



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



## **NUEVAS ESTRATEGIAS BASADAS EN POLIPÉPTIDOS TIPO ELASTINA E INTEÍNAS PARA LA REDUCCIÓN DE COSTOS ASOCIADOS A LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

Tesis para la obtención del título de Magister en Biotecnología  
del posgrado de Biotecnología – Universidad de la República Uruguay

**Lic. BQ Lucía Bassetti**

**Directora de Tesis:** Dra. Cecilia Abreu

**Co-director de Tesis:** Dr. Marcelo Comini

**Directora académica:** Dra. Andrea Villarino

**Tribunal de Tesis:**

Dra. Sonia Rodríguez

Dra. Sofía Horjales

Dra. Valeria Silva

**Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal – Institut Pasteur de Montevideo**

**Montevideo, Uruguay**

**Diciembre 2025**



## Agradecimientos

En primer lugar, a los integrantes del ProTeMCA por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio. Gracias por abrirme las puertas de su grupo de investigación, por compartir sus conocimientos y por confiar en mí. Haber formado parte de su equipo fue una experiencia valiosa.

Especialmente quisiera agradecer a Cecilia Abreu por su paciencia y constante apoyo que fue fundamental para que esta tesis llegara a concretarse. Agradezco su comprensión en los momentos en que las circunstancias personales hicieron más difícil el camino. Haber sido madre durante este proceso representó un gran desafío, y su empatía y flexibilidad fueron esenciales para poder continuar y culminar esta etapa.

También quiero agradecer especialmente a las integrantes de UBC y a Mariana Bonilla por su ayuda y compañerismo durante el trabajo experimental. Gracias por prestarme reactivos cuando los necesité, por darme una mano con los equipos, por compartir protocolos, por su buena disposición.

A la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas por su apoyo y asistencia en el análisis de espectrometría de masas.

Agradezco a la ANII por la beca de maestría nacional, al Posgrado en Biotecnología por el apoyo a tesistas y al IP-Montevideo por la beca Dra. Paulina Luisi.

A mis compañeros de trabajo, por el apoyo, el acompañamiento y el aguante durante todo este proceso. A Ramiro Pérez, especialmente, por su ayuda, y disposición con la predicción estructural realizada mediante AlphaFold.

A mi familia, especialmente a mis padres, por su apoyo incondicional y por ayudarme a cuidar de mi hijo durante este proceso.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una u otra forma, contribuyeron a que este trabajo fuera posible.

# Índice

<b>RESÚMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 <i>Leishmania tarentolae</i>: un sistema atractivo para la expresión de genes heterólogos.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.1 Generalidades y ciclo de vida de <i>L. tarentolae</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.2 Ventajas de la utilización de <i>L. tarentolae</i> como sistema de expresión.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.3 Modificaciones postraduccionales .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.4 Cultivo de <i>L. tarentolae</i> en su forma promastigote .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.5 Expresión de genes y vectores de expresión disponibles.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.6 Antecedentes en la expresión de proteínas en <i>L. tarentolae</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Purificación de proteínas recombinantes.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1 Antecedentes y métodos comúnmente utilizados .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2 Polipéptidos tipo elastina (ELP) como etiqueta de purificación no convencional.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3 Inteínas.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.4 Mecanismo de acción de las inteínas .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.5 Inteínas como herramienta para la purificación de proteínas.....</b>	<b>31</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Hipótesis .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Objetivo general .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3 Objetivos específicos .....</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Reactivos generales .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Generación de construcciones para expresión en <i>L. tarentolae</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.1 Eliminación del péptido señal en vectores de expresión .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Transfección de <i>L. tarentolae</i> y obtención de clones productores de bFSH / eGFP .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.1 Cultivo de <i>L. tarentolae</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2 Transfección y selección de clones .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 Expresión de proteínas de interés .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5 Optimización de la expresión .....</b>	<b>43</b>
<b>3.6 Extracción de proteínas citoplasmáticas totales de <i>L. tarentolae</i> Blecherry_Cito_E-eGFP .....</b>	<b>43</b>
<b>3.7 Purificación mediada por ELP e inteína .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7.1 Purificación en construcciones con ELP e inteína .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7.2 Purificación en construcciones con ELP, sin inteína .....</b>	<b>44</b>

3.7.3 Cálculos de porcentaje de recuperación .....	44
3.7.4 Optimización de resuspensión de fracción precipitada. ....	45
3.7.5 Adición de ELP exógeno como facilitador de precipitación.....	45
<b>3.8 Procedimientos analíticos para la detección de la bFSH y la eGFP recombinantes .....</b>	<b>46</b>
3.8.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	46
3.8.2 Western blot.....	46
3.8.3 Fluorimetría .....	47
3.8.4 Citometría de flujo .....	47
3.8.5 ELISA FSH.....	48
3.8.6 Espectrometría de masa .....	48
3.8.7 Herramientas informáticas .....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
4.1 Generación de construcciones de ADN para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a ELP_ΔI-CM.....	50
4.2 Generación de líneas de <i>L. tarentolae</i> expresando de manera constitutiva e inducible las construcciones recombinantes.....	55
4.2.1 Transfección de <i>L. tarentolae</i> LOC con vectores de expresión constitutiva .....	55
4.2.2 Transfección de <i>L. tarentolae</i> T7-TR con vectores de expresión inducible .....	57
4.3 Purificación de proteínas por el método de ciclado de transición inversa .....	61
4.3.1 Proteínas eGFP y FSH fusionadas a ELP_ΔI-CM secretadas al medio de cultivo .....	63
4.3.2 Proteína eGFP fusionada a ELP secretada al medio de cultivo .....	69
4.3.2.1 Optimización de las condiciones de expresión del E30-eGFP secretado.....	69
4.3.2.2 Precipitación del ELP en clon <i>L. tarentolae</i> Blecherry_E30-eGFP .....	70
4.3.2.3 Efecto de la temperatura y concentración salina en la precipitación de ELP .....	71
4.3.2.4 Identificación de la proteína purificada por espectrometría de masa .....	73
4.3.2.5 Efecto del número de ciclos de precipitación en el grado de pureza.....	74
4.3.2.6 Efecto del tiempo de precipitación en la recuperación de ELP .....	76
4.3.2.7 Uso de ELP exógeno como catalizador del proceso de precipitación.....	77
4.3.2.8 Resolubilización del ELP precipitado.....	78
4.3.3 Proteína eGFP fusionada a ELP y expresadas en citoplasma de <i>L. tarentolae</i> .....	80
4.3.3.1 Optimización de las condiciones de expresión del ELP-eGFP citoplasmático .....	81
4.3.3.2 Precipitación del ELP en clon <i>L. tarentolae</i> Blecherry_Cito_E-eGFP.....	83
4.3.4 Proteína bFSH fusionada a ELP secretada al medio de cultivo .....	85
4.3.4.1 Precipitación del ELP en clon <i>L. tarentolae</i> Blecherry_E-FSH .....	85

4.3.4.2 Uso de ELP exógeno como catalizador de la precipitación de E-FSH .....	87
<b>5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>95</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>96</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>105</b>

# RESÚMEN

La tecnología recombinante ha posibilitado la producción de un amplio repertorio de proteínas con aplicaciones tan variadas como la reproducción, los suplementos alimenticios y la medicina. Sin embargo, los altos costos asociados al proceso de producción y purificación de las proteínas recombinantes dificultan su uso extensivo en el campo veterinario. Para superar estas limitaciones es necesario desarrollar nuevas estrategias de producción y purificación de bajo costo. En este sentido, el sistema de expresión de proteínas heterólogas basado en el protozoario no patógeno *Leishmania tarentolae* tiene como ventajas ser un sistema económico que ofrece un perfil de glicosilación de proteínas similar al de células eucariotas superiores.

En trabajos previos utilizando este sistema, nuestro grupo produjo a altos niveles y bajo costo (comparado con los sistemas de expresión de células de mamífero) una glicoproteína de interés veterinario biológicamente activa. En este trabajo exploramos el uso de un polipéptido tipo elastina (ELP) como etiqueta de purificación no convencional, junto con la mini inteína ΔI-CM como herramienta de escisión, dada su propiedad de auto-escisión. Con diferentes combinaciones de estas secuencias y con la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) y una quimera de la hormona folículo estimulante bovina (bFSH) como proteínas modelo, se generaron una serie de vectores con el objetivo de estudiar su expresión y purificación en *L. tarentolae*.

La mini inteína ΔI-CM que utilizamos mostró una alta tasa de escisión prematura dentro de las células, lo que impidió su uso junto a la etiqueta de ELP. Sin embargo, partiendo de sobrenadantes de cultivo conteniendo la proteína ELP-eGFP, fue posible aplicar un método de purificación sencillo, basado en agregación por aumento de temperatura y concentración salina. Esta metodología permitió la purificación de la proteína de fusión expresada en *L. tarentolae*, con un porcentaje de recuperación de 17% y con elevados niveles de pureza, luego de optimizar las condiciones de precipitación y la resolubilización.

Si bien los rendimientos de purificación con este sistema deben ser optimizados, las herramientas aquí desarrolladas pueden ser de utilidad general en biología molecular, biotecnología, en el área veterinaria y farmacéutica, así como en otras aplicaciones que demanden altos niveles de pureza con una relación satisfactoria de costo-beneficio.

# 1. INTRODUCCIÓN

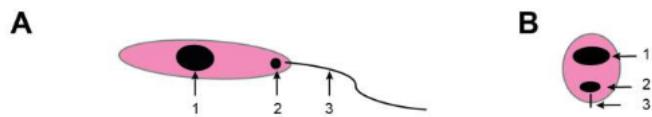
## 1.1 *Leishmania tarentolae*: un sistema atractivo para la expresión de genes heterólogos

En la actualidad existen numerosas plataformas para la expresión de proteínas recombinantes basadas tanto en organismos procariotas como eucariotas. Entre ellos se destacan bacterias, levaduras, células de mamíferos e insectos, animales transgénicos y plantas, entre otros. En las últimas décadas ha adquirido especial interés el empleo del protozoario *Leishmania tarentolae* como huésped para la expresión de proteínas recombinantes. Este sistema resulta atractivo no solo por no ser patogénico para mamíferos, sino también por su bajo costo de cultivo y por permitir altos niveles de expresión de genes heterólogos y un perfil de glicosilación de proteínas similar al de células eucariotas superiores (1,2).

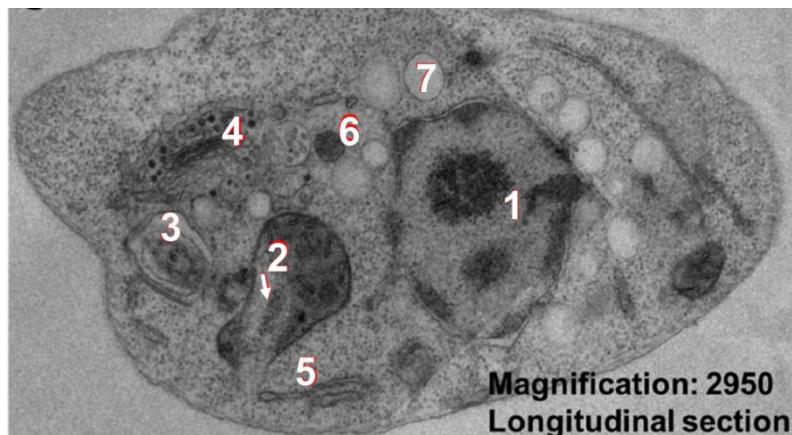
### 1.1.1 Generalidades y ciclo de vida de *L. tarentolae*

Se trata de un protozoario perteneciente al género *Leishmania*, subgénero *Sauroleishmania* del orden de Tripanosomátidos y la clase de los Kinetoplastidos. Este protozoario no infecta mamíferos y tiene como huésped principal los lagartos, principalmente de la especie *Tarentolae annulae*. Fue aislado por primera vez de un geco de la especie *Tarentola mauritanica* en 1921 (1,2).

El ciclo de vida de las especies de *Leishmania* alterna entre dos morfologías, la forma intracelular amastigota no flagelada, en el hospedero definitivo vertebrado y la forma promastigota flagelada en el hospedero intermediario, insecto del género *Sergentomyia* (1,3) (**Figura 1**). Su morfología varía desde una estructura redondeada hasta una alargada de 4-12  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,5-3  $\mu\text{m}$  de ancho (4). Éstos microorganismos poseen un núcleo relativamente grande y se caracterizan por poseer una región que contiene ADN mitocondrial condensado en su única mitocondria, el cual se denomina kinetoplasto (1) (**Figura 2**). Su genoma tiene un tamaño de 30 millones de pares de bases, organizado en 36 cromosomas (5).

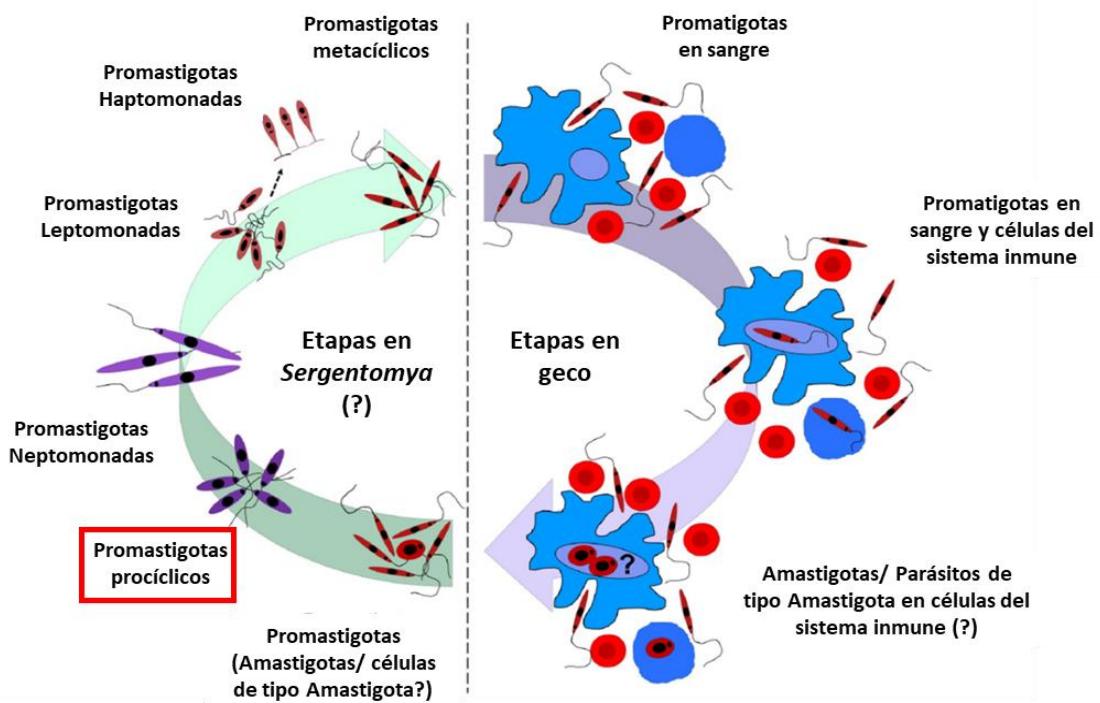


**Figura 1. Morfologías principales del ciclo de vida de *L. tarentolae*. A) Promastigote y B) amastigote.** Núcleo (1), kinetoplasto (2) y flagelo (3). Editada de Klatt 2013 (4).



**Figura 2. Microscopía electrónica de transmisión de *L. tarentolae* en su forma promastigota.** Sección longitudinal x 2,950. Núcleo celular (1), kinetoplasto dentro de su única mitocondria (2), flagelo (3), aparato de Golgi (4), retículo endoplasmático rugoso (5), glicosoma (6) y acidocalcisoma (7). Editada de Klatt 2019 (1).

Cuando el insecto succiona sangre de un animal infectado ingiere el parásito en su forma amastigota, que posteriormente se transforma en promastigota procíclico, móvil y flagelado que coloniza el intestino medio y/o posterior del insecto. A los días de la ingesta, cuando el parásito vuelve a migrar hacia la faringe y probóscide de la mosca, se encuentra la forma infectiva promastigota metacíclico, la cual se retransmitirá a otros hospedadores vertebrados cuando el vector se alimente nuevamente e inocule al parásito. En el hospedero definitivo, las células del sistema fagocítico mononuclear, principalmente los macrófagos, fagocitan la forma promastigota metacíclica. Estos son capaces de sobrevivir en el fagolisosoma, transformarse en amastigotes y multiplicarse hasta producir la lisis celular. Cuando esto ocurre, los amastigotes son fagocitados por otros macrófagos, expandiéndose la infección (**Figura 3**) (1).



**Figura 3. Ciclo de vida de *L. tarentolae*.** La mosca de la arena (*Sergentomyia*) se alimenta de sangre de un geco e ingiere promastigotas y algunos amastigotas de *L. tarentolae*. Aunque no ha sido estudiado en detalle, se asume que los promastigotas (y amastigotas) de *L. tarentolae* sufren varias transformaciones en el interior del insecto, esto incluye pasaje por estadios de procíclico, nectomonada, leptomonada, haptomonada y, posteriormente, promastigotas metacíclicos. Los promastigotas metacíclicos son altamente infectivos para el geco. Una vez introducidos en este anfibio, los promastigotas circulan libres en la sangre y una fracción es fagocitada por células inmunitarias (monocitos y macrófagos). Los promastigotas fagocitados pueden volver a transformarse en amastigotas, y el ciclo de vida de este parásito se repite. Las células inmunitarias se representan en azul y los eritrocitos en rojo. El recuadro rojo indica la forma del parásito que se cultiva para ser utilizado como sistema de expresión de proteínas recombinantes. Editada de Klatt 2019 (1).

