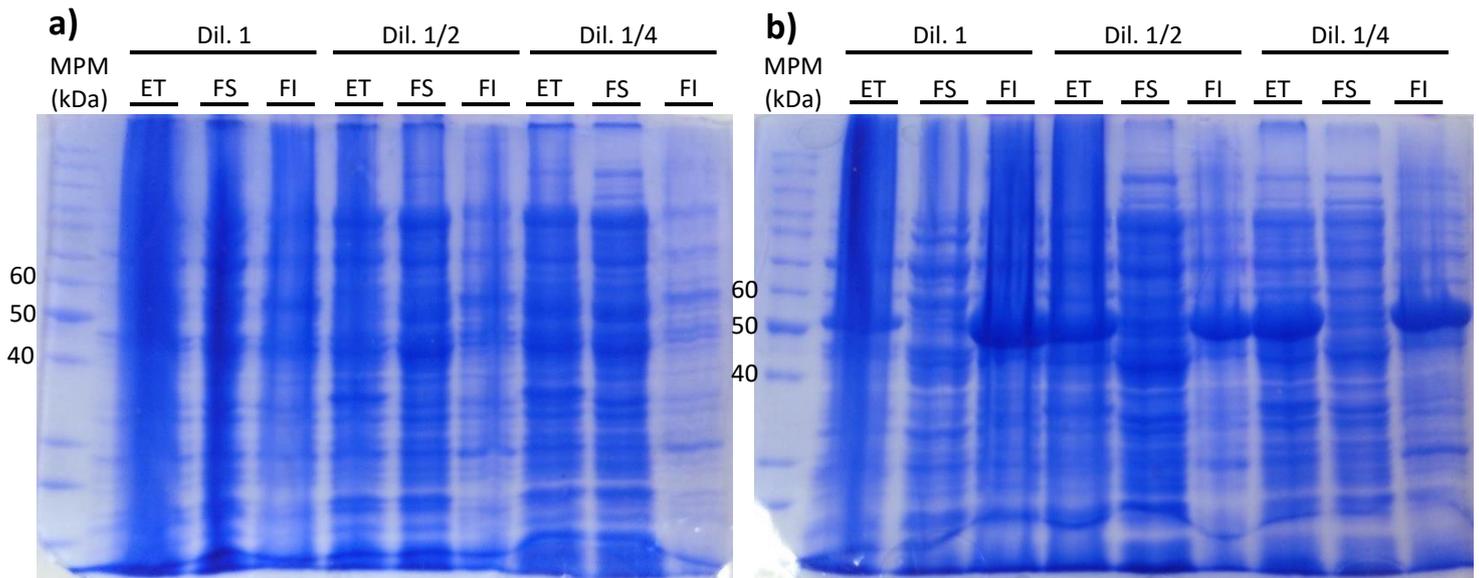


Figura 8: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida 10% de distintas fracciones de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformadas con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina (Fig. a) o pET3a_BetaTubulina (Fig. b). En ambos geles se cargaron tres diluciones de cada una de las fracciones, siendo estas: el extracto total (ET), carriles 2, 5 y 8, la fracción de proteínas solubles (FS), carriles 3, 6 y 9, y la fracción de proteínas insolubles (FI), carriles 4, 7 y 10. MPM: PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

6.3.1. Identificación por Western Blot de alfa y beta tubulina.

Para verificar si la banda detectada en correspondía a la expresión de beta tubulina y para despejar dudas sobre la expresión de alfa tubulina se realizó un Western Blot de las fracciones solubles e insolubles de ambos cultivos, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo que reconoce tag de histidinas, como el que poseen ambas proteínas (Figura 9). El revelado de la membrana mostró que la banda mayoritaria observada en la fracción insoluble del cultivo de beta tubulina correspondía efectivamente a esta proteína y que la alfa tubulina se había expresado pero en cantidades mucho menores en comparación con la anterior. Estos resultados nos llevaron a intentar la expresión de las tubulinas en otro medio de cultivo.

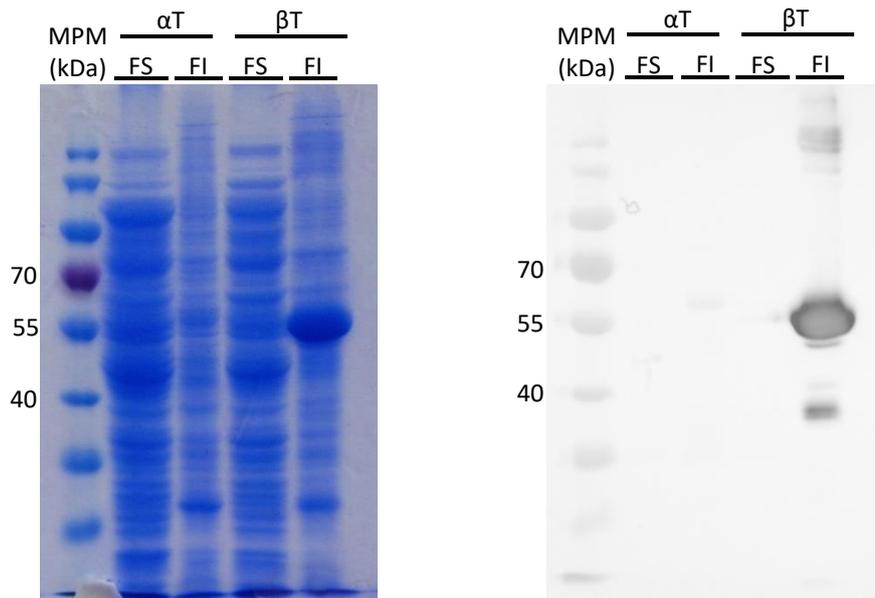


Figura 9: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina (α T), carriles 2 y 3, o pET3a_BetaTubulina (β T), carriles 4 y 5. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

6.4. Expresión de alfa y beta tubulina en ZYM 5052 a 37 °C.

El siguiente ensayo de expresión se llevó a cabo en el medio autoinductor ZYM 5052, el cual utiliza las propiedades de la glucosa y los aminoácidos de la Triptona para inhibir la inducción por lactosa en la fase de crecimiento logarítmico de los cultivos, y una vez consumidos estos componentes del medio actúa como autoinductor por la presencia de lactosa en él. De esta manera la inducción con IPTG no es necesaria, lo que hace el trabajo con este medio más sencillo. De forma paralela se largaron cultivos para la producción de ambas proteínas, los cuales fueron incubados por ON a 37 °C, y posteriormente fraccionados, para obtener las fracciones de proteínas solubles e insolubles.

Estas fracciones, junto al extracto total, fueron analizadas por SDS-PAGE. Allí se observó claramente la expresión de ambas proteínas, ya que se observaron bandas definidas en el entorno de los 50 kDa del marcador de peso molecular en los carriles correspondientes al extracto total y la fracción de proteínas insolubles para la alfa tubulina, y posiblemente en las tres fracciones analizadas para al beta tubulina (Figura 10), lo cual puede deberse a que la proteína se haya expresado tanto de manera soluble como insoluble, o a que el fraccionamiento no haya podido lograrse de buena manera.

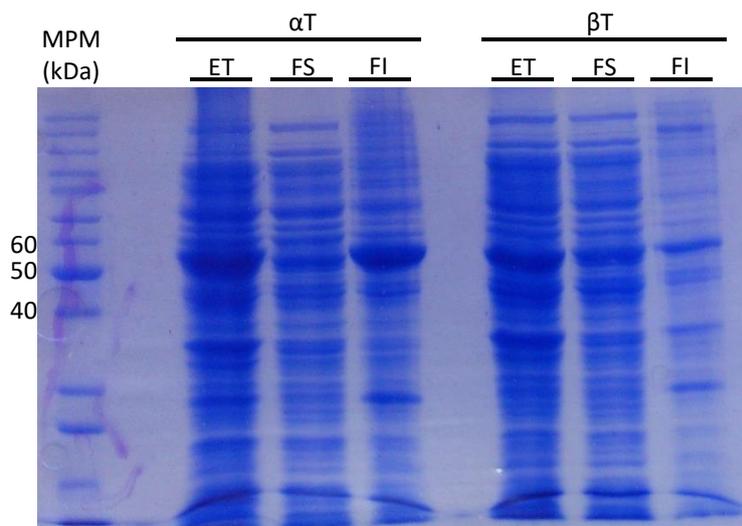


Figura 10: Análisis por SDS-PAGE 10% de distintas fracciones de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformadas con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina (αT) o pET3a_BetaTubulina (βT). En este gel se cargaron tres fracciones para cada proteína, siendo estas: el extracto total (ET), carriles 3 y 7, la fracción de proteínas solubles (FS), carriles 4 y 8, y la fracción de proteínas insolubles (FI), carriles 5 y 9. MPM: PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

6.4.1. Identificación por Western Blot de alfa tubulina.

Para confirmar la expresión de ambas proteínas en este medio y para determinar en qué fracciones se encontraban, se realizó un Western Blot de las fracciones solubles e insolubles del cultivo de alfa tubulina, utilizando como anticuerpo primario otra vez un anticuerpo que reconoce tag de histidinas (Figura 11). Por lo observado luego del revelado de la membrana se pudo concluir que la banda mayoritaria observada con anterioridad en la fracción insoluble del cultivo de alfa tubulina correspondía efectivamente a esta proteína. Además se observó una banda de menor intensidad en el carril correspondiente a la fracción de proteínas solubles, pero por su forma irregular y baja intensidad se consideró que podría tratarse de un error a la hora de cargar el gel.

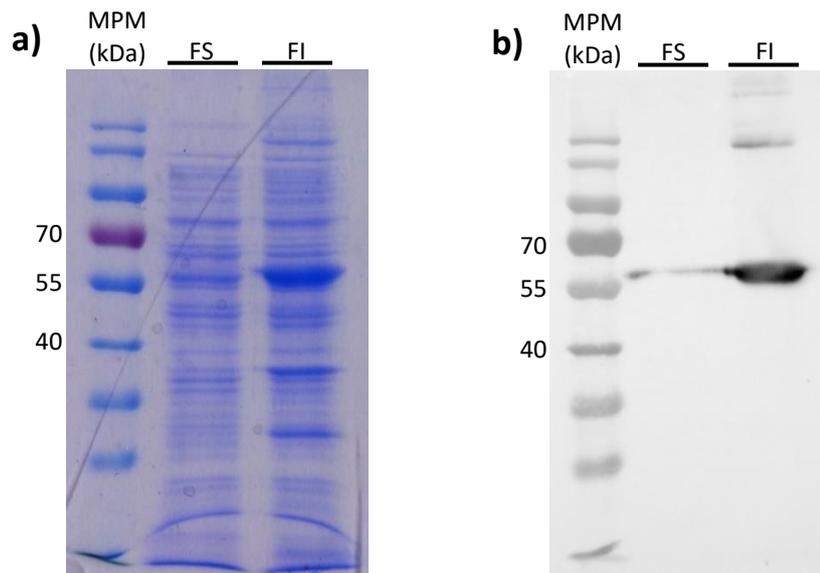


Figura 11: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) del cultivo de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con el plásmido pET3a_AlfaTubulina. a: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. b: Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron las proteínas resueltas en un gel igual al de A. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

6.4.2. Identificación por Western Blot de beta tubulina.

El mismo análisis se llevó a cabo para el cultivo de beta tubulina, utilizando los mismos anticuerpos y condiciones (Figura 12). De manera similar a lo observado con la alfa tubulina, en este caso también se pudo confirmar que la banda mayoritaria de la fracción insoluble, observada con anterioridad en el análisis por SDS-PAGE, correspondía a la beta tubulina. De esta manera se pudo concluir que en este medio y en estas condiciones ambas proteínas se expresaban, pero de manera insoluble. Considerando que para poder realizar ensayos de polimerización con ellas es necesario que sean solubles se decidió bajar la temperatura del cultivo, de modo de determinar si este factor podría aumentar la solubilidad de las proteínas.

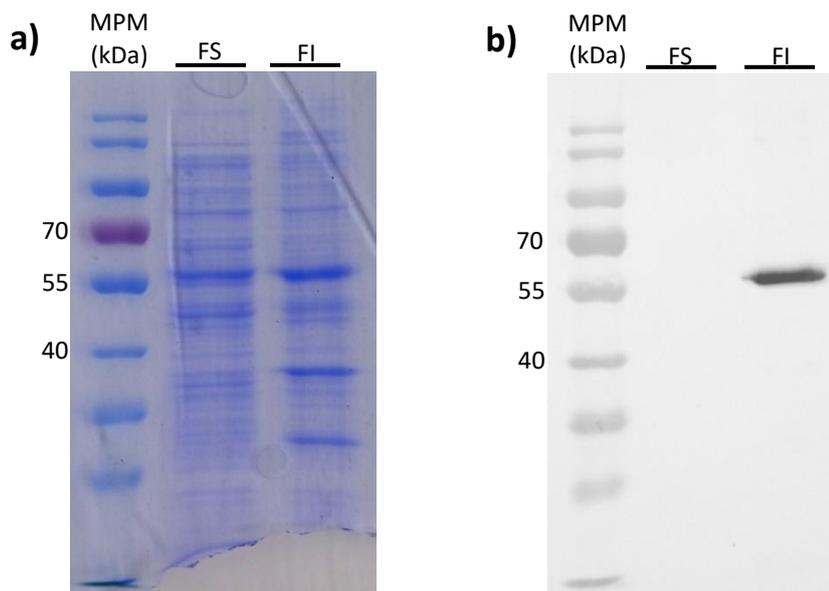


Figura 12: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) del cultivo de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con el plásmido pET3a_BetaTubulina. a: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. b: Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron las proteínas resueltas en un gel igual al de A. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

6.5. Expresión de alfa y beta tubulina en ZYM 5052 a 25 °C, con o sin crecimiento previo a 37 °C.

El siguiente ensayo de expresión se realizó para ambas proteínas a 25 °C ON, habiendo realizando etapas de crecimiento a 37 °C por 2 o 4 horas, de manera de obtener una mayor biomasa al inicio del cultivo. También se realizaron cultivos sin crecimiento previo. Posteriormente los cultivos se fraccionaron y las fracciones solubles e insolubles obtenidas de todos ellos, con la excepción del cultivo de beta tubulina sin crecimiento a 37 °C se analizaron por SDS-PAGE (Figura 13). Allí se observó claramente la expresión de la alfa tubulina en grandes cantidades ya que se detectaron bandas definidas en el entorno de los 50 kDa del marcador de peso molecular en los carriles correspondientes a las tres fracciones insolubles analizadas. En cuanto a la beta tubulina, no se detectaron bandas de tamaño similar a las observadas para la alfa tubulina, pero su expresión no se descartó.

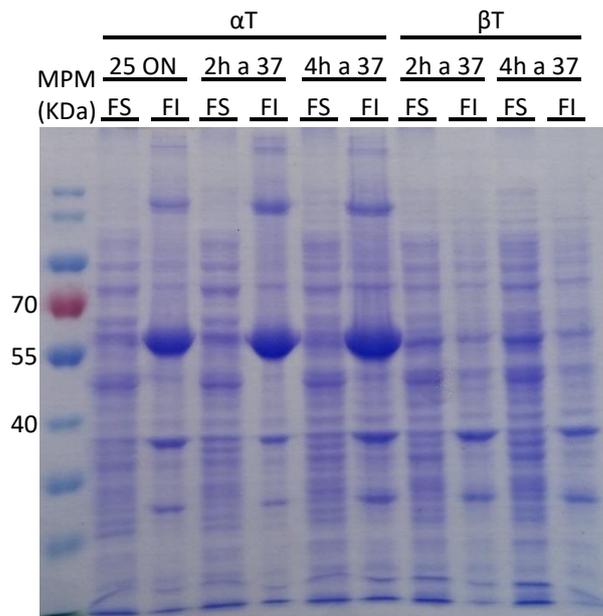


Figura 13: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida 10% de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformadas con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina (α T) o pET3a_BetaTubulina (β T). MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616). Thermo Scientific.

6.5.1. Identificación por Western Blot de alfa tubulina.

Para confirmar que la expresión de ambas proteínas se había dado y también para determinar en qué fracciones se encontraban, se realizó Western Blot de las fracciones solubles e insolubles del cultivo de alfa tubulina, utilizando como anticuerpo primario otra vez un anticuerpo que reconoce tag de histidinas (Figura 14). El revelado de la membrana mostró que la banda mayoritaria observada con anterioridad en la fracción insoluble del cultivo de alfa tubulina correspondía efectivamente a esta proteína. Además se observaron bandas de menor intensidad en los carriles correspondientes a las fracciones de proteínas solubles del cultivo que no tuvo crecimiento a 37 °C y del cultivo que tuvo dos horas de crecimiento previo, por lo que la alfa tubulina podría estarse expresando soluble en estas condiciones, pero en muy bajas cantidades.

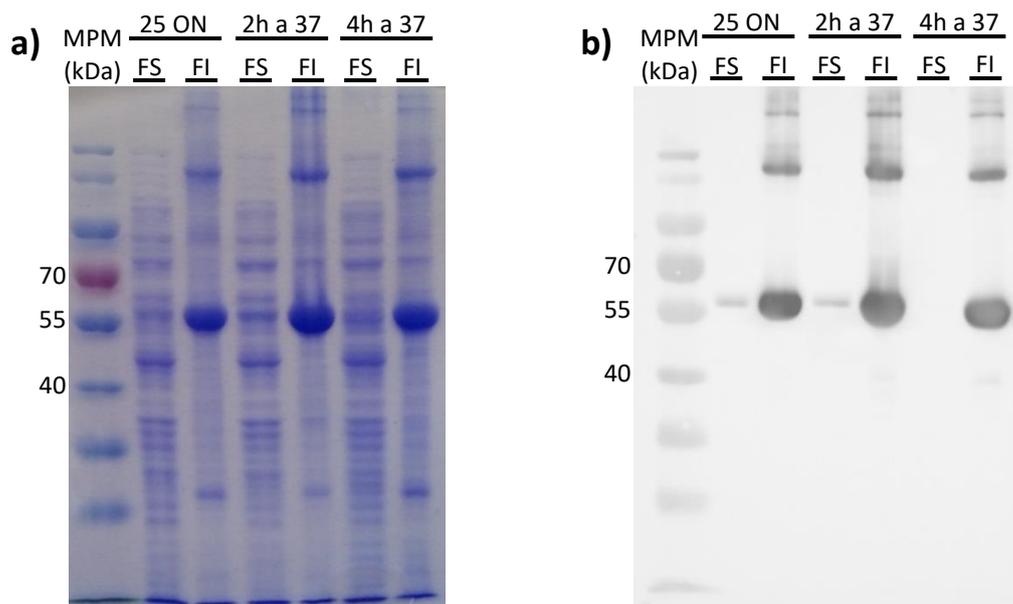


Figura 14: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con el plásmido pET3a_AlfaTubulina. a: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. b: Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron las proteínas resueltas en un gel igual al de A. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

6.5.2. Identificación por Western Blot de beta tubulina.

El mismo análisis se llevó a cabo para el cultivo de beta tubulina, utilizando los mismos anticuerpos y condiciones (Figura 15). Por lo observado la beta tubulina no se habría expresado en estas condiciones, ya que no se detectaron bandas en ninguna de las muestras analizadas. Esto no fue interpretado como que las condiciones del cultivo no fueron favorables para la expresión, en cambio consideramos que este comportamiento fue determinado por el clon elegido para realizar el cultivo, ya que a pesar de que se partía de colonias crecidas en placas de LB con ampicilina, estas mostraron desde el comienzo del trabajo niveles variables de expresión, e incluso no todas expresaban, a pesar de haber sido transformadas con éxito.

De este ensayo se pudo concluir que la alfa tubulina en este medio y con un cultivo ON a 25 °C se obtiene principalmente de manera insoluble, aunque se pueden obtener pequeñas cantidades de la proteína soluble.

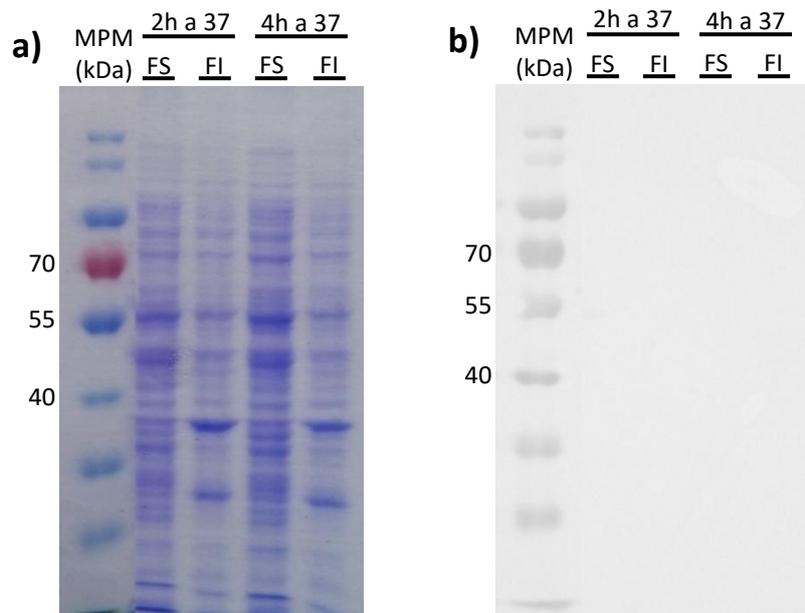


Figura 15: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con el plásmido pET3a_BetaTubulina. a: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. b: Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron las proteínas resueltas en un gel igual al de A. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

Con la intención de poder mejorar el rendimiento de la obtención de estas proteínas de manera soluble se decidió realizar cultivos a menor temperatura, considerando que el descenso de temperatura previamente ensayado parece haber tenido efecto sobre la solubilidad de las proteínas.

6.6. Expresión de alfa y beta tubulina en ZYM 5052 a 18 °C, por 24, 30 o 48 horas.

El siguiente ensayo de expresión se realizó para ambas proteínas a 18 °C por 24, 30 o 48 horas. La extensión de los tiempos de cultivo se debió a que estimamos que el crecimiento de las células a esta temperatura sería mucho menor que en los ensayos anteriores, por lo que el inicio de la expresión, consumo total de la glucosa del medio, se daría en un tiempo mayor. Posteriormente los cultivos fueron fraccionados y las fracciones solubles e insolubles obtenidas de todos ellos se analizaron por SDS-PAGE (Figura 16).

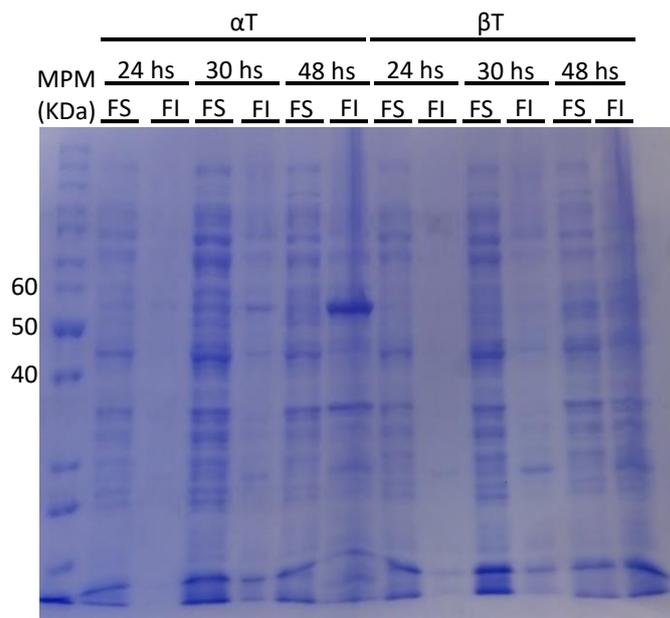


Figura 16: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida 10% de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformadas con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina (α T) o pET3a_BetaTubulina (β T). MPM: PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

Allí se observó claramente la expresión de la alfa tubulina, aunque en menores cantidades que las observadas en condiciones anteriores, ya que se detectó una banda definidas en el entorno de los 50 kDa del marcador de peso molecular en el carril correspondiente a la fracción insoluble del cultivo por 48 horas de alfa tubulina. También se observaron bandas similares, aunque de menor intensidad en las fracciones insolubles de los demás cultivos de alfa tubulina. En cuanto a la beta tubulina, no se detectaron bandas de tamaño similar a las observadas para la alfa tubulina, pero su expresión no se descartó.