La capacidad de *L. tarentolae* de infectar mamíferos es un tema controversial, dado que la presencia de este microorganismo ha sido detectada recientemente en humanos (6) y perros de refugio (7) en el sur de Italia, mediante métodos serológicos y moleculares. Sin embargo, el consenso general es que *L. tarentolae* no es patogénico para los mamíferos. Está descrito que

varios genes que se expresan intracelularmente en la forma amastigota de las especies de *Leishmania* patógenas para mamíferos, no se encuentran en *L. tarentolae*, dando una posible explicación al por qué *L. tarentolae* sería incapaz de replicarse eficientemente en macrófagos de mamíferos y es más sensible a la lisis mediada por el complemento (5, 8).

### **1.1.2 Ventajas de la utilización de *L. tarentolae* como sistema de expresión**

Si bien en la actualidad se dispone de una gran variedad de sistemas de expresión de proteínas, los sistemas procariotas, como *Escherichia coli*, son los de primera elección, no solo por su forma de cultivo sencilla y económica, sino también por el alto rendimiento del producto recombinante que alcanzan (4). Sin embargo, los sistemas basados en bacterias presentan limitaciones importantes para la expresión de proteínas eucariotas ya que a menudo, no logran producir el plegamiento correcto de las mismas, dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión (agregados proteicos). Además, las bacterias carecen de los mecanismos necesarios para realizar modificaciones postraduccionales, las cuales son de suma importancia para la función de muchas proteínas eucariotas. Por el contrario, los sistemas de expresión basados en las células de mamíferos, garantizan que ocurran complejas modificaciones postraduccionales en la proteína de interés. Sin embargo, son sistemas que requieren métodos complejos y costosos para su cultivo, equipamiento especial y brindan bajos rendimientos del producto recombinante. Idealmente, un sistema de expresión de proteínas debería producir modificaciones postraduccionales complejas, cultivarse de forma sencilla y además permitir obtener rendimientos elevados del producto.

En este sentido el protozoario no patógeno *L. tarentolae* se ha convertido en un sistema atractivo para la expresión de proteínas, debido a las diversas ventajas que ofrece. Entre ellas destacan, su bajo costo de cultivo, el nivel reducido de bioseguridad requerido (ya que no infecta humanos ni animales), altos niveles de expresión, la facilidad de adaptarse a producción a gran escala y la disponibilidad de sistemas comerciales para su transfección. Además, este sistema proporciona muchos de los procesos postraduccionales de eucariotas superiores, incluida la N-glicosilación, fosforilación, acetilación y prenilación. En particular, presenta patrones de glicosilación proteica

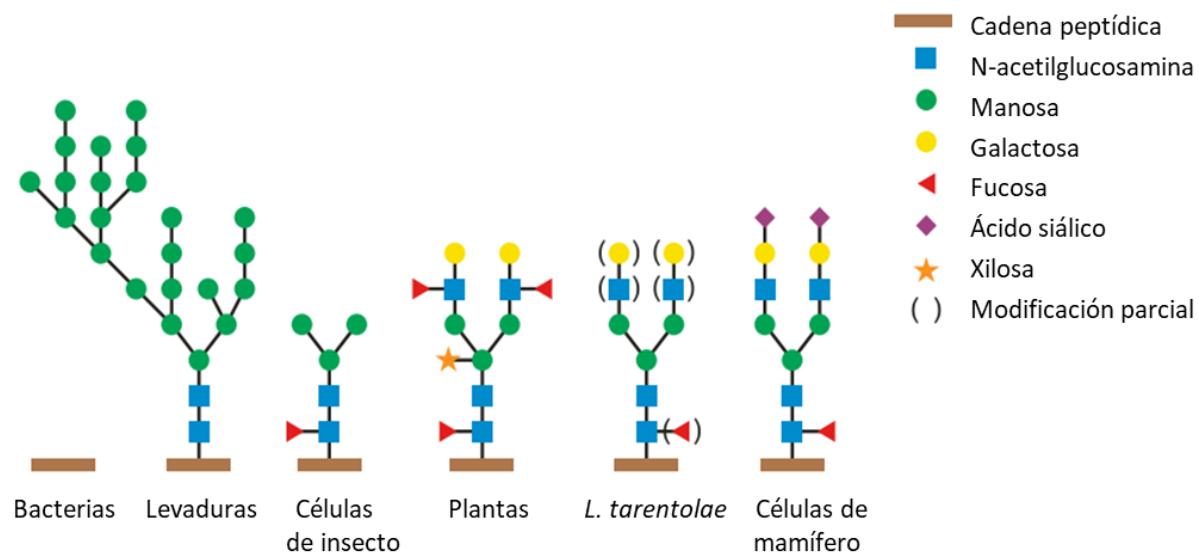
más similar al de células de mamíferos y vertebrados superiores que al producido por otras células eucariotas como las levaduras o las células de insecto (2,9).

### **1.1.3 Modificaciones postraduccionales**

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas son de gran importancia, no solo por su relación con la actividad de las mismas, sino también por otorgar estabilidad y propiedades inmunológicas.

En particular la glicosilación es fundamental en las proteínas destinadas a uso en mamíferos porque suele influir o determinar varias de sus propiedades farmacológicas, como la estabilidad, la solubilidad/biodisponibilidad, la actividad *in vivo*, la farmacocinética y la inmunogenicidad (1, 9). Los Trypanosomátidos son ricos en glicoproteínas, las cuales representan más de un 10% del total de sus proteínas (2). *L. tarentolae* se ha utilizado exitosamente para producir glicoproteínas humanas con N-glicanos biantenarios complejos como en la Eritropoyetina (EPO) y se ha visto que es capaz de O-glicosilar de manera incompleta (1,10).

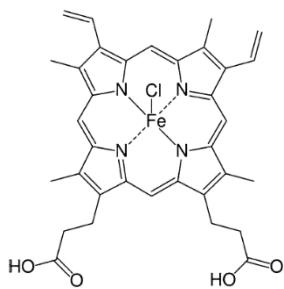
Como se muestra en la **Figura 4**, los patrones de N-glicosilación de *L. tarentolae* son muy similares a los producidos por células de mamíferos. Se ha demostrado que *L. tarentolae* produce N-glicanos biantenarios de tipo eucariota superior con alta homogeneidad (4). Una de las limitaciones que poseen estos protozoarios es no contar con enzimas para la biosíntesis del ácido siálico, lo que condiciona la falta de sialilación terminal de las glicoproteínas. Otra de las modificaciones postraduccionales que *L. tarentolae* es capaz de realizar es la fosforilación, de gran importancia debido a que muchos procesos celulares son regulados por eventos de fosforilación y defosforilación (2,4).



**Figura 4. Patrones de N-glicosilación de diferentes organismos.** Glicoproteínas expresadas en *L. tarentolae* son similares a las de células de mamíferos. Editada de Jena Bioscience (11).

#### 1.1.4 Cultivo de *L. tarentolae* en su forma promastigote

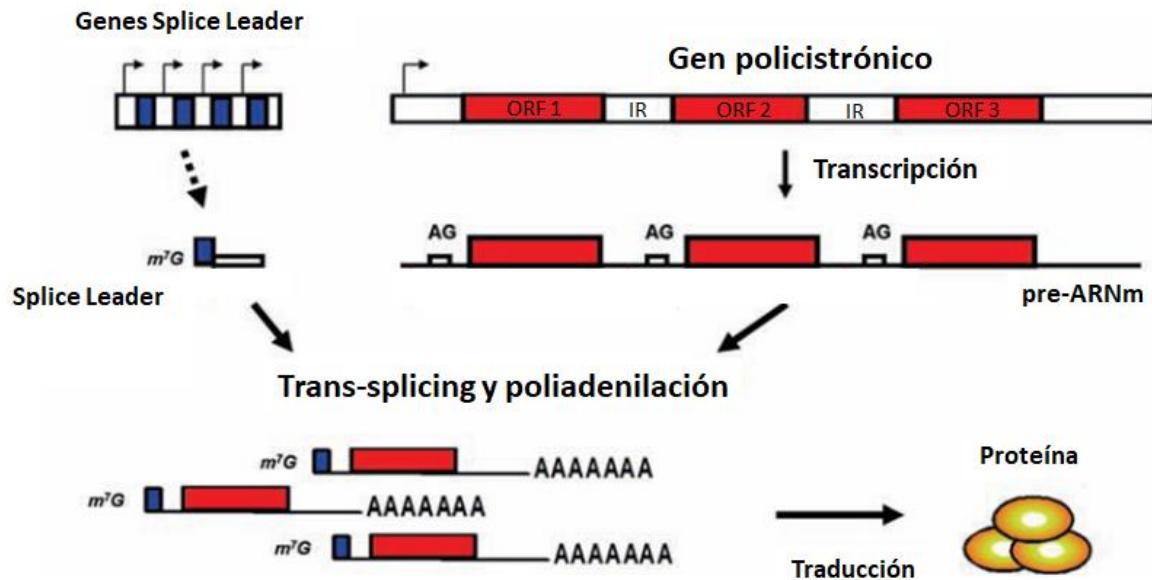
La forma de este protozoario que se cultiva *in vitro* es la promastigote. El mismo se divide por fisiología simple cada 4-6 horas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno. Los cultivos en suspensión crecen en oscuridad y agitación bajo condiciones aeróbicas a una temperatura de 26°C, óptima para su crecimiento en el hospedero intermedio, insecto flebótomo (1). *L. tarentolae* crece en medios definidos químicamente, o en medios complejos, principalmente infusión cerebro corazón (BHI), donde se obtienen las mayores densidades celulares (2). Los medios de cultivo deben ser suplementados con hemina (Figura 5), porfirina que contiene hierro, esencial para su crecimiento y supervivencia ya que estos parásitos no poseen vía de síntesis del grupo hemo. Dependiendo del medio de cultivo y en condiciones óptimas se alcanzan densidades celulares máximas de  $400 \times 10^6$  células/ml. A diferencia de los cultivos de células de mamíferos, para el crecimiento *in vitro* de los promastigotes no se requiere de una atmósfera con CO<sub>2</sub> ni suplementación con suero fetal bovino, lo cual reduce ampliamente los costos de cultivo. Además de crecer en medio líquido, estos parásitos también crecen en medio semi-sólido (placas de agar BHI), lo cual permite la selección clonal luego de la transfección y presión con antibióticos de selección (1, 2, 12).



**Figura 5. Molécula de hemina.** Es un cofactor esencial de numerosas proteínas con importantes funciones metabólicas (respiración y síntesis proteica). Imagen de Basile 2009 (2).

### 1.1.5 Expresión de genes y vectores de expresión disponibles

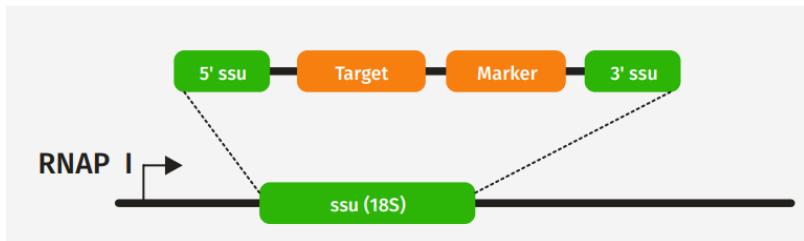
En cuanto a la regulación de la expresión génica, *L. tarentolae* presenta diferencias respecto a la regulación génica de otros eucariotas. En primer lugar, tanto en *L. tarentolae* como en todos los *Tripanosomátidos*, los genes no contienen intrones y la transcripción es policistrónica. El procesamiento postranscripcional del ARN pre-mensajero se realiza mediante reacciones de trans-*splicing* y poliadenilación dentro de las regiones intergénicas. El trans-*splicing* añade una secuencia de ARN de 39 nucleótidos, “Splice Leader” o mini-exon (SL) al extremo 5’ del ARN mensajero (ARNm), señal necesaria para el transporte, estabilidad y traducción eficiente (13,14). Los sitios de adición del SL son regiones conservadas de dinucleótido AG rodeada de tramos ricos en polipirimidinas. Las señales reguladoras necesarias para el procesamiento del ARNm son proporcionadas por regiones intergénicas no traducidas (UTR) o regiones intergénicas (IR) que flanquean los marcos abiertos de lectura (ORF) (14). En la **Figura 6** se muestra un esquema de la transcripción en *L. tarentolae*.



**Figura 6. Transcripción en *L. tarentolae*.** La transcripción en *L. tarentolae* es policistrónica, no hay intrones y no hay reacciones tipo *cis-splicing*. El procesamiento de los pre-ARNm ocurre por reacciones de *trans-splicing* y poliadenilación dentro de las regiones intergénicas. Editada de Klatt 2013 (4).

La empresa Jena Bioscience comercializa distintos sistemas de expresión de proteínas heterólogas en *L. tarentolae*, los cuales se conocen con el término LEXSY (11). Estos sistemas se encuentran disponibles en dos configuraciones, constitutiva e inducible, y permiten la expresión de proteínas de forma intracelular o secretadas al medio de cultivo. La expresión heteróloga en *Leishmania* se puede lograr a través de secuencias codificantes extracromosomales (episomal) y cromosómicas integradas (13). Se han desarrollado vectores de expresión integrativos constitutivos, integrativos inducibles y episomal inducible (1,2). Los sistemas de expresión inducibles resultan especialmente útiles cuando se presume o ha sido demostrado que las proteínas heterólogas son tóxicas o interfieren con la fisiología del hospedador (14).

En el sistema de expresión integrativo constitutivo el vector de expresión se integra por recombinación homóloga al locus del ARN ribosomal 18S (*ssu*) (Figura 7). *ssu* es un locus repetido del genoma de *L. tarentolae* con una tasa elevada de transcripción por parte de la ARN polimerasa I (11,14).

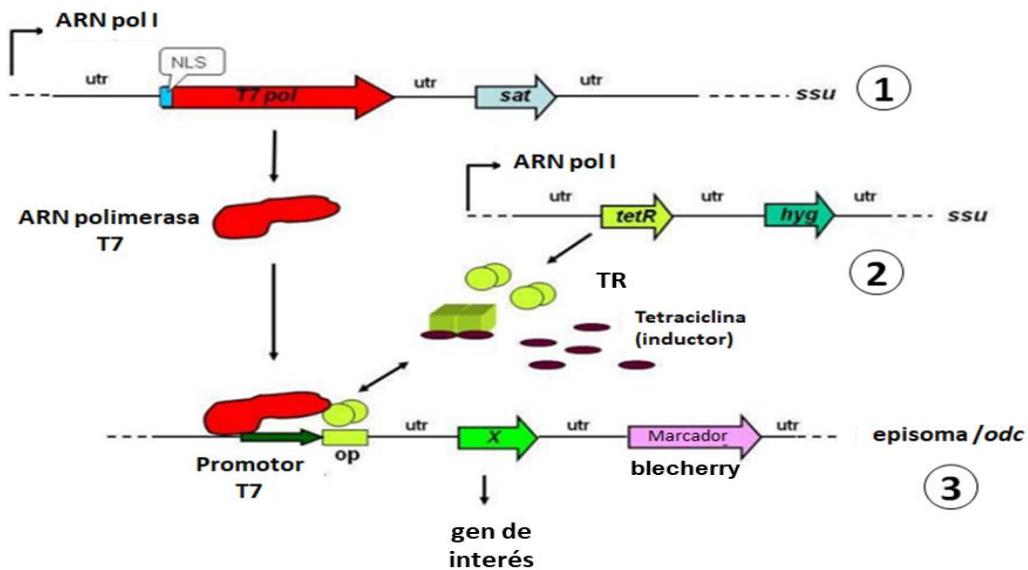


**Figura 7. Vector de expresión constitutiva.** Luego de la transfección, el vector linealizado que contiene el gen a expresar se integra en el locus que contiene las secuencias de los ARNr 18S (*ssu*) mediante recombinación homóloga. Los vectores comerciales ofrecen 4 opciones diferentes de genes de resistencia a antibióticos (Marker) para facilitar la selección post-transfección. Imagen de Jena Bioscience (11).

El vector para la expresión de genes contiene una señal para el *trans-splicing* del ARNm, seguido del gen de interés. La traducción se puede mejorar si el gen de interés contiene una secuencia 3'UTR de un gen con elevada expresión. Como la regulación de la expresión de proteínas ocurre de manera post-transcripcional a través de las UTR, es importante la elección adecuada de las mismas para asegurar una expresión eficiente. Los vectores pLEXSY contienen tres UTR optimizadas, utr1 derivada de la región intergénica del gen de adenina fosforribosiltransferasa de *L. tarentolae*; utr2 derivada de la región intergénica del grupo de calmodulina de *L. tarentolae* que contiene un cluster de tres genes de calmodulina dispuestos en tandem, y la utr3 de la región intergénica del gen de dihidrofolato timidilato reductasa sintasa de *L. major*. Los tres utrs se encuentran flanqueando el gen de interés y el marcador de selección, y proveen la señal de *trans-splicing* para un procesamiento post-transcripcional eficiente del ARNm (14).