6.6.1. Identificación por Western Blot de alfa y beta tubulina.

Para verificar si había tenido lugar la expresión de ambas proteínas se realizó un Western Blot utilizando exactamente las mismas muestras que en el gel del apartado anterior, y utilizando como anticuerpo primario otra vez un anticuerpo que reconoce tag de histidinas (Figura 17). El revelado de la membrana mostró que la banda mayoritaria observada con anterioridad en la fracción insoluble del cultivo de alfa tubulina incubado por 48 horas, correspondía efectivamente a esta proteína. También se observaron bandas claras en las fracciones insolubles de los demás cultivos de alfa

tubulina, y bandas de menor intensidad en las fracciones solubles de estos mismos. Por lo observado la beta tubulina se habría expresado en estas condiciones únicamente en el cultivo con mayor tiempo de incubación, de manera insoluble, y cantidades muy pequeñas, a juzgar por la única banda observada. Nuevamente la poca expresión de beta tubulina no fue interpretada como que las condiciones del cultivo no fueron favorables para la expresión, en cambio consideramos que este comportamiento fue determinado por el clon elegido para realizar el cultivo.

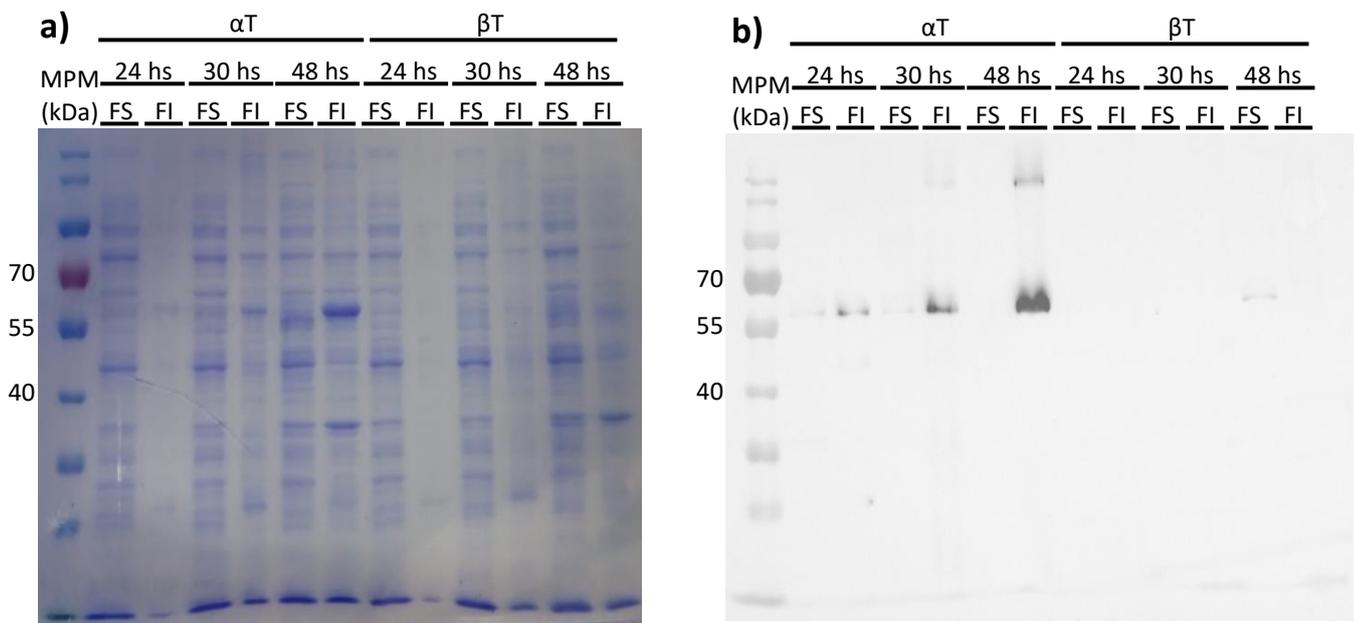


Figura 17: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) de los cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina (αT), o pET3a_BetaTubulina (βT). a: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. b: Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron las proteínas resueltas en un gel igual al de A. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

De esta manera se pudo concluir que la alfa tubulina en estas condiciones se expresa en menores cantidades y en tiempos mayores, mayoritariamente de manera insoluble, y sin aumentar la proporción de proteína obtenida de manera soluble. Respecto a la beta tubulina, a pesar que a las 48 horas de cultivo se pudo observar su presencia en cantidades bajas, lo que significaría una mejora con respecto a los resultados obtenidos en los cultivos a 25 °C, consideramos que estas condiciones no generan mejoras considerables en el rendimiento, y sobretodo no facilita la obtención de la proteína de manera soluble, por lo que no sería recomendable su implementación. Lo mismo puede decirse sobre la alfa tubulina. Por estas razones se decidió buscar condiciones de solubilización de

estas proteínas a partir de las fracciones insolubles previamente obtenidas, como método alternativo para su obtención de forma soluble.

6.7. Western Blot de la solubilización de alfa tubulina con 2, 4 y 8 M urea.

Cuando una proteína recombinante se expresa formando cuerpos de inclusión, se deben determinar las condiciones de solubilización más favorables, utilizando comúnmente agentes caotrópicos como urea o cloruro de guanidinio. En muchas ocasiones, son suficientes bajas concentraciones del agente caotrópico debido a la naturaleza de los cuerpos de inclusión formados, que pueden estar constituidos por la proteína de interés cuya estructura secundaria puede llegar a estar poco alterada. También es posible que los cuerpos de inclusión contengan a la proteína de interés en su forma casi completamente desplegada, haciendo necesario utilizar condiciones de solubilización más fuertes⁵¹. Luego de haber ensayado varias condiciones de cultivo en las cuales las tubulinas se expresaban de manera insoluble, evaluamos el efecto de concentraciones crecientes del agente caotrópico urea sobre su solubilidad, de modo de determinar la concentración mínima a la cual podríamos solubilizar las tubulinas contenidas en los cuerpos de inclusión.

Para este ensayo se partió de la fracción insoluble de un cultivo en medio ZYM 5052, incubado ON a 37 °C, no incluido dentro de los resultados mostrados, en la cual se había detectado la presencia de alfa tubulina. El volumen total de dicha fracción fue dividido en tres partes iguales, que posteriormente fueron centrifugados a 15000 rpm por 15 minutos y luego fueron resuspendidos en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,3, conteniendo urea 2 M, 4 M y 8 M respectivamente. Luego de una incubación ON a 4 °C, las tres muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm por 15 minutos, de modo de separar las fracciones de proteínas solubles e insolubles. Las seis muestras obtenidas fueron analizadas por Western Blot, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la alfa tubulina de *H. contortus*, como anticuerpo primario (Figura 18).

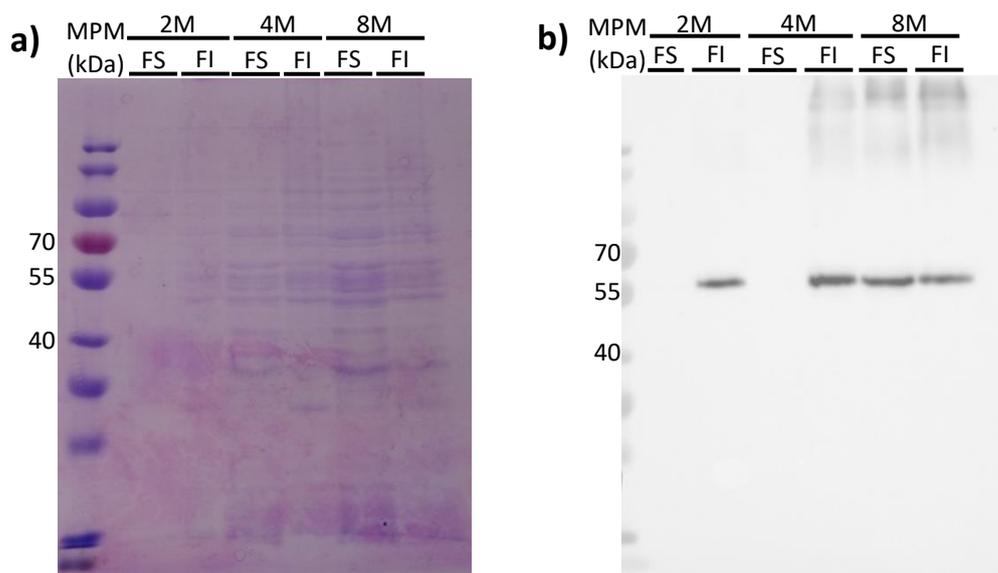


Figura 18: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) recuperadas a partir de la fracción de proteínas insolubles de un cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con el plásmido pET3a_AlfaTubulina, luego de la incubación de la misma con distintas concentraciones del agente caotrópico urea. a: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. b: Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron las proteínas resueltas en un gel igual al de A. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

El revelado de la membrana muestra que la alfa tubulina se mantiene insoluble en presencia de 2 M y 4 M de urea, y que puede solubilizarse parcialmente utilizando urea en una concentración 8 M. Este resultado nos llevó a trabajar con esta concentración de urea para la solubilización de alfa tubulina en ensayos posteriores.

6.8. Western Blot de la solubilización de alfa y beta tubulina con 8 M urea.

Partiendo de las fracciones insolubles de las muestras analizadas en el apartado 6.4.1. y 6.4.2., y considerando el comportamiento observado en el apartado anterior, se decidió resuspender dichas fracciones en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,3 conteniendo urea 8 M, repitiendo el procedimiento ya descrito. Las cuatro muestras obtenidas y las dos fracciones de partida, fueron analizadas por Western Blot, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo que reconoce tag de histidinas, presente tanto en la alfa como en la beta tubulina (Figura 19). Luego del revelado de la membrana

se pudo determinar que el comportamiento previamente observado para la alfa tubulina se volvió a repetir, ya que se obtuvo una solubilización parcial de esta.

A pesar de que en la membrana las bandas observadas no son claras, se puede observar la presencia de bandas de aspecto muy similar, a la altura de los 50 kDa del marcador de peso molecular en los tres carriles correspondientes a la alfa tubulina. En cuanto a la beta tubulina, parece que estas condiciones no alcanzaron para solubilizar los cuerpos de inclusión, ya que ni en la membrana ni en el gel se alcanzan a observar bandas en el carril correspondiente a la fracción soluble analizada, en cambio se las detecta en los carriles correspondientes a la fracción de partida y la fracción insoluble.