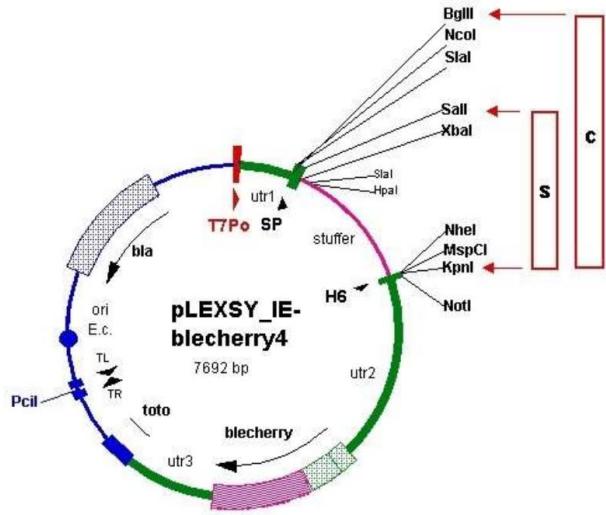
En los sistemas de expresión inducible el gen de interés se encuentra bajo el control del promotor del bacteriófago T7, con un operador de tetraciclina (TET). Además, se emplea una cepa de *L. tarentolae* genéticamente modificada (denominada T7-TR), que expresa de forma constitutiva la T7 ARN polimerasa (T7 ARN pol) y una proteína represora de TET (TR), que al unirse al operador TET del vector de expresión inhibe la transcripción del gen. De este modo, la expresión de la proteína recombinante en el sistema *L. tarentolae* T7-TR/pLEXSY es inducida por la adición de tetraciclina al medio de cultivo, que se une al represor TR activando la transcripción del gen por

la ARN polimerasa T7 (14). El *trans-splicing*, al desacoplar la transcripción de la traducción, permite que el pre-ARNm sea transcripto por la ARN pol I o polimerasas externas como las del bacteriófago T7. En el caso del sistema de expresión inducible integrativo, el gen de interés de integra en el locus cromosómico de la ornitina descarboxilasa (*odc*), mientras que en el sistema de expresión inducible episomal, los vectores de ADN no se integran al genoma, sino que se mantienen como elementos extracromosómicos que se replican como episomas (1,13,14). En la **Figura 8** se muestra un esquema del funcionamiento del sistema de expresión inducible LEXSY.



**Figura 8. Sistema de expresión inducible LEXSY.** El gen de interés (*X*) se encuentra dentro del vector de expresión bajo el control del promotor T7 y el operador TET (*op*). *L. tarentolae* T7-TR modificada genéticamente para expresar de forma constitutiva la ARN polimerasa T7 (1) y la TR (2). El gen *blecherry* facilita la selección mediante la adición del antibiótico bleomicina, y permite seleccionar los mejores clones productores y monitorear la inducción mediante la fluorescencia de la proteína Cherry. Las utr que flanquean al gen de interés y el marcador, proveen las señales de *splicing* para el procesamiento post transcripcional del ARNm en *L. tarentolae*. *Ssu* es el locus del ARNr 18S donde se integran los genes de la T7 ARN pol y el TR. *Odc* es el locus de la ornitina decarboxilasa donde se integra el vector inducible, de ser integrativo (3). Editada de Jena Bioscience (15).

*Leishmania* tiene la capacidad intrínseca para amplificar las moléculas de ADN circulares episomales manteniendo el ADN exógeno durante muchas rondas de división celular, logrando una expresión sostenida de los genes (13). En los sistemas episomales, los vectores circulares están diseñados de tal manera que la secuencia que codifica para proteínas está flanqueada por dos secuencias UTR, que albergan señales de trans-splicing y poliadenilación (13). En estos sistemas los números elevados de copias de plásmidos por célula llevan a niveles de expresión más altos en comparación con los sistemas integrativos. Sin embargo, la pérdida gradual del plásmido durante la división celular en los vectores episomales, hacen que sea necesario incluir genes de resistencia a antibióticos y que los cultivos celulares son mantenidos en medios de cultivo suplementados con los mismos. Esto hace que los sistemas integrativos, en los cuales se puede prescindir de marcadores de selección una vez seleccionado los clones, sean ventajosos, especialmente cuando la presencia del gen de resistencia a antibióticos es problemática o el antibiótico inhibe el crecimiento o la síntesis de proteínas (13). En la **Figura 9** se muestra el vector de expresión inducible episomal.



**Figura 9. pLEXSY IE-blecherry, vector inducible episomal para la expresión en *L. tarentolae* T7-TR.** Utr 1-3 son las regiones no traducidas, optimizadas, que contienen las señales de *splicing* para el procesamiento del ARNm para la expresión del gen de interés. SP: péptido señal de *L. mexicana*. H6: repetidos de Histidina. TL-TR: son extremos teloméricos para la replicación episomal, liberados una vez que el vector es linealizado por la enzima *Pcil*. T7Po es el promotor para la T7 ARN polimerasa, unido al operador. toto es el repetido en tandem terminador de la transcripción T7. Se muestran distintas enzimas de restricción que permiten estrategias de clonado alternativas para lograr que la proteína de interés permanezca en el citosol (c) o sea secretada (s). Imagen de Jena Bioscience (15).

En *L. tarentolae* la expresión de proteínas heterólogas se produce de forma intracelular y las mismas pueden ser mantenidas allí o ser secretadas al medio. Para que una proteína pueda ser secretada al medio extracelular, ésta debe poseer secuencias de señalización que dirijan su procesamiento post-traduccional. Dado que *L. tarentolae* secreta bajos niveles de proteínas endógenas, y el medio de cultivo tiene bajo contenido proteico, una proteína heteróloga secretada puede representar la mayoría de las proteínas totales del medio extracelular. Por lo tanto, la expresión de proteínas de secreción constituye una estrategia valiosa para separar la proteína expresada del resto de las proteínas celulares (2). Los vectores pLEXSY permiten incorporar una señal de secreción de la fosfatasa ácida de *L. mexicana* (lmsap) o de la estafiloquinasa del fago 42D de *Staphylococcus aureus* a la secuencia de interés (2,16).

### **1.1.6 Antecedentes en la expresión de proteínas en *L. tarentolae***

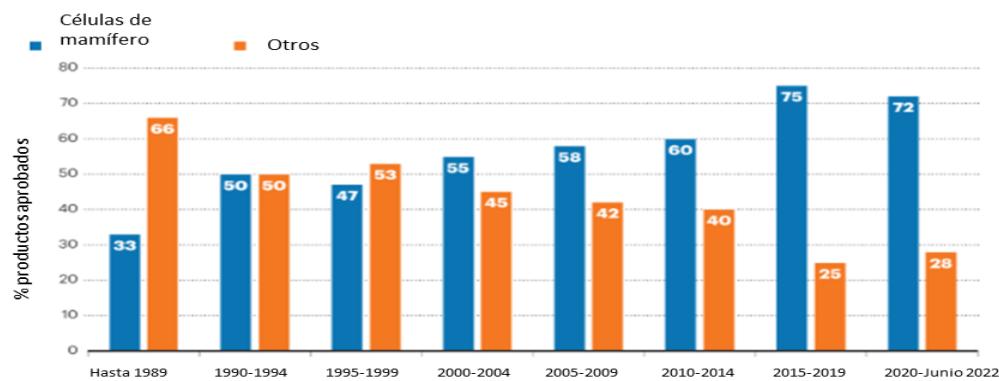
Utilizando el sistema de *L. tarentolae* se han logrado expresar numerosas proteínas con diversos plegamientos estructurales y funciones que fueron procesadas de forma similar a la nativa y biológicamente activas. Entre ellas, se encuentran proteínas oligoméricas con más de una cadena polipeptídica, como la laminina humana 332 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ), una glicoproteína heterotrimérica (17). La eritropoyetina humana (EPO), usada como modelo de estudio de la glicosilación producida por *L. tarentolae*, ha mostrado patrones de glicosilación similares a los de eucariotas superiores (18). Además, se han expresado una variedad de proteínas terapéuticas como la Cu/Zn superóxido dismutasa humana (SOD1) (19), el activador de plasminógeno (PA) (20), factor VII de coagulación humano (21), el interferón gamma humano (rhIFN- $\gamma$ ) (22), los fragmentos variables de cadena simple (scFv's) (23), la interleucina 29 humana (IL-29) (24), la región Fc de IgG de conejo (25), fragmentos de CD40 (26), la amelogenina humana (rhAm) (27), la N-acetilserotonina O-metiltransferasa humana (ASMT) (28), entre otras. Recientemente en nuestro laboratorio, la hormona folículo estimulante bovina (bFSH), una glicoproteína de interés veterinario, fue producida en *L. tarentolae*, con actividad biológica, a gran escala y bajo costo comparado a los sistemas de expresión de células de mamífero (29).

Cabe destacar que este sistema se empleó para la expresión de proteínas virales como la proteína de cápside L1 del virus del papiloma humano (HPV) (30), la hemaglutinina del virus de la influenza (31), el complejo de glicoproteína E1 del virus de la hepatitis C (HCV) (32), la proteína de cápside del virus de la hepatitis E (HEV) (33), entre otras. También se ha utilizado a *L. tarentolae* como sistema para la expresión del dominio de unión al receptor de la proteína Spike (RBD) del SARS-CoV-2 (34).

## 1.2 Purificación de proteínas recombinantes

### 1.2.1 Antecedentes y métodos comúnmente utilizados

En los últimos años y a nivel mundial, el mercado de la biotecnología ha experimentado un crecimiento continuo, impulsado por la demanda creciente de soluciones para el diagnóstico, tratamiento y desarrollo de fármacos. El mismo tuvo un tamaño de 1.32 billones de dólares en el 2024 y en los próximos 7 años se espera que crezca a una tasa anual del 29% (35). En el período de enero del 2018 a junio del 2022 se aprobaron 180 principios activos biofarmacéuticos, entre los que se destacan anticuerpos monoclonales, hormonas, vacunas, enzimas, factores de coagulación, productos basados en ácidos nucleicos/terapia génica, entre otros (36). La expansión del mercado ha llevado a la necesidad de desarrollar métodos rentables y eficientes para el proceso de producción de proteínas recombinantes. De los productos aprobados en dicho período y fabricados mediante tecnología recombinante, el 67% fueron producidos en células de mamífero debido a los requisitos de modificaciones postraduccionales de los mismos (36). En la **Figura 10** se muestra el incremento a lo largo de los años del uso de sistemas de expresión basados en células de mamíferos en comparación con otros sistemas, poniendo de manifiesto la necesidad de contar con sistemas alternativos capaces de expresar proteínas glicosiladas o con ciertas modificaciones postraduccionales, para satisfacer la demanda del mercado.



**Figura 10. Gráfico retrospectivo de productos biofarmacéuticos aprobados y producidos en células de mamífero y otros sistemas de expresión.** Las barras muestran el porcentaje del total de biofármacos aprobados en el período indicado. Editada de Walsh 2022 (36).

En lo que respecta a la biotecnología aplicada a la salud animal, el uso de moléculas biológicas se ha extendido no solo al campo de las vacunas para control de enfermedades infecciosas (37), sino también al de la producción de hormonas que incrementan la productividad y fertilidad (41,42), y de citoquinas reguladoras del sistema inmune (38), para la inmunocastración (39,40), el control de ectoparásitos (43), etc. Sin embargo, la aplicación de productos recombinantes en animales sigue siendo restringida, debido principalmente al costo asociado a los procesos de producción y el posterior procesamiento del producto.

En los últimos años se han desarrollado numerosos sistemas de expresión de proteínas recombinantes con el fin de disminuir los costos de producción y simplificar el proceso sin afectar la calidad del producto recombinante. Un ejemplo de esto es *L. tarentolae*. Sin embargo, el procesamiento posterior del producto (extracción y purificación) sigue siendo un desafío debido a que puede representar entre el 45-92% del costo total del proceso de producción cuando se emplean sistemas de expresión económicos (44). No solo el proceso de purificación de las proteínas recombinantes, sino que también su escalabilidad a nivel industrial de forma eficiente y económica, son importantes cuellos de botella para el desarrollo de productos biológicos.

La cromatografía sigue siendo el método preferido para la purificación de proteínas. A nivel industrial, destacan la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica, las cuales se basan en propiedades fisicoquímicas intrínsecas como ser el punto isoeléctrico o la hidrofobicidad de la proteína de interés, limitando así el sistema de purificación a las características de la proteína a expresar.

A nivel de laboratorio los métodos de purificación se han centrado en la cromatografía de afinidad, utilizando etiquetas peptídicas fusionadas a las proteínas. Un ejemplo lo es la etiqueta de poli-histidina, la etiqueta Strept II de ocho aminoácidos (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) que muestra afinidad intrínseca hacia la estreptavidina (Strep-tag II®), la proteína de unión a maltosa (MBP) y los dominios de unión a quitina (CBD). Estas etiquetas de afinidad permiten purificar casi cualquier proteína siempre y cuando la etiqueta quede accesible al solvente (45). También la proteína A se ha utilizado ampliamente para la purificación de anticuerpos monoclonales (mAb),

dada su alta afinidad por el dominio Fc presente en los anticuerpos. Este sistema puede ser aplicado a otras proteínas si se incorpora un dominio Fc como etiqueta de purificación.

El principio de la cromatografía de afinidad se basa en interacciones fuertes entre los ligandos inmovilizados y sus correspondientes etiquetas de afinidad (46). Las proteínas que no posean las etiquetas no se unirán a los ligandos inmovilizados y podrán ser eliminadas en sucesivos lavados de la matriz cromatográfica. Una de las limitaciones de este método es que la etiqueta de fusión puede interferir con la actividad de la proteína a expresar (47,48). Además, para proteínas de uso terapéutico en humanos, ha sido reportado que dichas etiquetas de afinidad pueden ser inmunogénicos (49). Una forma de abordar este problema es eliminando la etiqueta al incorporar una secuencia de corte para proteasas específicas, por ejemplo, Factor Xa, proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y proteasa 3C de Rhinovirus (50). Sin embargo, este paso adicional incrementa los costos y el tiempo de procesamiento ya que se requiere un paso adicional para la eliminación de las proteasas, haciendo que este método no sea adecuado para la producción a escala industrial (45).

### **1.2.2 Polipéptidos tipo elastina (ELP) como etiqueta de purificación no convencional**

Si bien las etiquetas de afinidad han sido ampliamente utilizadas en la purificación de proteínas, los métodos que las emplean presentan ciertas limitaciones, especialmente asociadas a los costos elevados de las resinas utilizadas y a la dificultad en el escalado de los procesos. Por ello, surge la necesidad de desarrollar enfoques más sencillos y económicos. En este contexto, los métodos que no requieren cromatografía representan una buena alternativa para superar las limitaciones mencionadas, ya que no dependen del uso de resinas y podrían adaptarse a procesos a gran escala, lo que contribuiría a una reducción considerable de costos (50).

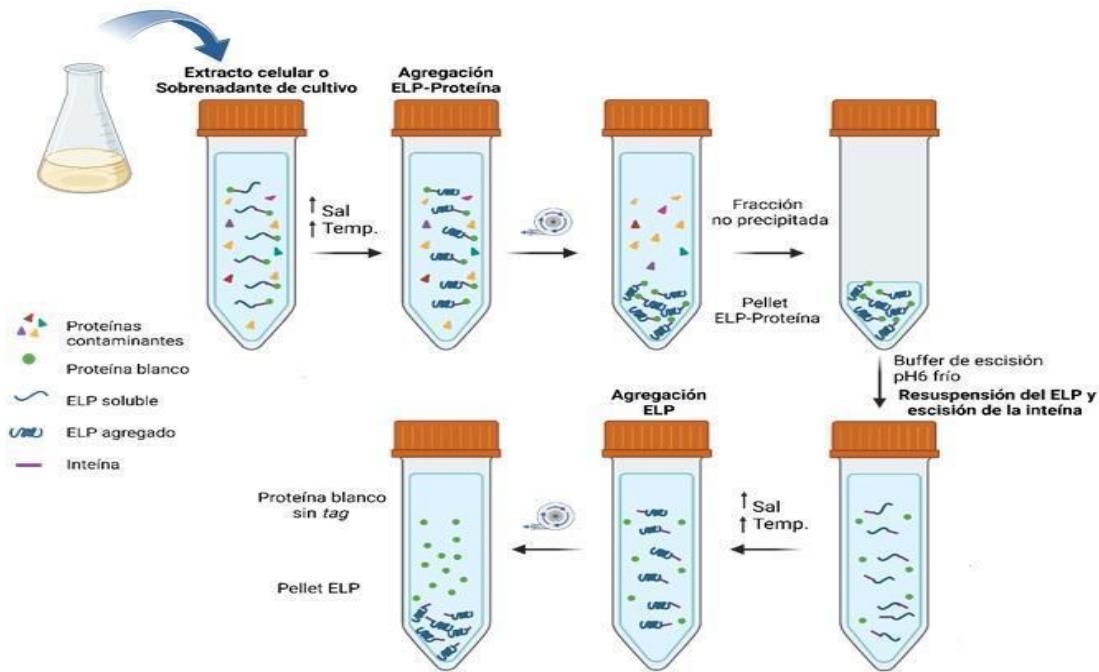
En este sentido, se han desarrollado etiquetas no convencionales que emplean mecanismos sencillos (51,52). Uno de estos son los polipéptidos tipo elastina (ELP del inglés “Elastin-like-Polypeptides”), compuesto por repetidos pentapeptídicos derivados de la elastina (VPGXG) $n$ , en el cual X representa cualquier aminoácido excepto prolina y  $n$  el número de repetidos del

pentapéptido. Los ELP presentan una transición de fase rápida a una temperatura específica denominada temperatura de transición inversa (Tt) (53,54). Es decir, estos polipéptidos son muy solubles a temperaturas menores de la Tt, mientras que, al elevarse la temperatura por encima de la Tt, tienden a agregarse formando complejos supramoleculares insolubles (54). La Tt es sensible a la composición, tamaño y concentración del ELP pero también se ve afectada por las propiedades de la proteína fusionada y la composición de la solución, especialmente la fuerza iónica de la misma (51, 55, 56).

La eficiencia en la agregación y la precipitación del ELP fusionado a proteínas, son fuertemente influenciados por la composición iónica del medio. Esto sigue la serie Hofmeister, que clasifica a los iones basándose en su naturaleza cosmotrópica y su efecto en la solubilidad de proteínas. Los iones cosmotrópicos, son iones que contribuyen a estabilizar las interacciones entre moléculas de agua, mientras que los iones caotrópicos, perturban la red de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua. Según estudios comparativos utilizando diferentes sales como precipitantes, el sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) por ser más caotrópico que el cloruro de sodio (NaCl), sería mejor precipitante de ELP. Pudiendo reducirse la concentración de sal requerida en casi 4 veces, y la temperatura requerida pasar de 37°C a unos 23°C. Eliminando la necesidad de energía adicional para calentar la solución y ampliando el rango de proteínas que pueden expresarse y luego agregarse a través del ELP sin comprometer su estabilidad térmica, especialmente aquellas termosensibles (57).

Cabe destacar que cuando el ELP se encuentra fusionado a una proteína recombinante, mantiene la capacidad de agregarse y la proteína fusionada puede ser purificada mediante un método sencillo conocido como “ciclado de transición inversa” (ITC) (54). Este método se ha utilizado con una variedad de proteínas, obteniéndose niveles de pureza por encima del 95%. Esto sugiere que la unión de contaminantes a los agregados del ELP es mínima. También se ha demostrado que este método produce cantidades de proteínas purificadas similares a las obtenidas utilizando etiquetas de histidina (58). En la **Figura 11** se muestra un esquema del ITC, el cual se basa en producir el agregado selectivo de la fusión ELP-Proteína con el aumento de la temperatura, sal o combinación de ambos, y estos agregados pueden ser separados de otras proteínas

contaminantes y recuperados mediante centrifugación o microfiltración. Luego los agregados pueden ser resolubilizados mediante disminución de temperatura y la utilización de un buffer con baja fuerza iónica.



**Figura 11. Esquema del método de purificación mediante ciclado de transición inversa y corte mediado por inteína.** La adición de sal ( $\text{NaCl}$  o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) al sobrenadante o lisado celular que contiene una proteína fusionada a ELP desencadena la transición de fase, provocando la agregación de la proteína de fusión ELP. La centrifugación de la muestra separa la fracción ELP agregada de otros contaminantes («centrifugación en caliente»). La proteína de fusión ELP agregada en el pellet se disuelve en buffer frío, pH 6 que promueve el corte de la inteína liberándose la proteína de interés del ELP. El agregado de sal y aumento de temperatura promueve el agregado del ELP libre. A este paso le sigue un centrifugado en caliente, que separa el ELP en el pellet de la proteína libre que permanece en solución.

Los niveles de expresión y la eficiencia de purificación de las proteínas fusionadas con ELP también dependen del tamaño del ELP, dado por el número de repeticiones de pentapéptidos. Se puede conseguir una purificación más eficiente con segmentos de ELP más largos, pero hay que ser cautelosos ya que esto puede provocar una disminución en los niveles de expresión de

la proteína (59). Por el contrario, los segmentos ELP más cortos suelen no interferir con la producción de las proteínas, pero permiten una purificación menos eficiente.

Este método por tanto no requiere de sistemas cromatográficos, resulta económico y fácil de escalar, lo cual lo convierte en atractivo para la producción industrial en gran escala, en particular en el área agro-veterinaria donde pequeños niveles de impureza son tolerables. En el área farmacéutica y otras aplicaciones, donde son requeridos altos niveles de pureza, estos métodos pueden actuar como primer paso de enriquecimiento, obteniéndose material con un bajo nivel de contaminantes con el cual continuar el proceso de purificación.

Como otras etiquetas de purificación, también poseen limitaciones, en este caso es la necesidad de remover la etiqueta luego de la purificación, lo cual se puede resolver mediante la utilización de la tecnología de las inteínas (50).

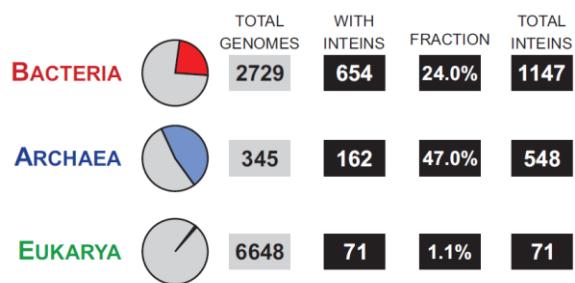
### 1.2.3 Inteínas

Las inteínas (*interveining proteins*) son polipéptidos que se escinden de las regiones que flanquean, en un proceso denominado “*splicing* de proteínas”. En la actualidad existe especial interés sobre la distribución y función biológica de las inteínas. Las mismas están presentes únicamente en organismos unicelulares pertenecientes a los tres dominios de la vida. En 1990 se descubrió la primer inteína en un gen que codifica una ATPasa de membrana vacuolar de *Saccharomyces cerevisiae* (VMA1) y desde entonces se han identificado más de 1500 inteínas en las bases de datos (60). Los tamaños de las mismas varían de 134 a 844 aminoácidos (61).

Es poco lo que se conoce del origen de las inteínas, la diversidad, evolución y los potenciales roles que cumplen en las células que las hospedan. Estudios relativamente recientes indican que las mismas son sensibles al ambiente en el cual se encuentran y juegan un rol regulatorio a nivel posttraduccional. En el trabajo realizado por Olga Novikova, *et al.* 2016, se realizó un análisis profundo de miles de genomas de los dominios de bacterias, archea y eucariotas, en búsqueda de inteínas. En los genomas de bacterias y archea, se encontró que un 24% y un 47% respectivamente contenían inteínas, incluso más de una por genoma, mientras que el 1,1% de

los genomas de eucariotas analizados contenían inteínas, y con una abundancia de solo una por genoma (62) (**Figura 12**).

Las inteínas halladas en bacterias y archea, se encuentran entre proteínas involucradas en la replicación del ADN, la recombinación, la reparación o transcripción, como ADN o ARN polimerasas, helicasas o topoisomerasas. En genomas nucleares eucariotas, las mismas se encuentran en ATPasas de membrana vacuolar y en la proteína PRP8, la cual participa en el *splicing* de intrones. Las inteínas también han sido encontradas en genomas de cloroplastos de algas verdes y criptofitas, flanqueando genes relacionados a helicasas replicativas, proteasa ClpP y ARN polimerasa. En virus y bacteriófagos, se han hallado inteínas en terminasas involucradas en el empaquetamiento del ADN (62).

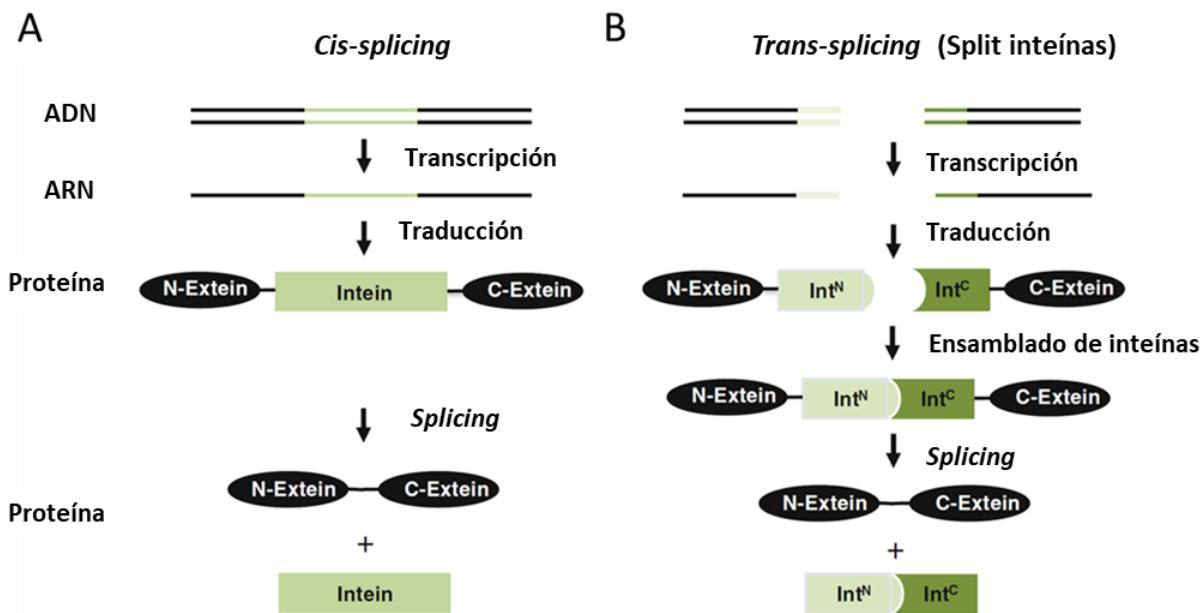


**Figura 12. Distribución de inteínas en distintos dominios filogenéticos de la vida.** Se indica el número total de genomas analizados, el número y la fracción de genomas con inteínas y el número total de inteínas encontradas. Editada de Novikova 2016 (62).

La conservación de las inteínas en genes esenciales de muchos organismos sugiere que, en ciertos contextos, las mismas pueden conferir a los mismos ciertas ventajas evolutivas. Por ejemplo, al interrumpir proteínas esenciales, el *splicing* puede actuar como un mecanismo regulador, activando la proteína sólo bajo ciertas condiciones ambientales. A su vez asegura que solo proteínas correctamente plegadas y procesadas se activen tras el *splicing*, actuando con un control de calidad proteico. Muchas inteínas contienen un dominio de endonucleasa homing, que les permite insertarse en genes homólogos carentes de inteína, asegurando su herencia y diseminación (62, 63).

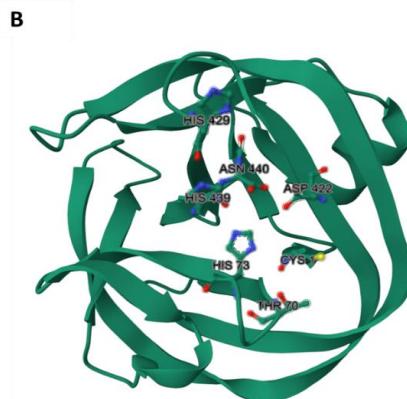
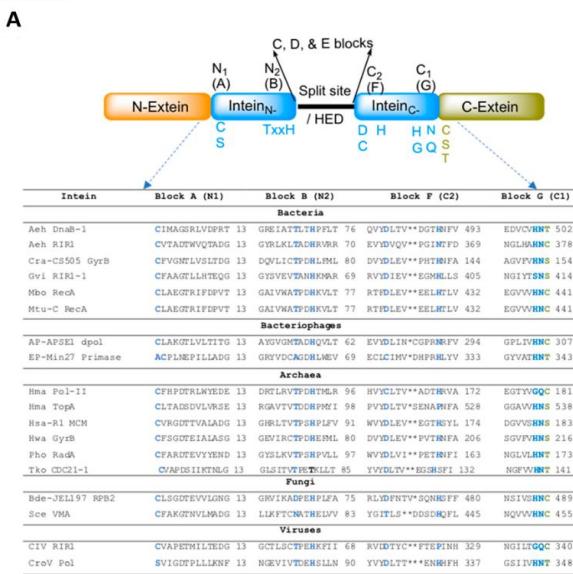
### 1.2.4 Mecanismo de acción de las inteínas

En la mayoría de los casos, las inteínas se expresan como un único polipéptido, inteínas *cis-splicing*. Como se ilustra en la **Figura 13.A**, las secuencias que codifican para inteínas están flanqueadas en el extremo 5' y 3' por las secuencias que codifican para la región N- y C-terminal, respectivamente, de una proteína. Estas secuencias adyacentes a las inteínas se denominan “exteínas”. Luego de la traducción ocurre el *splicing* proteico que da lugar a la escisión de la inteína de las regiones que la flanquean (64,65). Sin embargo, en algunos casos se puede dar la transcripción y traducción de dos secuencias conteniendo segmentos de la inteína. Estos se conocen como inteínas “trans-splicing” o “Split inteínas” (**Figura 13.B**). Luego de la unión post-traduccional de los segmentos conteniendo las secuencias de inteínas tiene lugar una reacción de *splicing* con ensamblaje del polipéptido y la eliminación de las regiones de inteína (65,66).



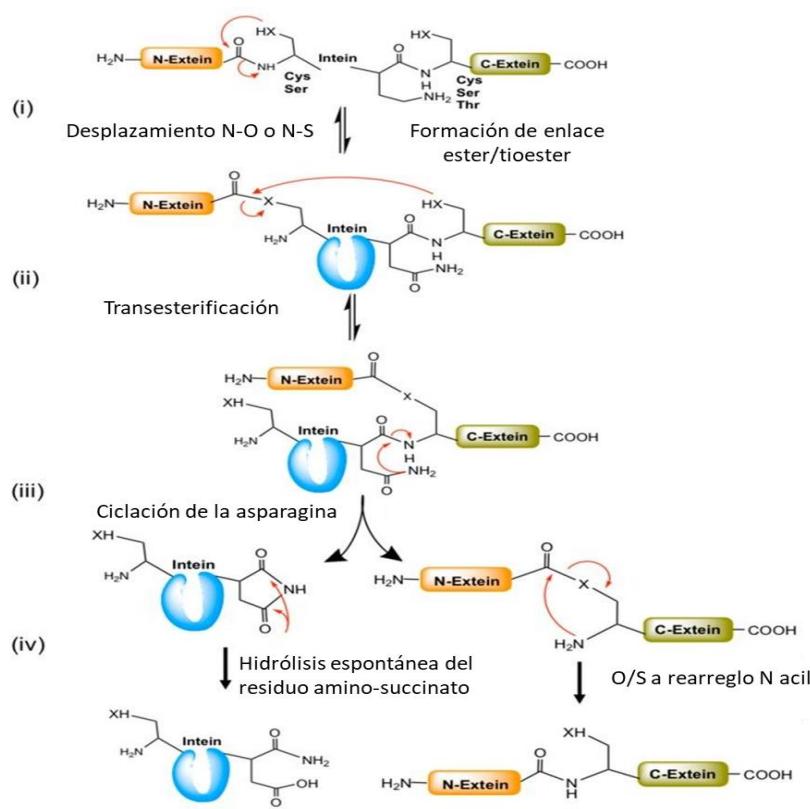
**Figura 13: Traducción y splicing proteico de las inteínas. A) Inteínas de *cis-splicing*. B) Inteínas de *trans-splicing* (*split* inteínas).** La secuencia es transcripta a ARNm y traducida como un precursor proteico, el cual mediante posterior *cis* o *trans-splicing* escinde a la inteína de las dos regiones que la flanquean, o exteínas. Las secuencias exteínas se ligan entre sí, dando lugar a una proteína madura. Editada de Elleuche 2016 (65).

El *splicing* de proteínas consiste en romper un enlace peptídico (en las uniones inteína-exteína) y formar un nuevo enlace peptídico entre polipéptidos de exteínas. Se trata de una reacción química precisa que se produce entre aminoácidos conservados específicos que residen en inteínas y exteínas y no requiere cofactores. La alineación de secuencias de inteínas revela que las mismas tienen cuatro motivos de *splicing* importantes, cada uno de los cuales comprende aminoácidos similares altamente conservados (67). Estos motivos se dividen a su vez en siete bloques: De los siete bloques, A, B, F y G (también conocidos como N1, N2, C2 y C1, respectivamente) son los esenciales (**Figura 14.A**). Como ejemplo en la **Figura 14.B** se muestra la estructura tridimensional de la mini inteína recA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtu*) con delección del dominio endonucleasa, y la disposición espacial de los residuos aminoacídicos involucrados en el mecanismo de reacción.



**Figura 14. Elementos de importancia involucrados en el *splicing* de inteínas. A)** Las inteínas poseen cuatro motivos de importancia: región N-terminal con N1 y N2 y la región C-terminal con C1 y C2. Los aminoácidos involucrados en la reacción de *splicing* se indican en letra azul. Los aminoácidos conservados en la C-exteína se indican en letra verde (C, S y T). Se muestra una lista de inteínas de bacterias, bacteriófagos, virus y hongos y el alineamiento de los motivos A, B, F y G conservados. Editada de Pavankumar 2018 (67). **B)** Estructura tridimensional del dominio de splicing de la inteína recA de *Mtu* (PDB: 2IN0), con delección del dominio endonucleasa. En la figura se indican los aminoácidos involucrados en el mecanismo de reacción de *splicing*.

El mecanismo canónico por el cual ocurre la reacción de *splicing* de las inteínas consta de cuatro pasos. (i) En primer lugar ocurre un desplazamiento N-O o N-S que conduce a la formación de un enlace ester o tioester, iniciado por el residuo N-terminal de la inteína, habitualmente una cisteína o una serina. (ii) El segundo paso es una trans-tio-esterificación entre las exteínas, donde ocurre un ataque nucleofílico por el residuo C-exteína, generalmente una cisteína, serina o treonina, resultando en una ligación de las dos exteínas y la formación de un intermediario ramificado. (iii) Posteriormente la inteína se separa de las exteínas mediante la ciclación de una asparagina conservada. (iv) El último paso es un reordenamiento espontáneo del enlace tioéster entre las exteínas, que forma un enlace peptídico de manera independiente de la inteína, mientras que la succinamida C-terminal de la inteína se hidroliza lentamente de nuevo a asparagina o isoasparagina (**Figura 15**).

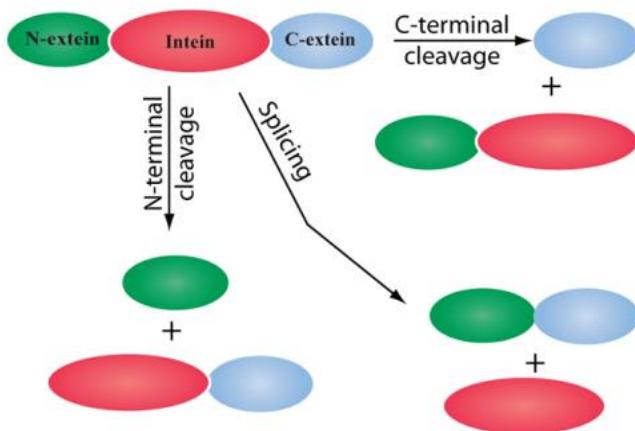


**Figura 15. Pasos en el mecanismo de *splicing* de inteínas.** (i) Desplazamiento N-O o N-S, (ii) transesterificación, (iii) ciclación de la asparagina e (iv) hidrólisis espontánea del residuo amino-succinato y O/S a rearreglo N acil para formar enlace peptídico entre exteínas. Editada de Pavankumar 2018 (67).