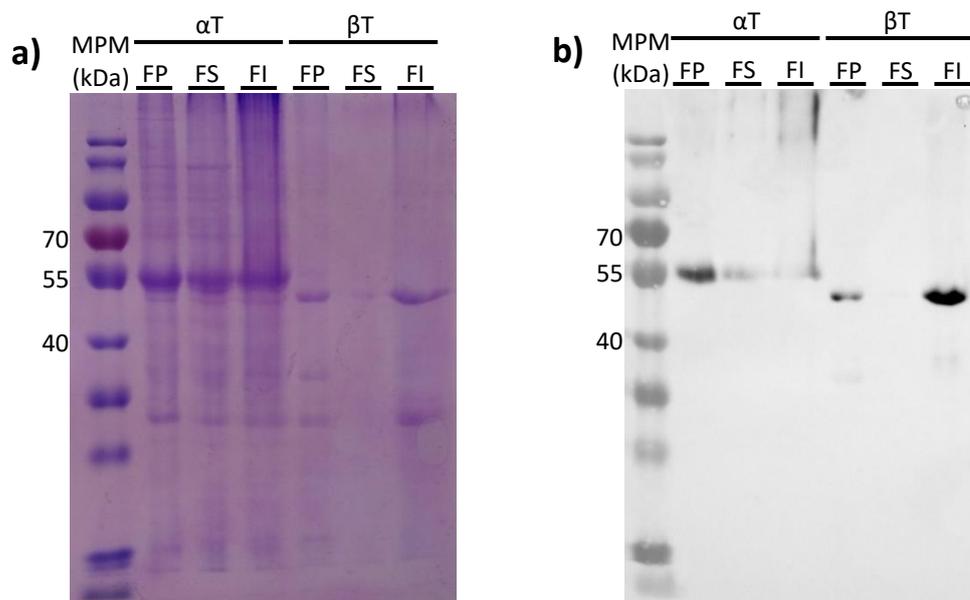


Figura 19: Análisis por Western Blot de las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI) recuperadas a partir de la fracción de proteínas insolubles de cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con los plásmidos pET3a_AlfaTubulina (α T), o pET3a_BetaTubulina (β T), luego de la incubación de estas con una concentración 8 M del agente caotrópico urea. También se cargaron en el gel las fracciones de partida (FP), a partir de las cuales se intentaron solubilizar las tubulinas. a: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. b: Membrana de nitrocelulosa a la que se transfirieron las proteínas resueltas en un gel igual al de A. MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

6.9. Purificación de alfa tubulina con Ni-NTA Spin Column.

Habiendo logrado la solubilización parcial de la alfa tubulina nos dedicamos a evaluar las condiciones para la purificación de esta proteína. Considerando esta etapa del trabajo, en la construcción de los plásmidos se incluyó en las proteínas a expresar un tag de seis histidinas en su extremo amino terminal, las cuales son utilizadas para la purificación de proteínas, por cromatografía de afinidad, por su capacidad de unión a iones metálicos inmovilizados (IMAC). En este caso el ion metálico es Ni²⁺. En primera instancia se intentó la purificación utilizando las Ni-NTA Spin Column de Quiagen, utilizando un protocolo basado en el recomendado por el fabricante ("Protein Purification Under Denaturing Conditions from *E. coli* lysates"). Las fracciones obtenidas durante el procedimiento fueron analizadas mediante SDS-PAGE (Figura 20). Por lo observado en el gel podemos concluir que la proteína no fue retenida por la resina, o al menos la gran mayoría de esta no lo fue, ya que las bandas características correspondientes a la alfa tubulina fueron observadas únicamente en los carriles correspondientes a los cuatro percolados (fracciones no retenidas) de la columna, mientras que en los lavados y eluatos no se las detectó. Ante estos resultados se decidió evaluar la purificación utilizando la resina Ni-NTA Agarose.

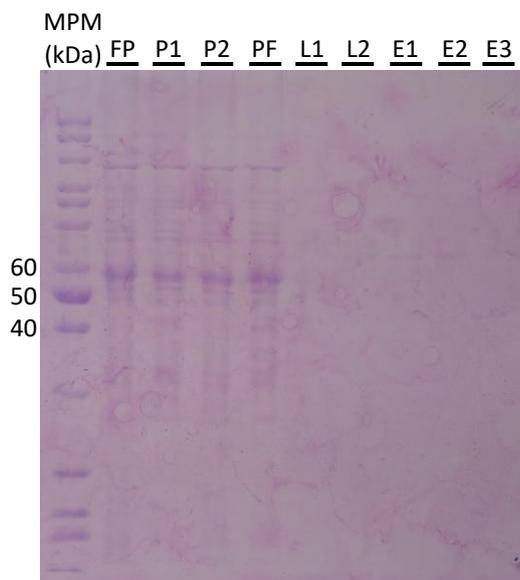


Figura 20: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida 10% de las fracciones de proteínas obtenidas durante el proceso de purificación. En el gel se cargaron la fracción de partida (FP), Percolados (P), Lavados (L), Eluatos (E). MPM: PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

6.10. Purificación de alfa tubulina con Ni-NTA Agarose.

Para este ensayo se utilizó un protocolo basado en el recomendado por el fabricante ("Purification Procedure Under Denaturing Conditions"). Las fracciones obtenidas durante el procedimiento fueron analizadas mediante SDS-PAGE (Figura 21). El resultado de la electroforesis muestra que a diferencia del procedimiento ensayado antes, la proteína fue retenida por la resina y se mantuvo así hasta la etapa de elución, ya que las bandas características correspondientes a la alfa tubulina fueron observadas únicamente en los carriles correspondientes a los cinco eluatos de la columna, principalmente en los primeros cuatro, mientras que en los percolados y lavados no se las detectó. A pesar de que este procedimiento demostró ser efectivo, ya que en los percolados y lavados se quitaron muchas proteínas sin perder las de interés, las muestras obtenidas en las eluciones no son puras, ya que se observan muchas bandas además de las correspondientes a las alfa tubulina.

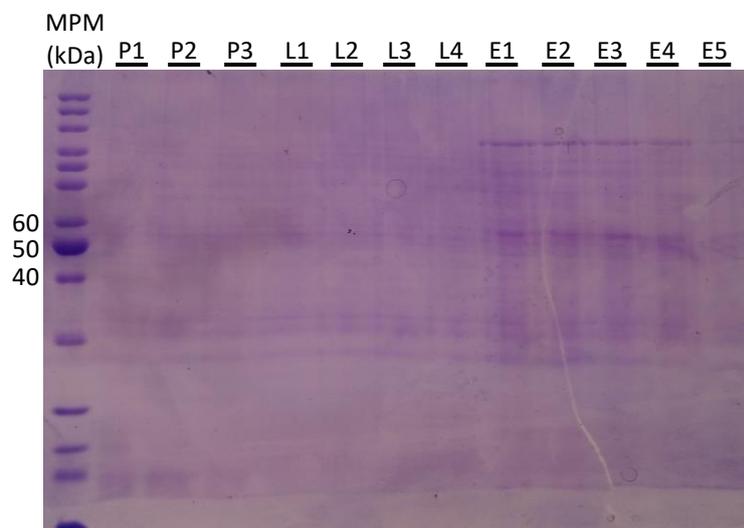


Figura 21: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida 10% de las fracciones de proteínas obtenidas durante el proceso de purificación. En el gel se cargaron Percolados (P), Lavados (L), Eluatos (E). MPM: PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

6.10.1. Identificación por Western Blot de muestras de la purificación de alfa tubulina.

Para confirmar que las bandas observadas corresponden efectivamente a la alfa tubulina se realizó un Western Blot utilizando algunas de las fracciones obtenidas. Se utilizó un anticuerpo que reconoce el tag de seis histidinas como anticuerpo primario (Figura 22). El revelado de la membrana confirmó que las bandas observadas en los eluatos corresponden a la alfa tubulina, y que esta se encuentra presente solo en dichas fracciones, por lo que se podría considerar que el proceso de purificación fue exitoso, aunque como ya vimos se podría mejorar la calidad de la purificación, con el fin de obtener fracciones más puras de alfa tubulina.

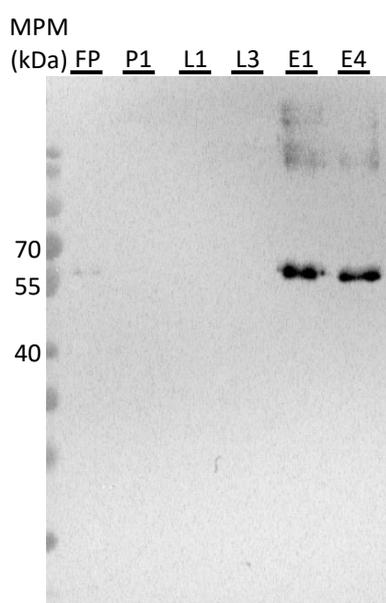


Figura 22: Análisis por Western Blot de algunas de las fracciones de proteínas obtenidas durante el proceso de purificación. En el gel se cargaron la fracción de partida (FP), Percolados (P), Lavados (L), Eluatos (E). MPM: PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

Luego de confirmar la presencia de alfa tubulina en las primeras cuatro fracciones eluidas en la etapa final del procedimiento, estas fueron juntadas y cuantificadas por absorbancia a 280 nm en un nanodrop, de modo de poder estimar un rendimiento para el proceso de expresión. El volumen total de la fracción fue de 2 mL y la concentración de proteínas obtenida fue de 0,35 mg/mL, lo que significaría un rendimiento de 14 mg por litro de cultivo. De cualquier manera hay dos factores a considerar que afectarían el rendimiento del proceso, estos son la pureza de la muestra cuantificada, ya que como se observó existen más proteínas a parte de la alfa tubulina en la fracción (véase Fig. 21), por lo que se estaría sobrestimando la concentración de alfa tubulina y por lo tanto el rendimiento

global del proceso. El otro factor es la eficiencia del proceso de solubilización, ya que como se mostró anteriormente no toda la alfa tubulina pudo solubilizarse a partir de la fracción de proteínas insolubles (véase Fig. 19), por lo que si se repitiera el tratamiento con urea 8 M se podría obtener aún más tubulina de la misma fracción, lo que mejoraría el rendimiento del proceso.

6.11. Análisis por espectrometría de masas de las proteínas expresadas.

Luego de haber podido purificar al menos una de las proteínas que nos habíamos propuesto obtener al principio del trabajo, se decidió analizar por espectrometría de masas la identidad de las proteínas detectadas mediante Western Blot expuestas en los apartados 6.4.1. y 6.4.2., de manera de comprobar que estas proteínas efectivamente se corresponden con las construcciones diseñadas. Con este fin se realizó una electroforesis en gel de acrilamida con las muestras previamente mencionadas, y las bandas que con anterioridad se había detectado que correspondían a las proteínas expresadas fueron recortadas del gel y fueron enviadas al servicio de identificación de proteínas por MALDI-TOF MS/MS de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo. A partir de este análisis se pudo comprobar que las proteínas enviadas correspondían a las construcciones creadas de alfa y beta tubulina. En los anexos 9.5. y 9.6. se muestran los espectros de masas obtenidos y los péptidos identificados en el análisis para ambas proteínas.

7. Conclusiones.

El objetivo de este trabajo consistió en la producción de las proteínas recombinantes alfa y beta tubulina del parásito hematófago *Haemonchus contortus*, utilizando células de *E. coli*. Estas proteínas serían utilizadas para la realización de ensayos de polimerización in vitro, como método de screening sobre la eficiencia de nuevas drogas antihelmínticas. Con este fin se diseñaron y se encargaron los plásmidos de expresión utilizando las secuencias nucleotídica codificantes salvajes de las proteínas nombradas (Fig. 5), obtenidas de GenBank, las cuales fueron modificadas por la empresa que fabricó los plásmidos tomando en cuenta diversos criterios asociados a la especie receptora (*E. coli*), buscando condiciones óptimas para la expresión. En el extremo amino terminal de las secuencias de las proteínas a expresar también se incluyeron seis histidinas, para facilitar la purificación de las proteínas, y un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus) para poder remover estas histidinas una vez que la proteínas fuera purificada, de manera de obtener las tubulinas con la misma estructura que se encontrarían en el parásito (Fig. 25 y 26). Con estos plásmidos se generaron las cepas de *E. coli* DH5 α y BL21 (DE3) Star utilizadas para la amplificación y purificación del ADN plasmídico y la expresión de las proteínas respectivamente.

A pesar de que las secuencias nucleotídica fueron optimizadas para su expresión en *E. coli*, todos los ensayos de expresión llevados a cabo demostraron que ambas proteínas se producían de manera insoluble formando parte de cuerpos de inclusión (Figs. 7-17), llegándose a detectar únicamente muy pequeñas cantidades de proteína soluble en algunos casos. Dichos ensayos se llevaron a cabos en tres medios distintos y utilizando diferentes temperaturas, que variaron desde los 37 °C a los 18 °C, y tiempos de incubación diferentes, que variaron desde las 2 horas a las 48 horas, obteniéndose en todos resultados muy similares. En un artículo publicado recientemente se sugiere que la imposibilidad de obtener tubulinas recombinantes solubles en bacterias como *E. coli* puede deberse a la ausencia de ciertas proteínas que actúan como chaperonas y que intervienen en el correcto plegamiento de las tubulinas en las células eucariotas. Estas son la chaperonina citoplasmática (CCT) y cinco cofactores de plegamiento de tubulinas (TBCA, TBCB, TBCC, TBCD y TBCE) ³⁴. Esto podría explicar porque a pesar de la disminución de la temperatura de cultivo, que puede aumentar la solubilidad de las proteínas recombinantes expresadas, no se observó un cambio significativo en la solubilidad de las proteínas de interés.