### 1.2.5 Inteínas como herramienta para la purificación de proteínas

La química de las inteínas, implicada en la generación y ruptura de enlaces peptídicos resulta especialmente atractiva para diversas aplicaciones biotecnológicas, en particular para el desarrollo de nuevas estrategias de purificación de proteínas (67).

Las inteínas han sido modificadas genéticamente en residuos específicos para que realicen reacciones de escisión controladas y desencadenadas por distintos factores. Según cómo se desencadene la reacción de escisión, las inteínas modificadas pueden clasificarse en inteínas de escisión C-terminal o N-terminal (**Figura 16**) (68). Por ejemplo, con fin de purificar proteínas se ha visto que introducir una mutación X1A produce una inteína de escisión C-terminal, donde X es el aminoácido inicial de la inteína (61).



**Figura 16. Tipos de reacción de escisión mediada por inteínas.** *Splicing* de inteínas, escisión tipo C-terminal o N-terminal. Imagen de Du 2011 (68).

Las inteínas modificadas pueden clasificarse como inducidas por pH o inducidas por adición de un tiol, como  $\beta$  mercaptoetanol, 1,4-ditiotreitol (DTT) y cisteína libre, según el tipo de reacción de escisión que experimenten (N- o C-terminal) (61).

El primer sistema de purificación comercial basado en la utilización de inteínas fue desarrollado por New England Biolabs (NEB) en 1997 y comercializado como el sistema “Intein-Mediated Purification with Affinity Chitin Binding Tag” (IMPACT). El mismo utilizaba una inteína modificada

proveniente de *S. cerevisiae* VMA1, cuyo clivaje ocurre por adición de un tiol, en el extremo N terminal, mientras que su extremo C-terminal estaba fusionado a una etiqueta de dominio de unión a quitina (CBD) (61,69). Un aspecto negativo de este desarrollo es que la adición de tioles puede alterar los enlaces disulfuro accesibles al solvente de la proteína diana y desnaturalizarla afectando su estructura y función.

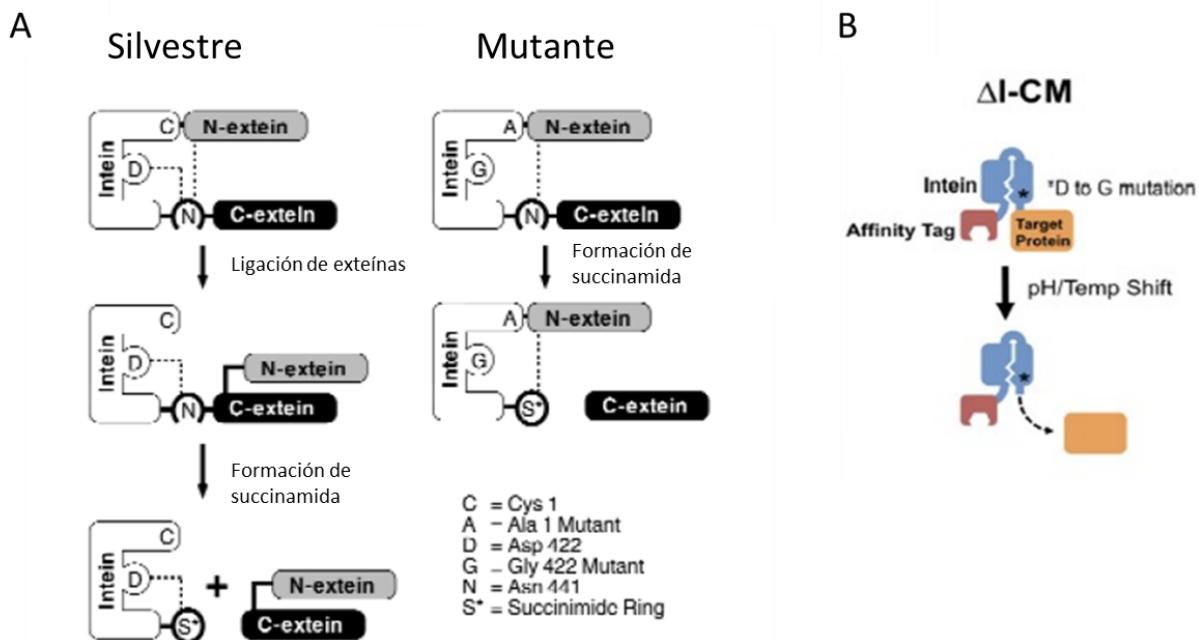
Posteriormente se desarrollaron las inteínas de escisión C-terminal, cuya reacción de escisión es inducida por un cambio de pH, normalmente de pH 8,5 a pH 6,5. La reacción de escisión de estas inteínas también está influenciada por la temperatura, exhibiendo mayor actividad a 37°C (69).

En la **Tabla 1** se describe una lista de inteínas comúnmente utilizadas para la purificación de proteínas y algunas de las proteínas purificadas utilizando estos sistemas (60).

**Tabla 1.** Inteínas utilizadas en purificación de proteínas. Editada de Wood 2018 (60).

Inteína / Organismo	Etiqueta utilizada	Tipo de escisión	Proteínas expresadas
<i>Sce VMA</i> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	MBP, CBD	N-terminal (adición de un tiol: DTT, β-ME, cisteína libre)	Tiorredoxina, Hhal Metilasa, MBP, Bst DNA Polimerasa, T4 DNA Ligasa, Ciclofilin PPIase, CamK1, PPI, GFP, CamK2, Fsel (C term), hPTThP, Cre Recombinasa, Hsp47, bFGF y diferentes endonucleasas (BamHI, BgIII, EcoRV)
<i>Mtu ΔI-CM</i> ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	MBP, CBD, ELP, Phasin L6KDLipAFR/FK-1	C-terminal (pH dependiente)	TS, C-I-Tev, aFGF, AHSP, B-lac, Catalase, GST, GFP, MBP, S-824, CAT, NusA, β-Gal (w/ split ICM), LipA
<i>Mxe GyrA</i> ( <i>Mycobacterium xenopi</i> )	CBD, ELP, ELK16, His	N-terminal (adición de un tiol) C-terminal (dependiente de temperatura 16-25°C)	RNAsa truncada, Hpal truncada, Tiorredoxina, RNAP, CM4, HβD4, HstI, CHAP, Pa-MAP 2, Timosina B4, hEGF, Gelosina, Uricasa
<i>Ssp DnaB</i> ( <i>Synechocystis sp</i> )	MBP, CBD, PhaR, His	N-terminal (adición de un tiol) C-terminal (dependiente de pH)	MBP, T4 Ligasa with, hINFα-4, hEGH, Bmk IT, Tiorredoxina (con split inteína), MBP, LacZ, GFP, MBP, Interleukin-10
<i>Npu DnaE</i> ( <i>Nostoc punctiforme</i> )	CBD, ELP	C-terminal (adición de un tiol)	GFP, MBP, PTHD, DsRed, β-Gal, CAT

En el presente trabajo se utilizó una inteína de escisión inducida por pH conocida como mini-inteína, ΔI-CM derivada de la inteína *recA* de *M. tuberculosis*. La misma es una proteína de 18 kDa y se desarrolló eliminando un dominio, seguido de mutagénesis y selección para lograr una escisión rápida controlable por pH y temperatura (**Figura 17.A**) (70). Ésta inteína ha sido utilizada exitosamente conjugada con varias etiquetas de afinidad convencionales, como la CBD, y también etiquetas no cromatográficas como los polipéptidos de tipo elastina (ELP) para producir diferentes proteínas recombinantes (**Figura 17.B**) (61).



**Figura 17: Modelo de escisión mediada por la mini inteína ΔI-CM. A)** En la inteína nativa (Silvestre), los enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas (.....) no permiten que la asparagina (N) C-terminal reaccione formando una succinimida hasta que se liguen las exteínas. El residuo de ácido aspártico (D) en la posición 422 está estrictamente conservado en el 62% de todas las secuencias de inteínas conocidas. Un cambio de aminoácido en la posición 422 por una glicina (G) elimina la posibilidad de formación de un enlace que en la forma nativa de la secuencia y facilita la formación de la succinamida y la escisión C-terminal. Editada de Wood 1999 (70) **B)** Esquema del mecanismo de acción mini inteína ΔI-CM fusionada a una etiqueta de purificación. Editada de Wood 2014 (69).

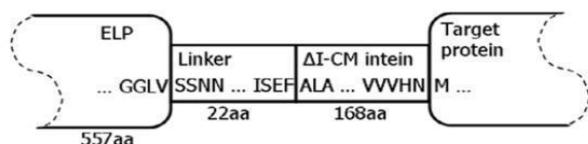
El uso de inteínas para la purificación de proteínas libres de etiquetas se ha empleado mayoritariamente utilizando *E. coli* como sistema de expresión. Debido a su naturaleza sensible a la temperatura y el pH este tipo de inteínas tienden a experimentar auto-escisión *in vivo* cuando son expresadas a temperaturas altas ( $>32^{\circ}\text{C}$ ) y bajo pH ( $<7.4$ ). Este comportamiento condicionó su uso en sistemas de expresión basados en células de mamífero ya que las condiciones de crecimiento afectarían negativamente los rendimientos. Sin embargo, hay experiencias exitosas del empleo de inteínas en proteínas que se han expresado en células de insecto (71) y en plantas (72), donde las temperaturas de crecimiento son inferiores. El hecho que *L. tarentolae* crezca a una temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$  y lleve a cabo modificaciones post-traduccionales similares a las de

mamíferos, la convierte en un sistema candidato en el cual explorar el uso de las inteínas en la producción de biomoléculas.

En comparación con las inteínas cuya escisión es inducida por adición de tiol, las inteínas de escisión inducida por pH son compatibles con proteínas blanco que posean enlaces disulfuro, siempre y cuando estas presenten *pI* superiores al pH a emplear. Además, estas últimas son más económicas, considerando que no requieren de reactivos adicionales para que ocurra la reacción de escisión.

El presente trabajo exploró la utilización del ELP y la mini inteína  $\Delta$ I-CM como etiqueta para la purificación proteica en un sistema de expresión eucariota como es *L. tarentolae*, mediante el diseño de construcciones de fusión con dos proteínas de interés (la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) y una quimera de la hormona folículo estimulante bovina (bFSH) (29).

Dado que la precipitación se limita a la porción del ELP, la cual está separada de la inteína y la proteína de interés por un linker flexible, la actividad de la inteína y de la proteína de interés no se verían afectadas (**Figura 18**).



**Figura 18. Esquema del precursor proteico expresado.** Editada de Banki 2005 (52).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

La capacidad de *L. tarentolae* de proporcionar modificaciones posttraduccionales similares a las de células de mamíferos y de crecer a menor temperatura que éstas, convierten a este organismo en un buen sistema de expresión para proteínas recombinantes de origen animal cuya purificación se realice por métodos basados en etiquetas de ELP e inteínas. Dado el comparativo bajo costo de estos métodos de purificación, su aplicabilidad en *L. tarentolae* contribuirá a hacer más rentables los procesos de producción de biomoléculas recombinantes para el área veterinaria.

### 2.2 Objetivo general

El presente trabajo propone desarrollar nuevas herramientas moleculares que permitan obtener un alto grado de pureza de biomoléculas expresadas en *L. tarentolae* mediante métodos sencillos que no requieran de cromatografía ni el uso de proteasas.

### 2.3 Objetivos específicos

- Generación de construcciones de ADN para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a ELP\_Δ -CM.
- Generación de cepas de *L. tarentolae* expresando de manera constitutiva e inducible las construcciones recombinantes y selección de clones con alta producción.
- Optimización de las condiciones de expresión de las diferentes proteínas recombinantes que permitan obtener altos niveles de expresión y bajo porcentaje de escisión prematura de la inteína.
- Optimización de las condiciones de purificación mediante precipitación por ciclado de transición inversa del ELP.
- Optimización de las condiciones de auto escisión de la inteína que permitan obtener la proteína de interés libre de etiquetas.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 Reactivos generales

Las sales utilizadas en la precipitación fueron obtenidas de Sigma-Aldrich o Carlo Erba. Los reactivos utilizados para la preparación de soluciones, antibióticos de selección, así como el medio de cultivo BHI para *L. tarentolae* fue adquirido de Sigma-Aldrich. Las enzimas utilizadas en los procedimientos de Biología Molecular fueron compradas a New England Biolabs (NEB), Fermentas o Invitrogen. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT). Los kits para extracción y purificación de ADN fueron de Nzytech o QIAGEN. El cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete EDTA-free fue comprado a Roche.

## 3.2 Generación de construcciones para expresión en *L. tarentolae*

Las proteínas modelo eGFP y la bFSH fueron clonadas en dos tipos de vectores comerciales que permiten la secreción de las mismas, un vector de expresión constitutiva, pLEXSY-Hyg2 (73), y un vector de expresión inducible pLEXSY\_IE-blecherry4 (74), episomal y bicistrónico, que expresa simultáneamente la proteína de interés y la proteína fluorescente Cherry como reportero de expresión. En estos vectores se clonó la secuencia codificante para; el ELP de 110 repetidos seguida de un linker separador, la mini inteína ΔI-CM (51) y la proteína de interés. Las secuencias del ELP y ΔI-CM se obtuvieron del vector pET/EI-CAT desarrollado por Banki y colaboradores, y disponible en AddGeen (75). La secuencia codificante para eGFP se obtuvo del vector peGFP-C3 (76) y la de la bFSH del vector pLEXSY-Hyg2 FSH (77). En cuanto a la señal de secreción, se sustituyó la secuencia del péptido señal presente en los vectores pLEXSY-Hyg2 y pLEXSY\_IE-blecherry4 por la secuencia del péptido señal de la fosfatasa ácida secretada por *L. mexicana* (sección 3.2.1) que ha mostrado ser más eficiente en la secreción de proteínas recombinantes (23). En las construcciones se agregó una etiqueta de 6 histidinas precediendo a las proteínas de interés. Las secuencias codificantes y de aminoácidos se detallan en el **Anexo 1**. La síntesis de todos los vectores con codones optimizados para *L. tarentolae* se solicitó a Genescrypt®.

### 3.2.1 Eliminación del péptido señal en vectores de expresión

Los vectores pLEXSY-Hyg2\_ELP-Inteína-eGFP (Hyg2\_E-I-eGFP), pLEXSY\_IE-blecherry4\_ELP-Inteína-eGFP (Blecherry\_E-I-eGFP), y pLEXSY\_IE-blecherry4\_ELP-eGFP (Blecherry\_E-eGFP) fueron digeridos con las enzimas *Bg*II Fast dig (Thermo) y *Ncol*-HF (NEB) durante 40 minutos a 37°C y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris base pH 8,0, 40 mM ácido acético y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) y bromuro de etidio 0,5 µg/mL. Los fragmentos fueron purificados a partir del gel mediante el kit comercial *PureLink Quickgel extraction* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó el relleno de extremos romos, utilizando *Phusion* ADN polimerasa (NEB). La ligación de los fragmentos purificados se realizó con *T4 DNA Ligasa* (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor incubando a 4°C durante toda la noche (ON, del inglés *over night*). Posteriormente, se transformaron *Escherichia coli* cepa SURE (*Stop Unwanted Rearrangement Events*, Agilent) quimiocompetentes con la reacción de ligación. Para ello, 100 µL de las células fueron incubadas con 10 µL de ADN por 30 min en un baño de hielo y luego se realizó un shock térmico a 42°C durante 90 segundos, seguido de una incubación por 2 min en hielo, luego de lo cual se agregó 700 µL de medio SOC (triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 3,6 g/L, KCl 0,186 g/L, NaCl 0,5 g/L, MgCl<sub>2</sub> 0,96 g/L) y se incubó 1 hora a 37°C con agitación a 220 revoluciones por minuto (RPM). Cumplido este tiempo, una fracción de las células transformadas se sembró en placas de LB-agar (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 15 g/L de agar) suplementadas con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron durante 16-20 h a 37°C. De las colonias crecidas, se realizaron precultivos de 5 mL en medio LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 220 RPM durante 16-20 h a 37°C. Luego se realizó la extracción del ADN plasmídico con el kit *QIAprep Miniprep* (QIAGEN). Los plásmidos se enviaron a secuenciar para corroborar la delección del péptido señal utilizando los cebadores T7 Fw (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') para las construcciones de expresión inducible y pLexy-Fw (5' ACTTGCACATACCCAGTGAAGC 3') para el vector de expresión constitutiva (servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo).

### **3.3 Transfección de *L. tarentolae* y obtención de clones productores de bFSH / eGFP**

#### **3.3.1 Cultivo de *L. tarentolae***

Se utilizaron dos cepas de *L. tarentolae*, la cepa LEXSY host P10 (78) para la expresión constitutiva con el vector pLEXSY-Hyg2 y la cepa LEXSY host T7/TR (79) (que expresa constitutivamente la ARN T7 Polimerasa y el represor TET) para la expresión inducible con pLEXSY\_IE-blecherry4. Los cultivos de la cepa LEXSY host P10 se realizaron en el medio de cultivo líquido Infusión Cerebro-Corazón (BHI) 37 g/L suplementado con hemina 5 µg/mL, penicilina 50 U/mL y estreptomicina 50 µg/L. Los cultivos de la cepa LEXSY host T7/TR se realizaron en medio BHI 37 g/L suplementado con hemina 5 µg/mL, penicilina 50 U/mL, estreptomicina 50 µg/L, higromicina 100 µg/mL y nourseotricina 100 µg/mL. Luego de las transfecciones los medios de cultivo fueron suplementados con 100 µg/mL de higromicina y 100 µg/mL de bleomicina para facilitar la selección de clones transfectantes a partir de los vectores pLEXSY-Hyg2 y pLEXSY\_IE-blecherry4, respectivamente. Ambas cepas de *L. tarentolae* utilizadas fueron incubadas a 26°C en condiciones estáticas durante la propagación y en agitación a 90 RPM durante la expresión de la proteína recombinante.