La estructura de las proteínas expresadas fue confirmada mediante espectrometría de masas. En particular se analizaron las bandas reconocidas mediante Western Blot luego de la expresión de ambas proteínas en medio ZYM 5052 a 37 °C (véase Figs. 11 y 12). Este análisis arrojó como resultado la identificación de muchos péptidos que teóricamente esperábamos en las construcciones expresadas (véase Figs. 32 y 34), confirmando así la identidad de las proteínas producidas.

La expresión de las tubulinas en forma insoluble nos llevó a evaluar la solubilidad de los cuerpos de inclusión con urea, para recuperar las proteínas en forma soluble. Para esto se resuspendieron fracciones que contenían alfa tubulina insoluble en buffers con diferentes concentraciones de urea, las cuales luego de un tiempo de incubación en frío fueron centrifugadas, obteniéndose una solubilización parcial de la alfa tubulina con una concentración 8 M de urea, la máxima concentración ensayada (Fig. 18). Posteriormente se realizó el mismo procedimiento con la beta tubulina obtenida de forma insoluble, utilizando un buffer conteniendo 8 M urea, pero en este caso no se logró su solubilización (Fig. 19). Por esta razón se continuó trabajando con las muestras de alfa tubulina. En cuanto a la solubilización de la beta tubulina sería necesario ensayar condiciones de desnaturalización más drásticas, como podría ser analizar el efecto de otros agentes caotrópicos, como el cloruro de guanidinio. En trabajos ya citados ^{38,47,48}, la solubilización de esta proteína se lograba con urea 8 M, esto nos lleva a pensar que tal vez los aminoácidos correspondientes al sitio de corte de la proteasa TEV y el tag de histidinas puedan tener un efecto negativo sobre la solubilidad de la proteína expresada.

Habiendo obtenido alfa tubulina solubilizada con urea 8 M, se ensayaron condiciones para su purificación. Las condiciones evaluadas fueron dos, consiguiéndose los mejores resultados utilizando la resina Ni-NTA Agarose en una cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC). El protocolo utilizado se basó en el proporcionado por el fabricante ("Purification Procedure Under Denaturing Conditions"). A pesar de que la resina logró retener sin pérdidas a la alfa tubulina hasta la etapa de elución, y que muchas proteínas se eliminaron de la fracción en estas primeras etapas, las muestras obtenidas en las eluciones no son puras, ya que se observaron otras bandas aparte de la correspondiente a la tubulina (Figs. 21 y 22). Para obtener la proteína en forma más pura es posible que sean necesarias etapas de purificación posteriores, como podría ser gel filtración, para eliminar proteínas de peso molecular considerablemente mayor o menor. También se podría realizar una electroforesis en dos dimensiones de modo de determinar las condiciones de pH favorables para poder purificar las muestras mediante una cromatografía de intercambio iónico.

Los procedimientos de desalado, eliminación de la urea de las fracciones que contiene la proteína de interés, y de renaturalización, restablecimiento de la estructura terciaria de la proteína de interés, ambos necesarios para la obtención de proteínas que mantengan su actividad nativa, no fueron realizados. De cualquier manera en diversos trabajos publicados se han llevado a cabo procedimientos similares a los que hemos realizado y luego del proceso de desalado y de renaturalización, las tubulinas obtenidas mantenían su actividad y pudieron ser efectivamente utilizadas en ensayos de polimerización *in vitro* ^{38,47,48}.

A pesar de que el rendimiento de la expresión de las tubulinas no fue muy grande, las cantidades obtenidas podrían utilizarse para realizar varios ensayos de polimerización, ya que en estos se utilizan cantidades muy pequeñas de proteínas, variando desde 200 μg a 10 μg de cada una de las tubulinas (α y β) en cada ensayo según los datos obtenidos de los trabajos citados anteriormente. Por estas razones, y considerando que se puede mejorar el rendimiento del proceso con solo realizar más etapas de solubilización con urea 8 M, creemos que el proceso de expresión de tubulinas recombinantes es redituable como forma de obtención de materia prima para este tipo de ensayos, si se lograra obtener beta tubulina con un rendimiento similar al obtenido para la alfa tubulina.

8. Bibliografía.

1. Benavides, M. V., Sonstegard, T. S. & Van Tassel, C. Genomic Regions Associated with Sheep Resistance to Gastrointestinal Nematodes. *Trends Parasitol.* 32, 470–480 (2016).
2. Hoste, H. *et al.* Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet. Parasitol.* 186, 18–27 (2012).
3. Waller, P. J. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet. Parasitol.* 139, 1–14 (2006).
4. McKellar, Q. A. & Jackson, F. Veterinary anthelmintics: Old and new. *Trends Parasitol.* 20, 456–461 (2004).
5. Sykes, A. R. Parasitism and production in farm animals. *Anim. Prod.* 59, 155–172 (1994).
6. Suarez, V. H. & Cristel, S. L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. *Vet. Parasitol.* 144, 111–117 (2007).
7. Yin, F. *et al.* Population structure of *Haemonchus contortus* from seven geographical regions in China, determined on the basis of microsatellite markers. *Parasit. Vectors* 9, 586 (2016).
8. Bisset, S. a. Helminth parasites of economic importance in cattle in New Zealand. *New Zeal. J. Zool.* 21, 9–22 (1994).
9. Yin, F. *et al.* Genetic variability within and among *Haemonchus contortus* isolates from goats and sheep in China. *Parasit. Vectors* 6, 279 (2013).
10. Laing, R. *et al.* The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol.* 14, R88 (2013).
11. Talamini Do Amarante, A. F. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 20, 263–268 (2011).
12. Muhammad, A., Ahmed, H., Iqbal, M. N. & Qayyum, M. Detection of Multiple Anthelmintic Resistance of *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta* in Sheep and Goats of Northern Punjab, Pakistan. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 21, 389–395 (2015).
13. Emery, D. L., Hunt, P. W. & Le Jambre, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int. J. Parasitol.* 46, 755–769 (2016).
14. Kearney, P. E., Murray, P. J., Hoy, J. M., Hohenhaus, M. & Kotze, A. The ‘Toolbox’ of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What’ s in and what’ s out. *Vet. Parasitol.* 220, 93–107 (2016).

15. Edwards, E. E., Garner, B. C., Williamson, L. H., Storey, B. E. & Sakamoto, K. Pathology of *Haemonchus contortus* in New World camelids in the southeastern United States: a retrospective review. *J. Vet. diagnostic Investig.* 28, 105–9 (2016).
16. Fiel, C., Guzmán, M., Steffan, P., Prieto, O. & Bhushan, C. Comparative efficacy of trichlorphon and trichlorphon/ivermectin combination treatment against anthelmintic-resistant cattle nematodes in Argentina. *Parasitol. Res.* 109, 105–112 (2011).
17. Kaplan, R. M. & Vidyashankar, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70–78 (2012).
18. Helminto - Wikipedia, la enciclopedia libre.
19. Antihelmíntico - Wikipedia, la enciclopedia libre.
20. Kaplan, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. *Trends Parasitol.* 20, 477–481 (2004).
21. Le Jambre, L. F. Genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 6, 379–392 (1997).
22. Mottier, L. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Rev. Med. Vet. (Bogota)*. 82, 74–85 (2001).
23. Anderson, T. J. ., Blouin, M. S. & Beech, R. N. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv. Parasitol.* 41, 219–283 (1998).
24. Pellegrini, F. & Budman, D. R. Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest.* 23, 264–73 (2005).
25. Kaur, R., Kaur, G., Gill, R. K., Soni, R. & Bariwal, J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* 87, 89–124 (2014).
26. Lacey, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18, 885–936 (1988).
27. Bukhari, S. N. A., Kumar, G. B., Revankar, H. M. & Qin, H. L. Development of combretastatins as potent tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg. Chem.* 72, 130–147 (2017).
28. Downing, K. H. & Nogales, E. Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 16–22 (1998).
29. Akhmanova, A. & Hoogenraad, C. C. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr. Biol.* 25, R162–R171 (2015).

30. Bansal, Y. & Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic Med. Chem.* 20, 6208–6236 (2012).
31. Köhler, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 336–345 (2001).
32. Salahuddin, Shaharyar, M. & Mazumder, A. Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arab. J. Chem.* 10, S157–S173 (2017).
33. Bahmani, M. *et al.* A review on most important herbal and synthetic anthelmintic drugs. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, S29–S33 (2014).
34. Minoura, I. Towards an understanding of the isotype-specific functions of tubulin in neurons: Technical advances in tubulin expression and purification. *Neurosci. Res.* (2016). doi:10.1016/j.neures.2017.04.002
35. Fourest-Lieuvain, A. Purification of tubulin from limited volumes of cultured cells. *Protein Expr. Purif.* 45, 183–190 (2006).
36. Castoldi, M. & Popov, A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* 32, 83–88 (2003).
37. Lubega, G. W. & Prichard, R. K. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin from developing stages of thiabendazole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Biochem. Pharmacol.* 41, 93–101 (1991).
38. Lubega, G. W., Geary, T. G., Klein, R. D. & Prichard, R. K. Expression of cloned beta-tubulin genes of *Haemonchus contortus* in *Escherichia coli*: interaction of recombinant beta-tubulin with native tubulin and mebendazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 281–292 (1993).
39. Widlund, P. O. *et al.* One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Mol. Biol. Cell* 23, 4393–4401 (2012).
40. Minoura, I. *et al.* Overexpression, purification, and functional analysis of recombinant human tubulin dimer. *FEBS Lett.* 587, 3450–3455 (2013).
41. Shah, C., Xu, C. Z., Vickers, J. & Williams, R. Properties of Microtubules Assembled from Mammalian Tubulin Synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40, 4844–4852 (2001).
42. Vemu, A. *et al.* Structure and dynamics of single-isoform recombinant neuronal human tubulin. *J. Biol. Chem.* 291, 12907–12915 (2016).

43. Jang, M.-H. *et al.* Cloning, Purification, and Polymerization of *Capsicum annuum* Recombinant α and β Tubulin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1048–1055 (2008).
44. Koo, B.-S., Kalme, S., Yeo, S.-H., Lee, S.-J. & Yoon, M.-Y. Molecular cloning and biochemical characterization of alpha- and beta-tubulin from potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 47, 761–768 (2009).
45. Katzenback, B. A., Plouffe, D. A., Haddad, G. & Belosevic, M. Administration of recombinant parasite beta-tubulin to goldfish (*Carassius auratus* L.) confers partial protection against challenge infection with *Trypanosoma danilewskyi* Laveran and Mesnil, 1904. *Vet. Parasitol.* 151, 36–45 (2008).
46. Wampande, E. M., Richard McIntosh, J. & Lubega, G. W. Classical ligands interact with native and recombinant tubulin from *Onchocerca volvulus* with similar rank order of magnitude. *Protein Expr. Purif.* 55, 236–245 (2007).
47. Oxberry, M. E., Geary, T. G., Winterrowd, C. a & Prichard, R. K. Individual expression of recombinant alpha- and beta-tubulin from *Haemonchus contortus*: polymerization and drug effects. *Protein Expr. Purif.* 21, 30–9 (2001).
48. Oxberry, M. E., Gear, T. G. & Prichard, R. K. Assessment of benzimidazole binding to individual recombinant tubulin isotypes from *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 122, 683–7 (2001).
49. Ashraf, S. & Prichard, R. K. *Haemonchus contortus* microtubules are cold resistant. *Mol. Biochem. Parasitol.* 193, 20–22 (2014).
50. Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. 41, 207–234 (2005).
51. Vallejo, L. F. & Rinas, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.* 3, 11 (2004).