Los recuentos de células se efectuaron en cámara de Neubauer diluyendo los cultivos en buffer fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4) con glucosa al 1% (p/v) inmediatamente antes de su conteo. Se consideraron como células viables aquellas que tenían movilidad y eran morfológicamente normales.

#### **3.3.2 Transfección y selección de clones**

Se partió de un cultivo de *L. tarentolae* con una densidad de  $3 \times 10^6$  células/mL, el cual alcanza una densidad de  $2-3 \times 10^7$  células/mL al cabo de 24 horas de incubación a 26°C en forma estática. Se realizó recuento de células y el volumen necesario para tener  $3 \times 10^7$  células se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con Cytomix (EDTA 2 mM pH 7,6; KCl 120 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; HEPES 25 mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub>

5 mM; Glucosa 0,5%; BSA 100 µg/mL; hipoxantina 1 mM) y luego se resuspendieron con 100 µL de solución Amaxa Basic Parasite nucleofector (Lonza<sup>TM</sup>).

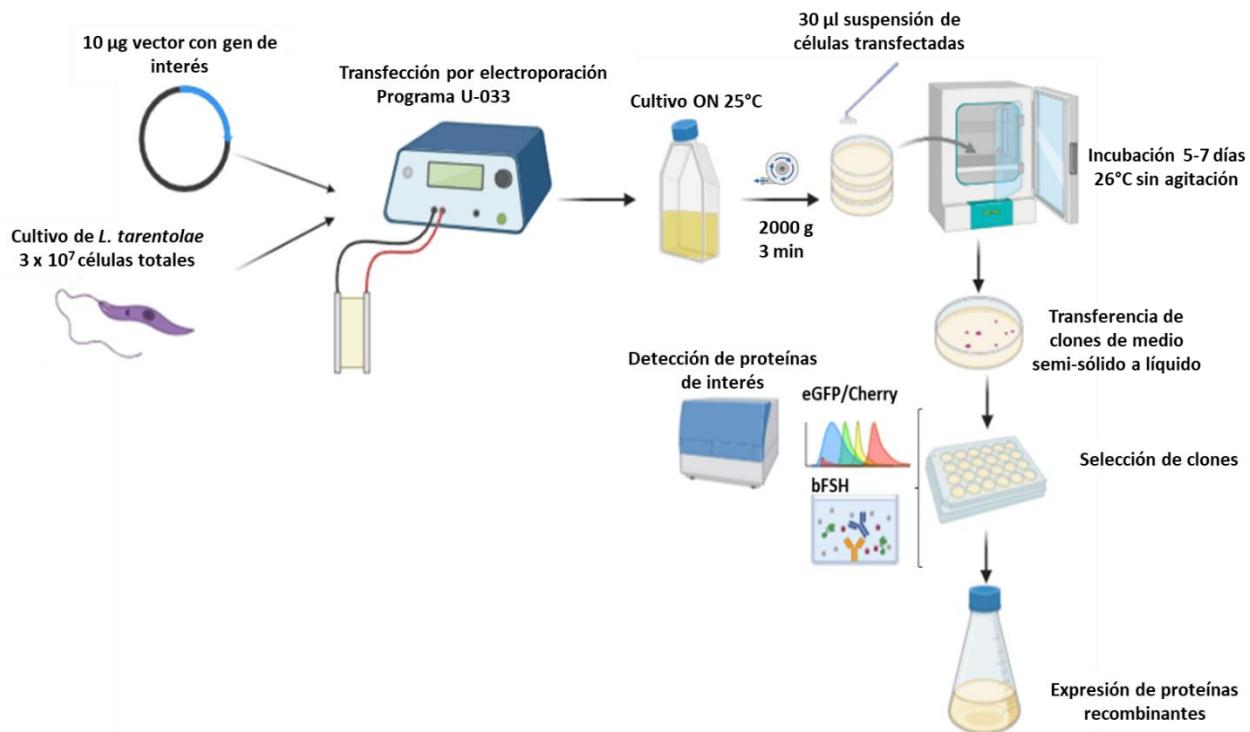
Previo a la transfección, los vectores de expresión inducible fueron linealizados con *Pcil* (Thermo), mediante incubación ON a 37°C y los vectores de expresión constitutiva fueron digeridos con *Swal* (NEB) por incubación ON a 25°C. La precipitación del ADN digerido se realizó con acetato de sodio (concentración final 0,3 M) más 0,7 volúmenes de isopropanol, seguido de un lavado con alcohol 70%, evaporación y finalmente se resuspendió en agua estéril. Los pasos de centrifugación se realizaron a 15000 g, 4°C por 30 minutos para el paso de precipitación y 10 minutos para los lavados.

Para la transfección se utilizó el equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza) que permite utilizar parámetros eléctricos y soluciones especialmente optimizadas para la transfección de parásitos. En las cubetas de electroporación de 2 mm se colocó la mezcla ADN (10 µg)/células ( $3 \times 10^7$  células totales) y se aplicó el programa de nucleofeción U-033 del equipo. A continuación, se incubó la cubeta en hielo por 10 minutos y los parásitos transfectados se transfirieron a 5 mL de medio de cultivo BHI sin el antibiótico de selección para el vector, pero sí conteniendo los antibióticos requeridos por la cepa, y se incubaron ON a 26°C. Para la selección clonal se emplearon placas con medio sólido, las cuales fueron preparadas el mismo día con BHI agar suplementado con los antibióticos de selección, además de los requeridos por la cepa (BHI 37 g/L, suero fetal bovino inactivado 20 min a 56°C 10% (v/v), agar 10 g/L, HEPES 20 mM pH 7.4, hemina 5 µg/mL, penicilina 50 U/mL, estreptomicina 50 µg/L y según corresponda higromicina 100 µg/mL, bleomicina 100 µg/mL y nourseotricina 100 µg/mL). A estas placas se le colocaron membranas de nitrocelulosa estériles sobre la superficie. Una alícuota de 3 mL del cultivo crecido ON se centrifugó a 2000 g durante 3 minutos a temperatura ambiente y los parásitos fueron resuspendidos en 200 µL de medio de cultivo residual. Se esparcieron 30 µL de las células por placa, las cuales se incubaron en posición invertida y selladas con parafilm, a 26°C durante 5-7 días hasta la aparición de pequeñas colonias definidas.

Para el caso de la cepa LEXSY host P10, las colonias fueron transferidas mediante un *tip* a placas de 24 pocillos conteniendo 1 mL de medio BHI suplementado con higromicina 100 µg/mL.

En el caso de la cepa T7-TR, las membranas de nitrocelulosa fueron transferidas a placas frescas con BHI agar con tetraciclina (10 µg/mL). Las placas se incubaron a 26°C durante 2 días. Los clones con mayor expresión de la proteína reportera fueron seleccionados visualmente evaluando la intensidad de la coloración rosada correspondiente a la proteína Cherry. Las células provenientes de estas colonias fueron transferidas con un *tip* a una placa de 24 pozos conteniendo 1 mL de BHI suplementado con higromicina 100 µg/mL, nourseotricina 100 µg/mL, bleomicina 100 µg/mL y tetraciclina 10 µg/mL.

En ambos casos las placas se incubaron durante 24 horas a 26°C sin agitación. Para las construcciones que tienen como proteína a expresar a la bFSH, los sobrenadantes provenientes de las mismas fueron evaluados por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para cuantificar la presencia de FSH (sección 3.8.5). Para las construcciones que tienen como proteína a expresar a la eGFP se midió la intensidad de fluorescencia emitida a 507 nm luego de ser excitada con una longitud de onda de 488 nm, utilizando el espectrofluorímetro Varioskan™ (Thermo Scientific). Además, para el caso de los vectores de expresión inducible que expresan la proteína reportera Cherry, luego de 48 horas de inducción con tetraciclina 10 µg/mL se midió la intensidad de fluorescencia emitida a 610 nm luego de ser excitada a 590 nm. Los clones que presentaron mayor producción se conservaron a -80°C con glicerol 20% (v/v). En la **Figura 19** se muestra un esquema del proceso de transfección de *L. tarentolae*.



**Figura 19. Esquema del proceso de transfección en *L. tarentolae*.** Los parásitos adquieren el vector con el gen de interés mediante transfección por electroporación. Posteriormente se realiza la selección de clones, los cuales luego son analizados para identificar el clon con el mayor nivel de producción de la proteína de interés. Finalmente, se escala el proceso de producción de la proteína recombinante.

### 3.4 Expresión de proteínas de interés

Para la expresión de las proteínas en todas las construcciones, se partió de cultivos en condiciones estáticas en fase exponencial de crecimiento con densidad celular entre  $4$  a  $8 \times 10^7$  células/mL (densidad óptica a 600 nm (OD) 0,8-1). Se realizó una dilución al quinto en BHI suplementado en matraz (respetando que el volumen de medio no supere 1/5 de la capacidad del matraz). Este cultivo se incubó a 26°C y a 90 RPM en agitador orbital, luego de 24 horas se monitorearon los parásitos al microscopio y se midió la OD. El precultivo se diluyó nuevamente al quinto en medio BHI fresco suplementado y para las construcciones de expresión inducible se agregó el agente inductor, tetraciclina 10 µg/mL. El matraz se incubó nuevamente a 26°C y 90 RPM durante 48-72 horas según el caso. Los cultivos se centrifugaron a 3000 g durante 20

minutos a 4°C y el sobrenadante y/o pellet de células recuperado, de no ser utilizado inmediatamente, se conservó a -20°C.

### **3.5 Optimización de la expresión**

Para los experimentos de optimización de las condiciones de expresión, luego de realizada la inducción de los cultivos, se tomaron alícuotas de cultivo a las 24, 48 y 72 horas y el estado de los parásitos se controló mediante observación al microscopio.

Los niveles de expresión de eGFP y la proteína reportera Cherry, así como el grado de auto-escisión prematura de la inteína a lo largo del proceso fue evaluado por Western blot con anticuerpos específicos contra las proteínas de interés (ver sección 3.8.2) y por fluorimetría (ver sección 3.8.3).

### **3.6 Extracción de proteínas citoplasmáticas totales de *L. tarentolae* Blecherry\_Cito\_E-eGFP**

Transcurridas las 72 horas de realizada la inducción del cultivo con tetraciclina 10 µg/mL, se midió la OD y se observaron los parásitos al microscopio. Las células fueron recuperadas centrifugando a 3000 g durante 20 minutos a 4°C. Considerando el valor de la OD se calculó el número de células totales a ser resuspendidas en buffer Tris 50 mM, EDTA 2 mM, inhibidores de proteasas (cComplete-EDTA Free, Roche), a razón de 1 mL cada  $3 \times 10^9$  células. Posteriormente la suspensión de los parásitos fue sometida a sonicado (Branson 250) mediante 6 ciclos separados por 1 minuto en hielo (Amplitud 40, 1 minuto total: en ciclos de 1 segundo ON, 1 segundo OFF). La muestra de células sonicadas, se centrifugó a 18000 g 4°C durante 30 minutos y el sobrenadante fue recuperado y conservado a -20°C. El mismo fue evaluado mediante absorbancia a 280 nm, y se midió la intensidad de fluorescencia emitida por eGFP y Cherry (ver sección 3.8.3) previo a ser congelado.

## 3.7 Purificación mediada por ELP e inteína

### 3.7.1 Purificación en construcciones con ELP e inteína

Se agregó igual volumen de la sal precipitante NaCl (3M) al sobrenadante de cultivo o lisado celular que contiene a la proteína fusionada a ELP. Se incubó durante 10 minutos a 30°C provocando la agregación de la proteína de fusión. Luego se centrifugó en caliente (30°C) a 10000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y la proteína agregada en el pellet se resuspendió en buffer frío (4°C) pH 6 (1X PBS, 40 mM Bis-Tris, pH 6.0, 2 mM EDTA) que promueve el corte de la inteína liberándose la proteína de interés del ELP. En este punto las muestras se incubaron a temperatura ambiente y se tomó una muestra a tiempo cero, y otra a las 18 horas de reacción de escisión. Transcurrido el tiempo de reacción, se agregó nuevamente igual volumen de sal (NaCl 3M) y se aumentó la temperatura (30°C), promoviendo el agregado del polipéptido de ELP libre. Luego de 10 minutos se repitió el centrifugado en caliente, para separar el ELP (pellet) de la proteína de interés (en solución). Alternativamente se utilizó como precipitante al  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , concentración final 0,6 M durante 10 minutos a 25°C.

### 3.7.2 Purificación en construcciones con ELP, sin inteína

Se adicionó igual volumen de la sal precipitante  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al sobrenadante de cultivo o lisado celular que contiene una proteína fusionada al ELP. Se incubó durante 10 minutos a 25°C desencadenando la transición de fase y provocando la agregación de la proteína fusionada a ELP. Se realizó una centrifugación de la muestra a 10000 g y 25°C durante 10 minutos para separar el agregado del ELP-proteína de interés. El pellet proteico se disuelve en buffer bajo en sal y frío (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8.8) para facilitar la redisolución de la proteína de fusión. Utilizando este protocolo general se ensayaron distintas concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y temperaturas de precipitación.

### 3.7.3 Cálculos de porcentaje de recuperación

En las purificaciones que partimos del sobrenadante de cultivo, el valor de emisión de fluorescencia de eGFP del mismo fue corregido restando la emisión de fluorescencia del medio BHI. Luego de realizar la purificación, para la proteína fusionada a ELP, el valor de emisión de

fluorescencia fue corregido dividiendo por el factor de concentración, según el volumen de partida del sobrenadante. Los porcentajes de recuperación fueron calculados, considerando que el sobrenadante corregido equivale al 100% de proteína producida.

Análogamente se calcularon los porcentajes de recuperación en las purificaciones que partimos de lisado celular, en este caso la emisión de fluorescencia fue corregida restando la emisión de fluorescencia del buffer buffer Tris 50 mM, EDTA 2 mM.

### **3.7.4 Optimización de resuspensión de fracción precipitada.**

Se realizó la precipitación del E30-eGFP en condiciones de 0,6 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , durante 15 minutos, a 25°C. Para la resuspensión de la fracción precipitada, M3, se exploraron las siguientes condiciones.

*Control*: resuspensión en buffer Tris 50 mM, EDTA 2 mM, durante 10 minutos en hielo.

*ON a 4°C*: resuspensión ON a 4°C

*DTT*: Adicionalmente a la incubación ON a 4°C, se agregó DTT 1 mM concentración final.

*Sonicado en baño de agua*: Adicionalmente a la incubación ON a 4°C, la M3 fue sonicada por 10 minutos en baño de agua Ultrasonic 8848 (Cole-Parmer).

El porcentaje de recuperación del E30-eGFP fue determinado como se indica en la sección 3.7.3.

#### Incorporación del centrifugado en frío

Luego de resuspender el pellet producto de la precipitación, se realizó una centrifugación a 4°C (centrifugado en frío o “*cold spin*” (CS)). En la fracción soluble de esta centrifugación permanece el ELP-proteína (M3) y en el pellet las proteínas contaminantes incapaces de resolubilizarse (CS), mejorando así la pureza de la muestra (54).

### **3.7.5 Adición de ELP exógeno como facilitador de precipitación**

Un ELP exógeno de 110 repeticiones fue producido en *E. coli* y se purificó mediante 3 ciclos de transición inversa. La concentración del mismo fue calculada según la Ley de Lambert-Beer:  $A = \epsilon bc$ , donde A es la absorbancia medida a 280 nm,  $\epsilon$  es la absorbividad molar calculada a partir de

la secuencia aminoacídica utilizando EXPASY (<http://www.expasy.org/proteomics>), b es el camino óptico de la celda (1 cm), y c la concentración incógnita. Del valor de concentración obtenido estimamos que un 80% corresponde al ELP exógeno.

El ELP fue agregado a 1 mL de cada sobrenadante de cultivo de *L. tarentolae* expresando el E30-eGFP o el E-bFSH de manera tal de obtener concentraciones finales de 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M. Al control no se le adicionó ELP exógeno. Las precipitaciones fueron realizadas utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M, 15 minutos a 25°C.

La evaluación de la precipitación de E30-eGFP utilizando un ELP exógeno como *carrier* de precipitación fue realizada mediante *Western blot* con anticuerpos anti GFP y mediante medición de intensidad de fluorescencia de eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm). En el caso del E-bFSH la precipitación se evaluó mediante Western blot con anticuerpos anti-FSH.

## **3.8 Procedimientos analíticos para la detección de la bFSH y la eGFP recombinantes**

### **3.8.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó en geles al 12% de acrilamida. Las muestras se trataron con buffer de carga (buffer 6X: Tris 62,5 mM pH 6,8; con 2 % (p/v) dodecilsulfato de sodio (SDS); 10 % (v/v) glicerol y 0,01 % (p/v) azul de bromofenol) con el agregado de DTT (6X: 50mM) y se calentaron a 100°C durante 5 minutos previo a su siembra en el gel. Los geles se resolvieron a una corriente constante de 50 mA y fueron teñidos con Azul de Coomassie G-250 preparado al 0,12 % (p/v) en solución acuosa de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 10 % (p/v) y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 % (p/v), previo al uso se agrega etanol al 20% (v/v). Se utilizó  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para desteñir.

### **3.8.2 Western blot**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, GE) aplicando una corriente constante de 50 mA overnight ON, en baño de

hielo y empleando buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20% (v/v) pH 8.3). La membrana se bloqueó mediante incubación durante 1 hora en PBS conteniendo 5% (p/v) de leche en polvo descremada y 0,1% tween 20 (PBSL-T) a temperatura ambiente y en agitación (60 RPM). Se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno y con agitación a 80 RPM con PBS con 0,1% tween 20 (PBS-T). Para la detección de la bFSH, se incubó la membrana de PVDF durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario polyclonal de conejo anti-bFSH (4561-5279, Bio-Rad) diluido 1:1000 en PBS-L-T. Para la detección de eGFP, se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo anti-GFP (chromotek pabg1) diluido 1:1000 y se incubó la membrana ON a 4°C. A continuación, se realizaron 2 lavados con PBS-T y la membrana se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (212324, Invitrogen) diluido 1:40000 en PBS-L-T. Finalmente se realizaron 4 lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno. La detección de la banda específica se realizó poniendo de manifiesto la actividad peroxidasa mediante quimioluminiscencia empleando el kit Amersham ECL reagents siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare) y las imágenes fueron capturadas empleando el equipo Amersham ImageQuant™.