9. Anexo.

9.1. Marcadores de meso molecular.

9.1.1. ADN.

El marcador de peso molecular utilizado en las electroforesis en geles de agarosa fue el marcador 1Kb DNA Ladder (Cat #: N3232L), New England Biolabs.

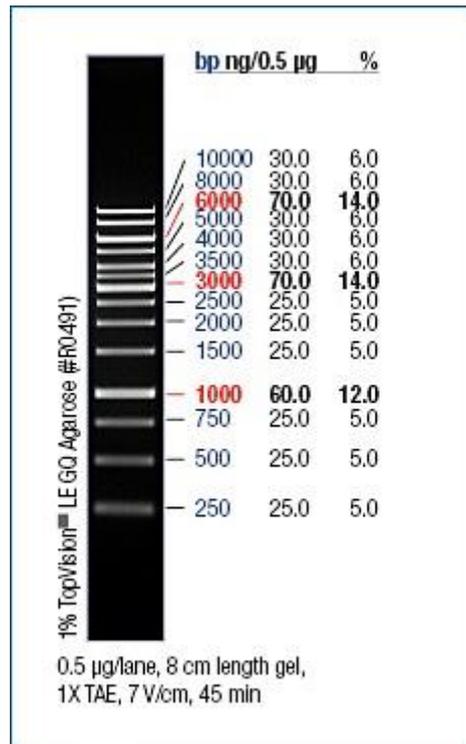


Figura 23: Marcador de peso molecular utilizado en las electroforesis en geles de agarosa. Marcador 1Kb DNA Ladder (Cat #: N3232L), New England Biolabs.

9.1.2. Proteínas.

Los marcadores de peso molecular utilizados en las electroforesis en geles de poliacrilamida fueron el marcador preteñido PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616) Thermo Scientific, y el marcador sin teñir PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

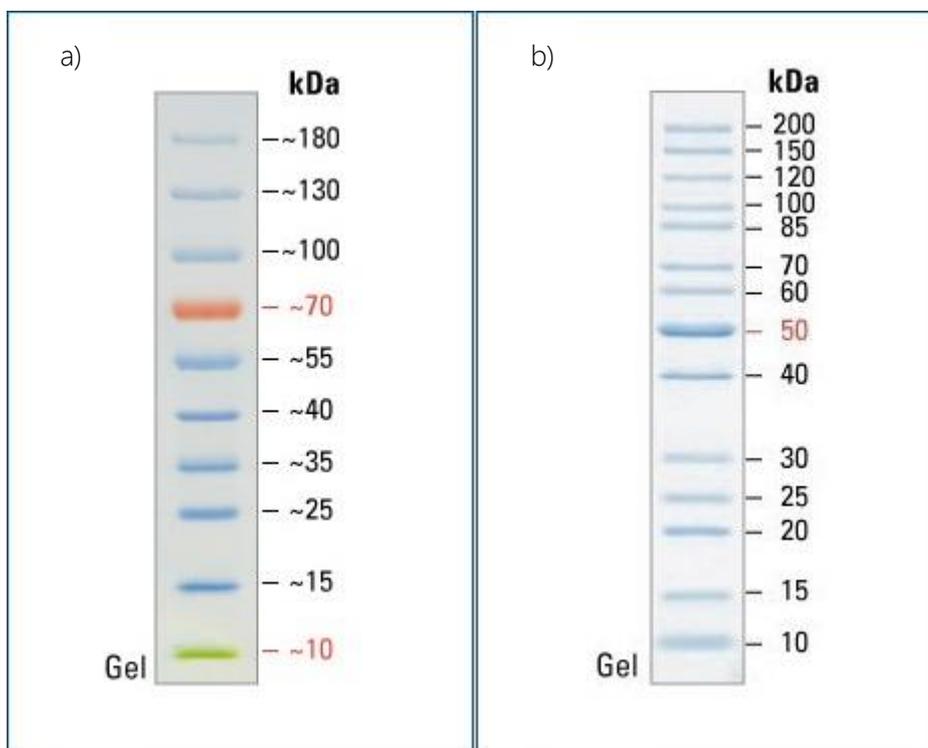


Figura 24: Marcadores de peso molecular utilizados en las electroforesis en geles de poliacrilamida. a) Marcador preteñido PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616) Thermo Scientific y b) Marcador sin teñir PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat #: 26614), Thermo Scientific.

9.2. Secuencias aminoacídicas correspondientes a las proteínas que fueron expresadas.

Las proteínas expresadas fueron dos: Alfa Tubulina de *H. contortus* (GenBank: L02108.1) y Beta Tubulina, *H. contortus* (GenBank: M76493.1). A las secuencias nativas de estas se le adicionaron un tag de seis histidinas y un sitio de corte de la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus) en su extremo amino terminal, y su secuencia fue optimizada para su expresión en *E. coli*.

```
M H H H H H H E N L Y F Q G M R E V I S I H I G Q A G V Q I G N A C W E L Y C L E H G I Q P D G Q M P S D K S L G G C D D S F S T F F S E T G S G R H
1 10 20 30 40 50 60 70

V P R A V M I D L E P T V I D E I R T G T Y R S L F H P E Q L I T G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I I D L T L D R I R R L A D N C T G L Q G F L
80 90 100 110 120 130 140 150

V F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K A K L E F S V P A P Q V S T A V V E P Y N S I L T T H T T L E H S D C S F M V D N E A I Y D
160 170 180 190 200 210 220

I C R R N L D I E R P S Y T N L N R L I G Q I V S S I T A S L R F D G A L N V D L T E F Q T N L V P Y P R I H F P L A T F S P V I S A E K A Y H E Q L
230 240 250 260 270 280 290 300

S V A E I T N M C F E P H N Q M V K C D P R H G K Y M A V C L L F R G D V V P K D V N A A I A T I K T K R S I Q F V D W C P T G F K V G I N Y Q P P T
310 320 330 340 350 360 370

V V P G G D L A K V P R A V C M L S N T T A I A E A W A R L D H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G
380 390 400 410 420 430 440 450

V D S L E D N G E E G D E Y
460 464
```

Figura 25: Secuencia de Alfa Tubulina de *H. contortus* (6-His-TEV-Alfa Tubulina) expresada durante el trabajo. Se observa en anaranjado el tag de histidinas, en azul el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV, y en verde la secuencia de la proteína nativa.

```

MHHHHHHEENLYFQGMREIVHVQAGQCNGIGSKFWEVISDEHGIQPDGTYKGESDLQLERINVYYNEAHGGKYVP
1      10      20      30      40      50      60      70

RAVLVDLEPGTMDLFRSPYGGQLFRPDNYVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDNVLVDVVRKEAEGCDC LQGFQLT
80      90      100     110     120     130     140     150

HSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMASFVSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDETFCIDNEALYDIC
160     170     180     190     200     210     220

FRTLKLTNPTYGDLNHLVSVTMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLVANNMVPFRLHFFMPGFAPLSAKGAQAYRASTV
230     240     250     260     270     280     290     300

AELTQQMFDAKNMAACDPRHG RYL TVAAMFRGRMSMREVD DQMM SVQNKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPRGL
310     320     330     340     350     360     370

KMAATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF LHWYTGEGMDEM EFTEAESNMNDLISEYQQYQEATADDMGDL
380     390     400     410     420     430     440     450

DAEGGEEAYPEE
460     462

```

Figura 26: Secuencia de Beta Tubulina de *H. contortus* (6-His-TEV-Beta Tubulina) expresada durante el trabajo. Se observa en anaranjado el tag de histidinas, en azul el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV, y en verde la secuencia de la proteína nativa.

9.3. Informes de Rare Codon Analysis Tool (GenScript) para las construcciones utilizadas.

Basic Information			
Host Organism	Escherichia		
Origin Organism	other		
CDS Length	1392		
Rare Codon Analysis Result			
	Actual Value	Ideal Value	Terms
CAI	0.66 ↓	0.8-1.0	<ul style="list-style-type: none"> A CAI of 1.0 is considered ideal. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene™ codon optimization tool can typically improve your sequence.
GC Content	49.77%	30%-70%	<ul style="list-style-type: none"> The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%.
CFD	8%	<30%	<ul style="list-style-type: none"> This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. GenScript's OptimumGene™ can give you the option to solve this problem.

Analysis of negative CIS elements and repeat sequences:

negative CIS elements	negative repeat elements
2	0

- Codon Codon Adaptation Index (CAI) of your gene is 0.66. A CAI of 1.0 is considered ideal while a CAI of >0.8 is rated as good for expression in the desired expression organism. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene™ codon optimization tool can typically improve your sequence to reach a CAI of higher than 0.8.
- The GC content of your gene is 49.77%. The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%. Any peaks outside of this range will adversely affect transcriptional and translational efficiency. OptimumGene™ can give you the option to solve this problem.
- The percentage of low frequency (<30%) codons based on your target host organism is 8%. This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery.
- GenScript's proprietary gene design and synthesis technology can improve all the essential parameters analyzed above, and other parameters involved in RNA secondary structure and the protein folding.

Figura 27: Informe de Rare Codon Analysis Tool (GenScript) para la construcción de Alfa Tubulina, en el que se detallan aquellos factores que podrían interferir con una buena expresión de la proteína de interés y que pueden ser modificados por la optimización de secuencia.

Basic Information			
Host Organism	Escherichia		
Origin Organism	other		
CDS Length	1389		
Rare Codon Analysis Result			
	Actual Value	Ideal Value	Terms
CAI	0.68 ↓	0.8-1.0	<ul style="list-style-type: none"> A CAI of 1.0 is considered ideal. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene™ codon optimization tool can typically improve your sequence.
GC Content	47.90%	30%-70%	<ul style="list-style-type: none"> The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%.
CFD	6%	<30%	<ul style="list-style-type: none"> This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. GenScript's OptimumGene™ can give you the option to solve this problem.

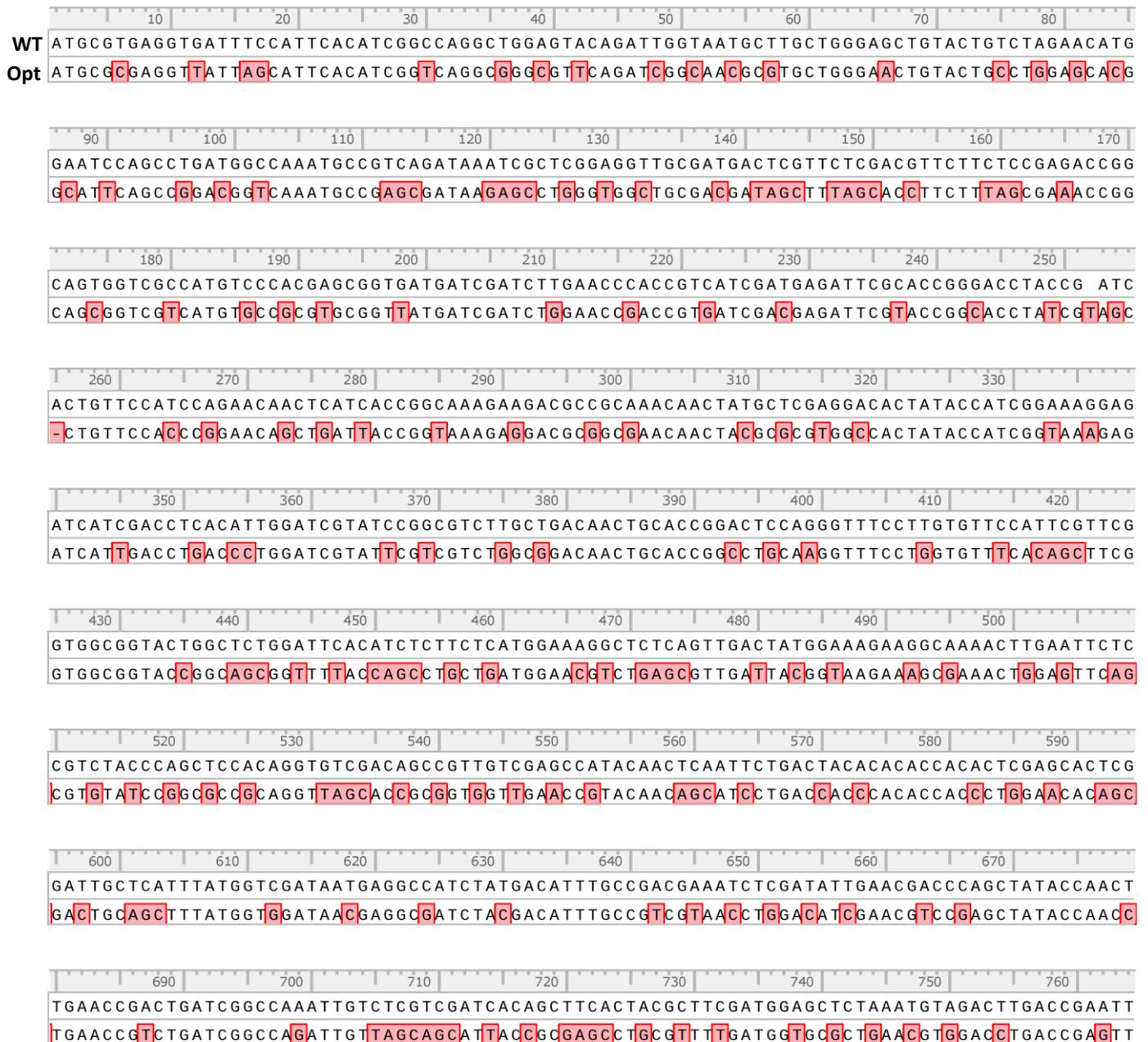
Analysis of negative CIS elements and repeat sequences:

negative CIS elements	negative repeat elements
1	0

- Codon Codon Adaptation Index (CAI) of your gene is 0.68. A CAI of 1.0 is considered ideal while a CAI of >0.8 is rated as good for expression in the desired expression organism. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene™ codon optimization tool can typically improve your sequence to reach a CAI of higher than 0.8.
- The GC content of your gene is 47.90%. The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%. Any peaks outside of this range will adversely affect transcriptional and translational efficiency. OptimumGene™ can give you the option to solve this problem.
- The percentage of low frequency (<30%) codons based on your target host organism is 6%. This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery.
- GenScript's proprietary gene design and synthesis technology can improve all the essential parameters analyzed above, and other parameters involved in RNA secondary structure and the protein folding.

Figura 28: Informe de Rare Codon Analysis Tool (GenScript) para la construcción de Beta Tubulina, en el que se detallan aquellos factores que podrían interferir con una buena expresión de la proteína de interés y que pueden ser modificados por la optimización de secuencia.

9.4. Alineamiento entre la secuencia nucleotídica salvaje (WT) y la optimizada de las proteínas expresadas.



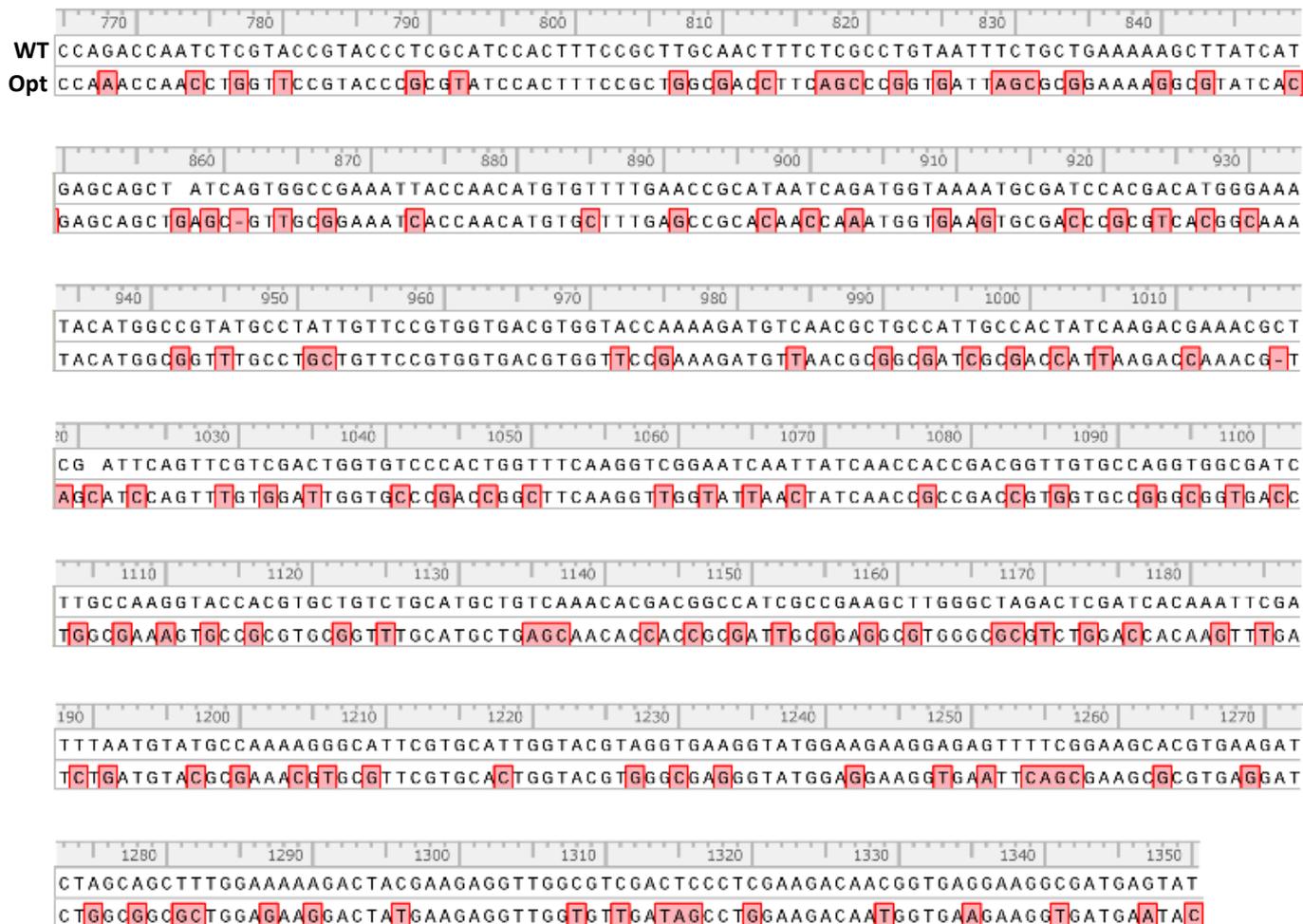


Figura 29: Alineamiento de la secuencia nucleotídica de alfa tubulina salvaje (WT) y la optimizada (Opt). En la figura se destacan en rojo aquellos nucleótidos modificados como consecuencia de la optimización para la expresión en *E. coli*.

WT ATGCGTGAAATCGTTTCATGTGCAAGCCGGTCAATGCGGCAACCAGATCGGATCAAAGTTCTGGGAAGTGATCTCTGATGAGCACGGTATCCAGCC
Opt ATGCGCGAGATTGTTCACTTCAAGCGGGTCAATGCGGCAACCAGATTGGTAGCAAGTTCTGGGAAGTGATCAGCGATGACACGGCATTCAGCC

100 110 120 130 140 150 160 170 180
CGATGGAACATACAAAGGAGA ATCAGATCTGCAATTAGAAAGGATCAATGTGTACTACAATGAAGCACATGGAGGCAAGTATGTTCCACGTGCT
GGACGGCACCTACAAAGGCGAGGC-GATCTGCAACTGGAACCTATCAACGTGTACTATAACGAGGGGACCGTGGCAAGTATGTTCCGCGGTGCG

200 210 220 230 240 250 260 270 280
GTTCTTGTGATCTCGAGCCTGGAACGATGGACTCCTTTTCGTTCTGGACCGTATGGACAGCTTTTCCGTCCAGATAATTACGTGTTTGGCCAGTC
GTGCTGGTTGATCTGGAAACGGGTACGATGGACAGCTTTTCGTTAGCGGTCCTGTAACGGCCAGCTGTTCCGTCCGGATAACTATGTTTGGTCAAAG

290 300 310 320 330 340 350 360 370
AGGAGCGGGTAACAATTGGGCGAAGGGCCACTATACTGAGGGAGCCGAGCTAGTTGATAACGTATTAGACGTTGTCCGCAAAGAAGCTGAAGGTT
CGGCGCGGGTAACAACCTGGGCGAAGGGTCACTACACCGAGGGTGGGAACTGGTGGACAACGTTCTGGATGTTGGTTCGTTAAAGAAGCGGGAAGGTT

390 400 410 420 430 440 450 460 470
GTGATTGCCTTCAGGGCTTCCAATTGACGCATTCACCTGGAGGAGGCACCTGGATCTGGAATGGGCACCTTTGTTAATTTCAAAAATTCGTGAAGAG
GCGACTGCCTGCAGGGCTTCCAACCTGACCCATAGCCTGGTGGTGGCAACGGCAGCGGTATGGGCAACCTGCTGATCAGCAAGATTTCGTGAGGAA

480 490 500 510 520 530 540 550 560
TACCCTGATAGAATTATGGCTTCGTTCTCCGTTGTTCCATCACCCAAGGTATCCGACACTGTCGTAGAACCTACAATGCTACCCTTTCCGTCCA
TACCCTGGATCGTATTATGGCGAGCTTTAGCGTGGTTCGAGCCGAAAGTGAGCGACACCGTGGTTGAGCCGTATAACCGGACCTGAGCGTGCA

580 590 600 610 620 630 640 650 660
TCAACTGGTAGAGAACACCGATGAAACATTCTGTATTGACAACGAAGCTCTGTATGATATCTGCTTCCGCACTTTGAAACTCACAATCCAACCT
CCAGCTGGTTGAGAACACCGACGAAACCTTCTGCACTGATAACGAAGCGCTGTACGACATTGCTTTCGTAACCTGAAAGCTGACCAACCCGACCT

670 680 690 700 710 720 730 740 750
ATGGAGATCTCAACCACCTTGTGCTGTGCACAATGCTGGTGTACAGACCTGCCTTCGATTCCCTGGACAGCTGAATGCTGATCTTCGCAAGTTA
ATGGTGATCTGAACCACCTGGTGAGCGTTACCATGAGCGGTGTACCACTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAGCTGAAAGCGGACCTGCGTAAACTG

770 780 790 800 810 820 830 840 850
GCCGTGAACATGGTTCCATTCCTCGTCTTCACTTCTTATGCCCGGTTTTGCTCCACGTCTGCAAAGGGTGCTCAAGCATATCGCGCTTCGAC
GGGTGAACATGGTTCCGTTCCCGCTCTGCACTTCTTATGCCGGTTTTGCGCGCTGAGCGGAAAGCGCGCAAGCGTACCTGCGGAGCAC