### **3.8.3 Fluorimetría**

Para el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de los clones se dispensaron alícuotas de 200 µL de los cultivos en placas Greiner F-bottom Chimney well- PP 96 well y se midió la intensidad de fluorescencia de la proteína eGFP (excitación: 488 nm / emisión: 507 nm), y/o la intensidad de fluorescencia de la proteína reportera Cherry (excitación: 590 nm / emisión: 610 nm) utilizando el espectrofluorímetro Varioskan™ (Thermo Scientific).

### **3.8.4 Citometría de flujo**

Para el vector inducible y sin señal de secreción, que expresa la eGFP y Cherry de forma citosólica, la selección de clones fue realizada mediante citometría de flujo utilizando el equipo Attune Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Se colectaron 10.000 eventos en el *gate* seleccionado en el gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC) vs. dispersión lateral (SSC) y se excluyeron dobletes en gráfico FSC altura vs. FSC ancho de pulso. Sobre estas células se evaluó la intensidad de fluorescencia de eGFP (excitación: 488 nm / emisión: 515-545 nm) y Cherry (excitación: 561

nm / emisión: 613-628 nm). El análisis de los datos se hizo con el software FlowJov.7.6.5 (BD Biosciences).

### **3.8.5 ELISA FSH**

Las concentraciones de bFSH presente en los sobrenadantes de cultivo o en muestras de los diferentes pasos de purificación se cuantificaron por kit de ELISA (del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) específico para FSH bovina (KA2278, Abnova). Se trata de un ELISA que utiliza un anticuerpo policlonal de ratón anti-bFSH inmovilizado en la placa de microtitulación y un anticuerpo anti-FSH acoplado a la peroxidasa de rábano (del inglés Horseradish peroxidase, HRP). Las determinaciones se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante y realizando cada medida por duplicado. Brevemente, se incubaron los estándares y las muestras en la placa durante 2 horas a 37 °C. Luego de esta incubación, se procedió a lavar la placa una vez con buffer de lavado. Luego se incubó durante 1 hora a 37°C en presencia del anticuerpo conjugado a HRP. Pasado este tiempo se lavó la placa cinco veces con solución de lavado y se agregó la solución sustrato 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB). Se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y luego se agregó HCl 2 N para detener la reacción enzimática. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific, USA). Para la cuantificación de la hormona se realizó una curva estándar graficando los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones del estándar de referencia proporcionado por el kit expresadas en ng FSH/mL. Posteriormente se estimó la concentración de cada muestra por interpolación de la curva estándar.

### **3.8.6 Espectrometría de masa**

Las bandas obtenidas en la purificación de ELP-eGFP fueron escindidas del gel de poliacrilamida para ser analizadas por espectrometría de masa (MS) por personal de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UBYPA) del Institut Pasteur de Montevideo (IPM).

### **3.8.7 Herramientas informáticas**

En este trabajo recurrimos habitualmente a información disponible en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para el

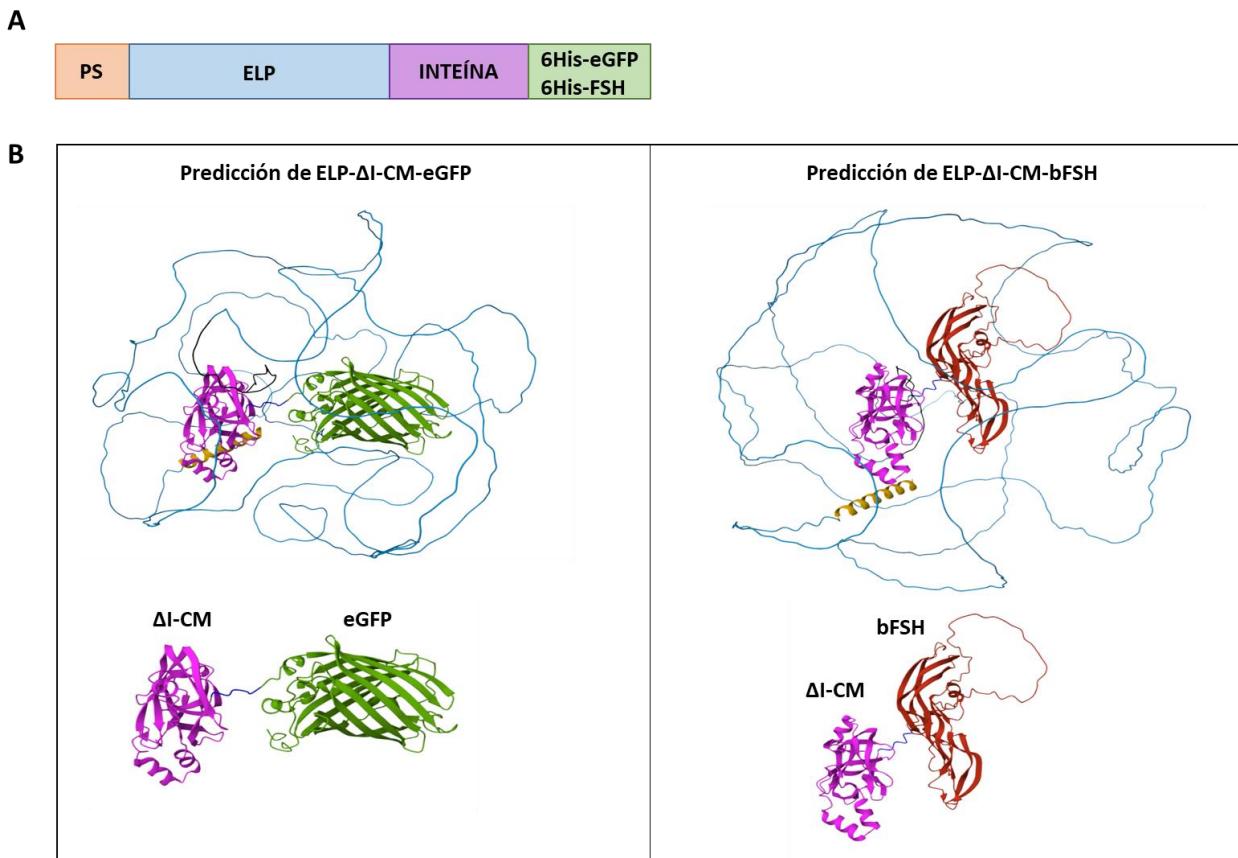
análisis de secuencias de proteínas recurrimos a herramientas accesibles a través del sitio EXPASY (<http://www.expasy.org/proteomics>). Para el análisis de las secuencias utilizamos el sitio Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Para el diseño de cebadores utilizamos el OligoAnalyzer™ Tool de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Los gráficos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism (v.5, GraphPad Software, EUA). Las imágenes de los vectores fueron creadas utilizando el programa SnapGene™ (1.1.3, SnapGene Software, EUA). La predicción de la estructura tridimensional de la proteína de fusión fue realizada utilizando AlphaFold2.ipynb–Colab, v1.5.5 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=kOblAo-xetgx>) (80).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Generación de construcciones de ADN para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a ELP\_ΔI-CM

Para la expresión en *L. tarentolae* de proteínas recombinante fusionadas a ELP\_ΔI-CM se utilizaron como base dos vectores comerciales que permiten la secreción de la proteína recombinante; 1) pLEXSY-Hyg2 (73), vector constitutivo con integración genómica sitio-dirigida y 2) pLEXSY\_1E-blecherry4 (74), vector episomal, bicistrónico e inducible. En este vector la expresión del gen de interés se encuentra bajo el control de un promotor inducido por tetraciclina y permite también la co-expresión de la proteína fluorescente Cherry como reportero, facilitando el monitoreo de la inducción y la selección de clones con alta producción. En estos dos vectores se clonaron las secuencias de ADN codificantes para las proteínas de interés precedidas por la inteína ΔI-CM y el polipéptido ELP como etiquetas de purificación. Como proteínas modelo fueron utilizadas la eGFP y bFSH, etiquetadas con una secuencia de 6 histidinas para facilitar su detección de ser necesario (**Figura 20.A**). La eGFP se trata de una proteína de bajo peso molecular (25 kDa) que no afecta la fisiología celular, presenta una gran estabilidad frente a diferentes condiciones fisicoquímicas (temperatura, pH, fuerza iónica) y resiste la acción de proteasas. Al tratarse de una proteína fluorescente su expresión puede ser monitoreada de manera directa. Por otra parte, la bFSH es una proteína con actividad endocrina (hormona) y compuesta por dos subunidades que son blanco de glicosilación. Su complejidad estructural y su peso molecular supera al de la eGFP. Por su rol en el proceso de maduración folicular, esta proteína reviste un gran interés en el ámbito de la salud reproductiva animal y humana. Para ambas proteínas se cuenta con ensayos sencillos, de reactividad a anticuerpos específicos y fluorescencia para detectar o evaluar la actividad de las mismas. Con el fin de visualizar la disposición espacial de la proteína de fusión expresada por *L. tarentolae*, se realizó la predicción de la estructura del ELP-ΔI-CM-bFSH y ELP-ΔI-CM-eGFP expresados utilizando AlphaFold (**Figura 20.B**). Considerando la disposición espacial entre las proteínas a expresar y la inteína, se puede observar que la actividad de la misma no se vería comprometida. No se detectan uniones inespecíficas, entre inteína y eGFP/bFSH, entre ELP y eGFP/bFSH, ni entre inteína/ELP ya que, de

ser fuertes o múltiples, estos podrían afectar los procesos de purificación y funciones de cada una de ellas.



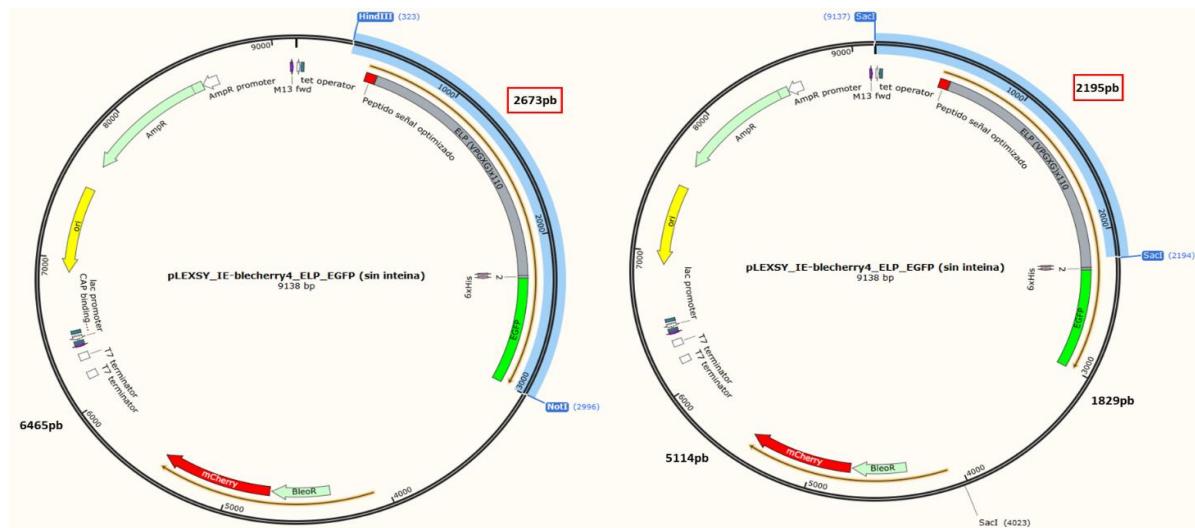
**Figura 20. Esquema de las construcciones de ADN para la expresión de la proteína de fusión y predicción de las estructuras proteicas. A)** Esquema de las construcciones. PS: Péptido de secreción, ELP: polipéptido tipo elastina, INTEÍNA: ΔI-CM, 6His-eGFP y 6His-FSH: proteínas blanco fusionadas a etiqueta de 6 histidinas. **B)** Predicción de estructura de la proteína de fusión en AlphaFold v1.5.5. Se muestra el modelo AlphaFold del ELP (en celeste), ΔI-CM (en rosado), eGFP (en verde), bFSH (en rojo) y PS (en amarillo).

Las secuencias correspondientes al ELP y la inteína ΔI-CM se obtuvieron del vector pET/EI-CAT desarrollado por Banki y colaboradores (51), la secuencia codificante para eGFP del vector pEGFP-C3 (76) y la de la bFSH del vector pLEXSY-Hyg2 FSH (77). La estrategia inicial de clonado consistió en diseñar cebadores para insertar estas secuencias en los correspondientes vectores de expresión, mediante la técnica de *Restriction-free cloning* (RF) (81). Sin embargo, tras varios intentos modificando diferentes condiciones, no se logró el clonado de las secuencias de interés.

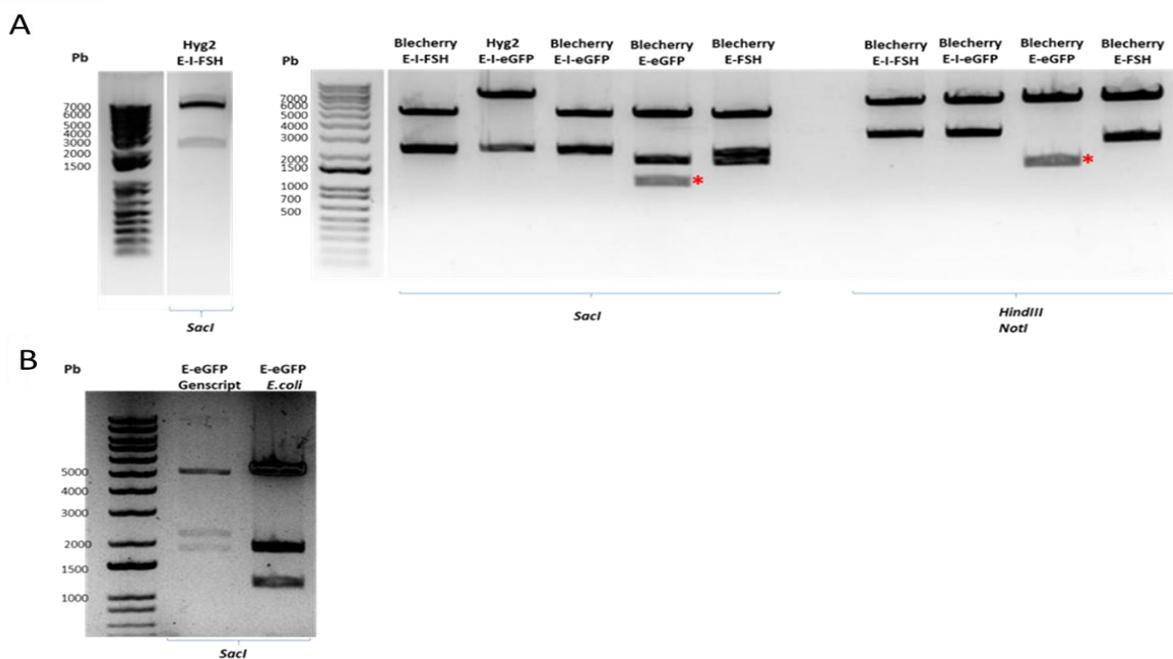
Las dificultades encontradas en la utilización de una técnica de clonado basada en PCR probablemente se deban a la naturaleza repetitiva de la secuencia de ELP, así como a su alto contenido en nucleótidos GC (69,6%). Por este motivo se optó por solicitar a la empresa Genescrypt® la generación de las siguientes construcciones (pLEXSY-Hyg2\_E-I-eGFP, pLEXSY-Hyg2\_E-I-FSH, Blecherry\_E-I-FSH y Blecherry\_E-I-eGFP) (**Anexo 2**). Ante la eventualidad de encontrar dificultades en la utilización de la inteína  $\Delta$ I-CM en el contexto de *L. tarentolae* se solicitó también la delección de la inteína en los vectores inducibles (vectores finales Blecherry\_E-FSH y Blecherry\_E-eGFP) de manera tal de poder contar con vectores donde las proteínas de interés solo estuvieran fusionadas a la etiqueta de ELP.

Los plásmidos recibidos de GenScript fueron amplificados en *E. coli* y se analizó su perfil de digestión con enzimas de restricción. Posteriormente fueron secuenciados, buscando cubrir las secuencias codificantes para ELP, inteína y eGFP o FSH según correspondiera.

Para todos los plásmidos se obtuvo el patrón de restricción esperado, excepto para el vector Blecherry\_E-eGFP. La digestión de este vector con las enzimas *Hind*III y *Not*I debía dar lugar a dos fragmentos de 2673 pb y 6465 pb (**Figura 21**), pero en lugar de la banda de 2673 pb se obtuvo una de menor tamaño (1500 pb aproximadamente). En el mismo sentido, en la digestión con la enzima *Sac*I se esperaba la escisión de este vector en tres fragmentos de 1829 pb, 2195 pb y 5114 pb, sin embargo, en lugar de la banda de 2195 pb se obtuvo una de 1100 pb aproximadamente (**Figura 22.A**). En ambas digestiones esos fragmentos de menor tamaño estarían presentando una delección de unos 1100-1200 pb aproximadamente que parecería corresponder a una porción del ELP. Esta delección ocurrió durante la amplificación del vector en *E. coli* ya que el plásmido original de Genscript presenta el patrón de digestión esperado (**Figura 22.B**). La naturaleza repetitiva y extensión del ELP hace difícil secuenciarlo completamente para confirmar su extensión, pero fue posible cubrir el final del ELP y el principio de eGFP, verificando la integridad de esta zona. En base a la diferencia en el tamaño de los fragmentos obtenidos en las digestiones, se estima que esta construcción tendría unos 30 repetidos de ELP en lugar de 110.