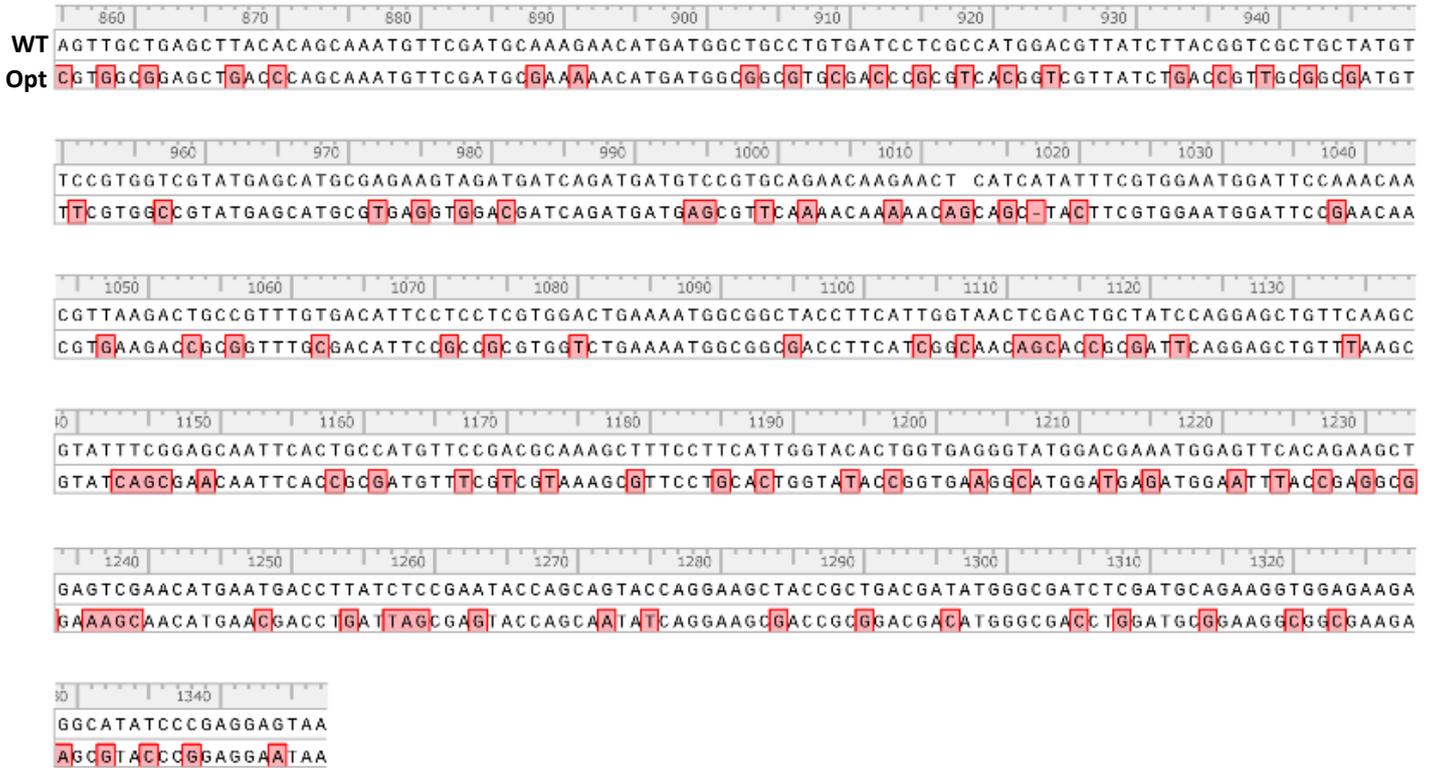


Figura 30: Alineamiento de la secuencia nucleotídica de beta tubulina salvaje (WT) y la optimizada (Opt). En la figura se destacan en rojo aquellos nucléotidos modificados como consecuencia de la optimización para la expresión en *E. coli*.

9.5. Análisis por espectrometría de masas de la alfa tubulina.

9.5.1. Espectro de masas.

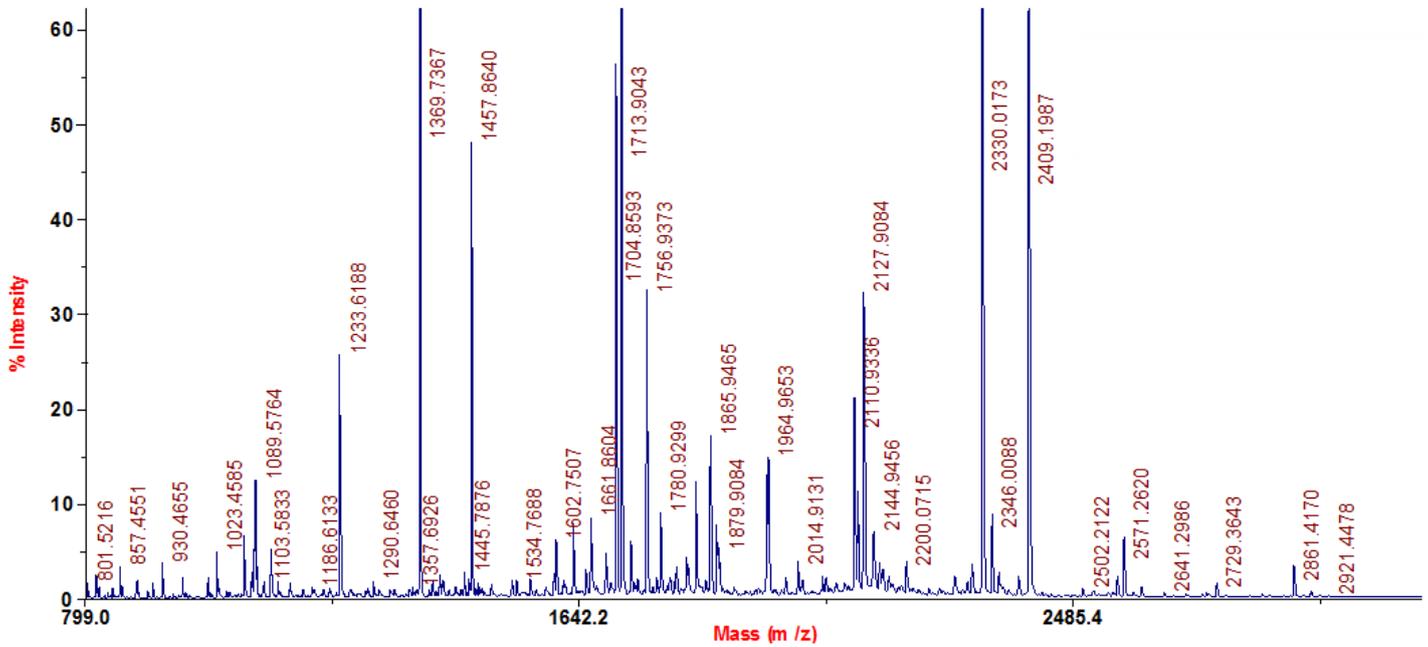


Figura 31: Alineamiento entre la secuencia nucleotídica de alfa tubulina salvaje (WT) y optimizada. En la figura se destacan en rojo aquellos nucleótidos modificados como consecuencia de la optimización para la expresión en *E. coli*.

9.5.2. Péptidos identificados en el análisis.

MHHHHHHE^NLY^{FQGM}REVISIHIGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMP^{SDK}SLGGCDDSFSTFFSETGSGRH
1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
VPRAVMIDLEPTVIDEIRTGT^{YRSLFHPEQLITGK}EDAANNYARGHYTIGKEIIDLTLDRI^{RR}LADNCTGLQGFL
80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
VFHSFGGGTGS^{GFTSLL}MERLSVDYGGKAKLEFSVYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCSFMVDNEAIYD
160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 |
ICRRNLDIERPSYTNLNRLIGQIVSSITASLRF^{DGALNVDL}TEFQTNLVPYPR^{IHFPLATFSPVISA}EKAYHEQL
230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
SVAEITNMC^{FEPHNQMVKCDPR}HGKYMAVCLLFRGDVVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTGFKVGINYPPT
310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 |
VVPGGDLAKVPRAVCMLSNTT^{AI}AEAWARLDHKFDL^{MYAKRA}FVHWYVGE^{GMEEGEF}SEAREDLAALEKDYEEVG
380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 |
VDSLEDNGEEGDEY
460 | 464 |

Figura 32: Secuencia aminoacídica de la construcción de alfa tubulina, en la que se destacan en rojo aquellos aminoácidos identificados en el análisis.

9.6. Análisis por espectrometría de masas de la beta tubulina.

9.6.1. Espectro de masas.

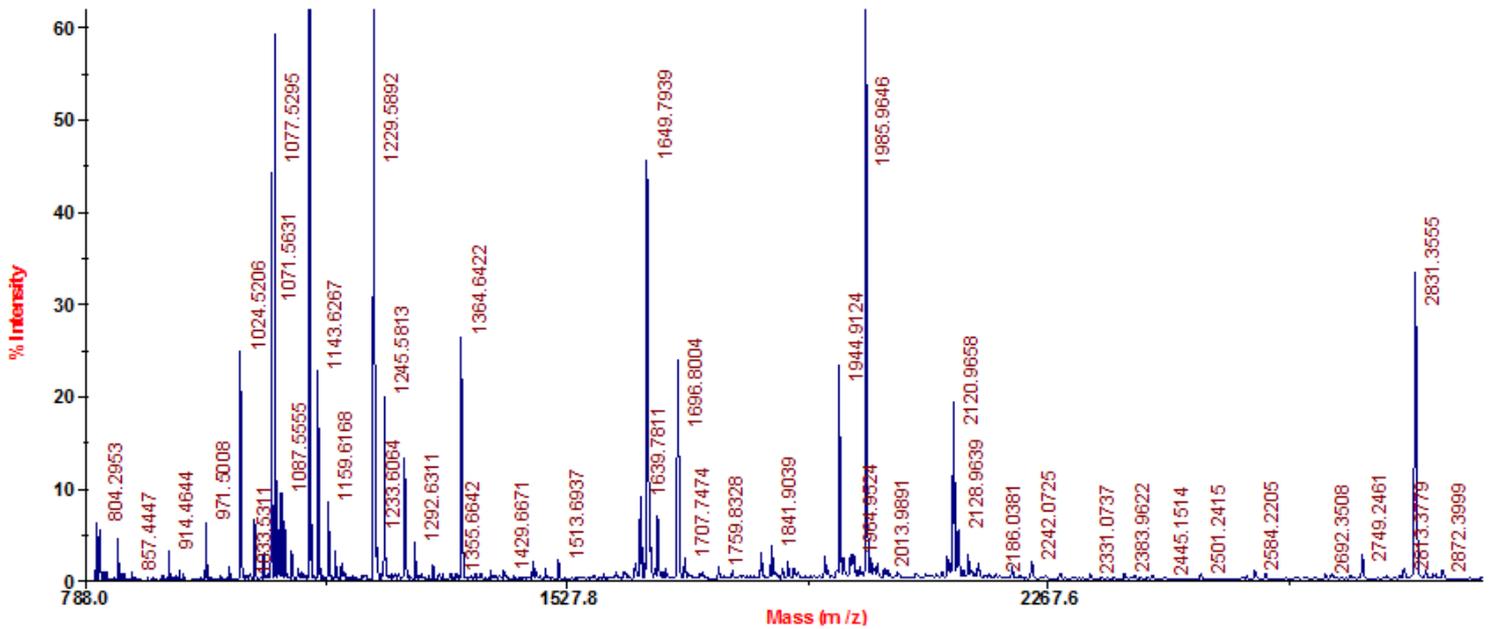


Figura 33: Alineamiento entre la secuencia nucleotídica de alfa tubulina salvaje (WT) y optimizada. En la figura se destacan en rojo aquellos nucleótidos modificados como consecuencia de la optimización para la expresión en *E. coli*.

9.6.2. Péptidos identificados en el análisis.

MHHHHHENLYFQGMREIVHVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGIQPDGTYKGESDLQLERINVYYNEAHGGKYVP
1| 10| 20| 30| 40| 50| 60| 70|

RAVLVDLEPGTMSDFRSGPYGQLFRPDNYVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDNVLDVVRKEAEGCDCLOGFQLT
80| 90| 100| 110| 120| 130| 140| 150|

HSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMASFVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETFCIDNEALYDIC
160| 170| 180| 190| 200| 210| 220|

FRTLKLTNPTYGDLNHLVSVTMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVFPFRLHFFMPGFAPLSAKGAQAYRASTV
230| 240| 250| 260| 270| 280| 290| 300|

AELTQQMFDAKNMMAACDPRHGRLTVAAMFRGRMSMREVDDQMMSVQKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPRGL
310| 320| 330| 340| 350| 360| 370|

KMAATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLISEYQQYQEATADDMGDL
380| 390| 400| 410| 420| 430| 440| 450|

DAEGGEEAYPEE
460| 462|

Figura 34: Secuencia aminoacídica de la construcción de beta tubulina, en la que se destacan en rojo aquellos aminoácidos identificados en el análisis.