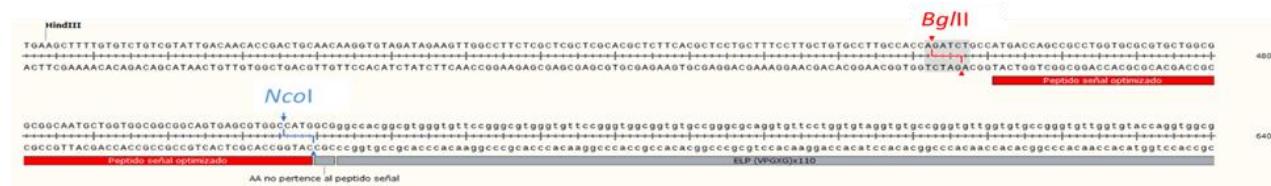


**Figura 21. Esquema del vector Blecherry\_E-eGFP.** Se muestran los sitios de corte y el tamaño molecular de los correspondientes fragmentos obtenidos al digerir con *Hind*III y *Not*I (izquierda) y *Sac*I (derecha). En celeste se resaltan los fragmentos que presentaron un tamaño molecular menor al esperado.



**Figura 22. Verificación de identidad de plásmidos mediante análisis de restricción con endonucleasas.**  
Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Pb: marcador de peso molecular 1kb. **A)** Digestión de plásmidos con enzimas *SacI*, *HindIII* y *NotI*. Los asteriscos rojos indican fragmentos que no presentan el tamaño esperado. **B)** Digestión con *SacI* del plásmido original de Genscript Blecherry E-eGFP y el mismo luego de amplificación en *E. coli* cepa SURE.

Posteriormente, se generaron vectores que permiten la expresión del sistema ELP e inteínas más eGFP en el citoplasma de *L. tarentolae*. Para ello, la secuencia que codifica para el péptido señal fue removida mediante digestión con las enzimas de restricción *Bg*/II y *Ncol* en los plásmidos inducible y constitutivo conteniendo E-I-eGFP, así como también del plásmido inducible sin inteína, E-eGFP, como se detalla en la sección 3.2.1 (**Figura 23**). Mediante secuenciación, se verificó en los tres plásmidos que la delección del péptido señal no alteró el marco de lectura.



**Figura 23. Sitio de corte de enzimas para la delección del péptido de secreción.** En rojo se indica la secuencia correspondiente al péptido de secreción, flanqueado por los sitios de corte para *Bg*/II y *Ncol*, presente en los vectores pLEXSY-Hyg2 y pLEXSY\_IE-blecherry4.

En la **Tabla 2** se listan todos los vectores de expresión para *L. tarentolae* generados.

**Tabla 2.** Construcciones disponibles para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a inteína ΔI-CM y/o etiqueta de ELP en *L. tarentolae*.

Nombre de la construcción	Abreviatura	Péptido señal	Proteína de interés	Etiqueta	Inteína	Sistema de expresión
pLEXSY-Hyg2_ELP-Inteína-FSH	Hyg2_E-I-FSH	SI	FSH	ELP	ΔI-CM	Constitutivo
pLEXSY_IE-blecherry4_ELP-Inteína-FSH	Blecherry_E-I-FSH		FSH	ELP		Inducible
pLEXSY-Hyg2_ELP-Inteína-eGFP	Hyg2_E-I-eGFP		eGFP	ELP		Constitutivo
pLEXSY_IE-blecherry4_ELP-Inteína-eGFP	Blecherry_E-I-eGFP		eGFP	ELP		Inducible
pLEXSY_IE-blecherry4_ELP_30-eGFP	Blecherry_E30-eGFP		eGFP	ELP (30 repetidos)	Sin inteína	Inducible
pLEXSY_IE-blecherry4_ELP-eGFP	Blecherry_E-eGFP		eGFP	ELP		Inducible
pLEXSY_IE-blecherry4_ELP-FSH	Blecherry_E-FSH		FSH	ELP		Inducible
pLEXSY-Hyg2_Cito_ELP-Inteína-eGFP	Hyg2_Cito_E-I-eGFP	NO	eGFP	ELP	ΔI-CM	Constitutivo
pLEXSY_IE-blecherry4_Cito_ELP-Inteína-eGFP	Blecherry_Cito_E-I-eGFP		eGFP	ELP		Inducible
pLEXSY_IE-blecherry4_Cito_ELP-eGFP	Blecherry_Cito_E-eGFP		eGFP	ELP	Sin inteína	Inducible

## 4.2 Generación de líneas de *L. tarentolae* expresando de manera constitutiva e inducible las construcciones recombinantes.

### 4.2.1 Transfección de *L. tarentolae* LOC con vectores de expresión constitutiva Vector Hyg2\_E-I-FSH

Como resultado de la transfección de la cepa LOC de *L. tarentolae* con el vector Hyg2\_E-I-FSH, se obtuvieron clones cuya expresión de bFSH fue evaluada por ELISA específico para la misma. El primer ensayo se realizó con muestras de sobrenadantes de cultivo de 24 clones crecidos en placa

de 24 pocillos (**Tabla 3**). Con los 4 clones que mostraron mayor expresión de FSH, se repitió el ensayo a partir de sobrenadantes de cultivos realizados en botellas de 25 cm<sup>2</sup> (**Tabla 4**). De este modo, se seleccionó al clon B6 para posteriores ensayos de purificación por presentar los mayores niveles de producción de FSH.

**Tabla 3.** Cuantificación de FSH en los sobrenadantes de cultivo de clones de *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-FSH. El nivel de FSH fue evaluado por ELISA y normalizado en función de OD de cada cultivo. En celeste se muestran los clones seleccionados para un segundo ensayo.

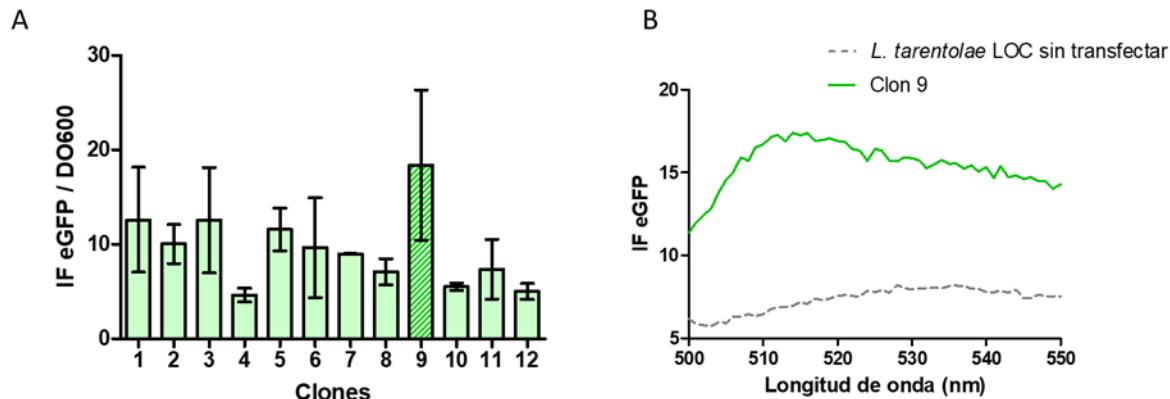
		Clones de <i>L.tarentolae</i> Hyg2_E-I-FSH																							
[ng FSH/ml]/ DO 600		A1	A2	A3	A4	A5	<b>A6</b>	B1	B2	<b>B3</b>	B4	B5	<b>B6</b>	C1	C2	C3	C4	<b>C5</b>	<b>C6</b>	D1	D2	D3	D4	D5	D6
		39	65	26	12	35	<b>82</b>	36	48	<b>71</b>	14	46	<b>148</b>	60	45	16	28	49	<b>64</b>	31	11	47	47	43	58

**Tabla 4.** Cuantificación de FSH de los sobrenadantes de cultivo de 4 clones de *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-FSH que mostraron mayor producción de FSH. El nivel de FSH fue evaluado por ELISA y normalizado en función de la OD de cada cultivo. En celeste se indica el clon seleccionado para estudios posteriores.

		Clones de <i>L.tarentolae</i> Hyg2_E-I-FSH			
[ng FSH/ml]/ DO 600		A6	B3	<b>B6</b>	C6
		140	107	<b>166</b>	91

### Vector Hyg2\_E-I-eGFP

Como resultado de la transfección de la cepa LOC de *L. tarentolae* con el vector Hyg2\_E-I-eGFP se obtuvieron 12 clones, en los cuales se evaluó la intensidad de fluorescencia de la proteína eGFP por fluorimetría. Este ensayo se replicó para los 12 clones y se seleccionó al clon 9 para posteriores estudios por presentar mayor nivel de expresión de eGFP (**Figura 24.A-B**).



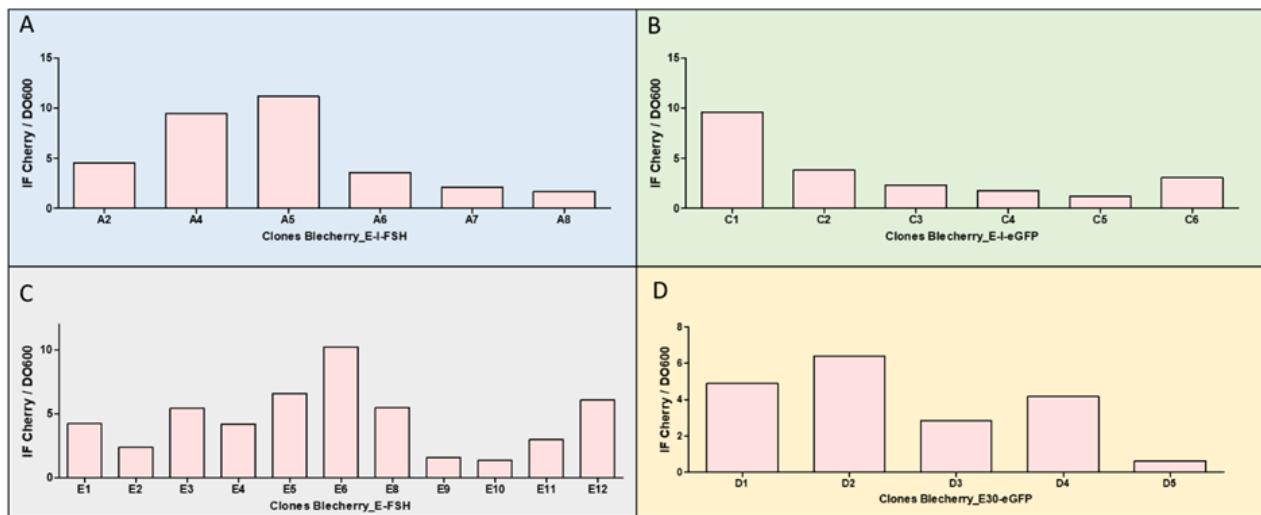
**Figura 24. Análisis fluorométrico de clones de *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-eGFP. A)** Intensidad de fluorescencia (IF) de la eGFP (excitación = 488 nm y emisión = 507 nm) normalizado en función de la OD de cada cultivo. Se grafica el promedio y la desviación estándar correspondiente a dos ensayos independientes. **B)** Espectro de emisión de fluorescencia de eGFP para el clon 9 seleccionado y control sin transfectar (excitación = 488 nm y emisión = scan de 500 a 550 nm).

#### 4.2.2 Transfección de *L. tarentolae* T7-TR con vectores de expresión inducible

##### Vectores Blecherry E-I-FSH, Blecherry E-FSH, Blecherry E-I-eGFP y Blecherry E30-eGFP

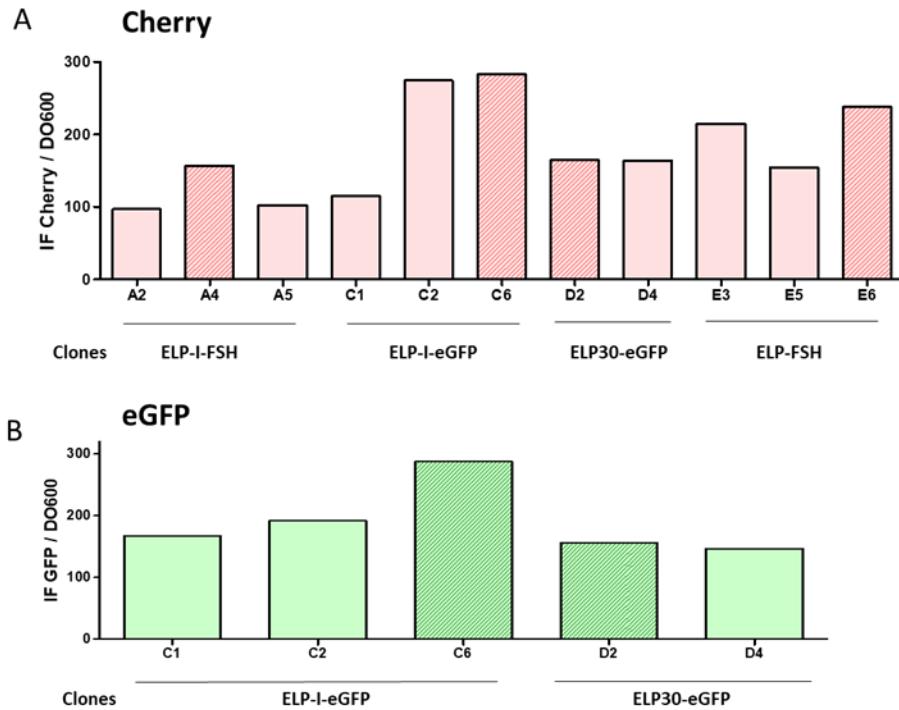
La cepa de *L. tarentolae* T7-TR está modificada genéticamente para expresar constitutivamente la ARN polimerasa del bacteriófago T7, la cual transcribe una proteína represora (TR) que se une al operador TET del vector de expresión, inhibiendo la transcripción del gen de interés. Al agregar tetraciclina, ésta se une con alta afinidad a la TR, induciendo un cambio conformacional en la misma que la suelta de la secuencia operadora, permitiendo que la polimerasa se una libremente a la secuencia promotora contigua y tenga lugar la transcripción de las secuencias codificantes para la proteína de interés y la proteína reportera Cherry.

La selección de clones portando los vectores inducibles (Blecherry\_E-I-FSH, Blecherry\_E-FSH, Blecherry\_E-I-eGFP y Blecherry\_E30-eGFP) se realizó cuantificando en fluorímetro la intensidad de fluorescencia emitida por la proteína reportera Cherry (excitación 590 nm / emisión 610 nm) en cultivos de 1 mL inducidos en placa de 24 pozos (**Figura 25.A-D**).



**Figura 25. Análisis fluorimétrico de clones de *L. tarentolae* con expresión inducible de transgenes.** La intensidad de fluorescencia (IF) de Cherry (excitación = 590 nm y emisión = 610 nm) se normalizó en función de la OD de cada cultivo. Las letras seguidas de número indican los diferentes clones. **A)** clones Blecherry\_E-I-FSH. **B)** clones Blecherry\_E-I-eGFP. **C)** clones Blecherry\_E-FSH. **D)** clones Blecherry\_E30-eGFP.

Los tres clones de cada construcción que presentaron mayor intensidad de fluorescencia (normalizada por la densidad óptica) fueron cultivados en placas de 6 pozos (3 mL) y se realizó un segundo experimento de inducción. Se determinó la intensidad de fluorescencia de Cherry y, cuando correspondiera, también la de eGFP. En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron los clones A4 (Blecherry\_E-I-FSH), E6 (Blecherry\_E-FSH), C6 (Blecherry\_E-I-eGFP) y D2 (Blecherry\_E30-eGFP) (**Figura 26**).

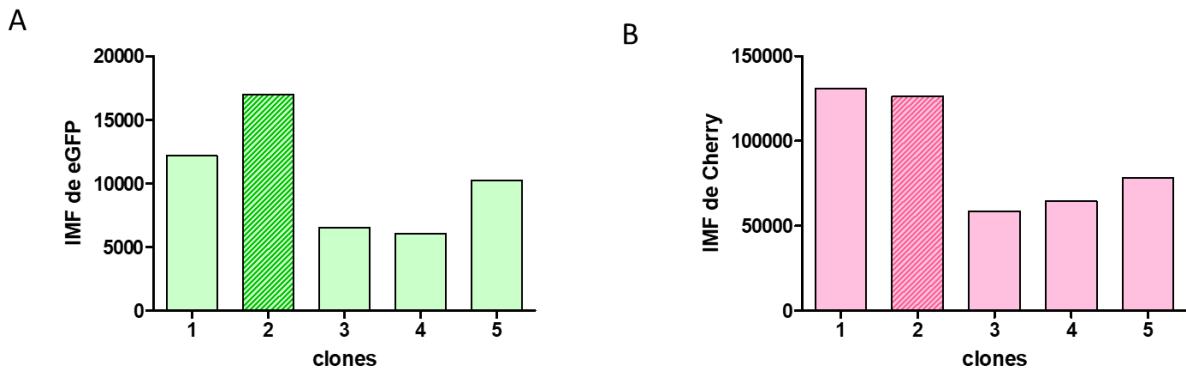


**Figura 26. Análisis fluorométrico de clones de *L. tarentolae* con expresión inducible de transgenes. A)** Intensidad de fluorescencia (IF) de Cherry (excitación = 590 nm y emisión = 610 nm) normalizada por OD de clones Blecherry\_E-I-FSH, Blecherry\_E-I-eGFP, Blecherry\_E-FSH y Blecherry\_E30-eGFP. **B)** IF de la eGFP (excitación = 488 nm y emisión = 507 nm) normalizada por OD de clones Blecherry\_E-I-eGFP y Blecherry\_E30-eGFP.

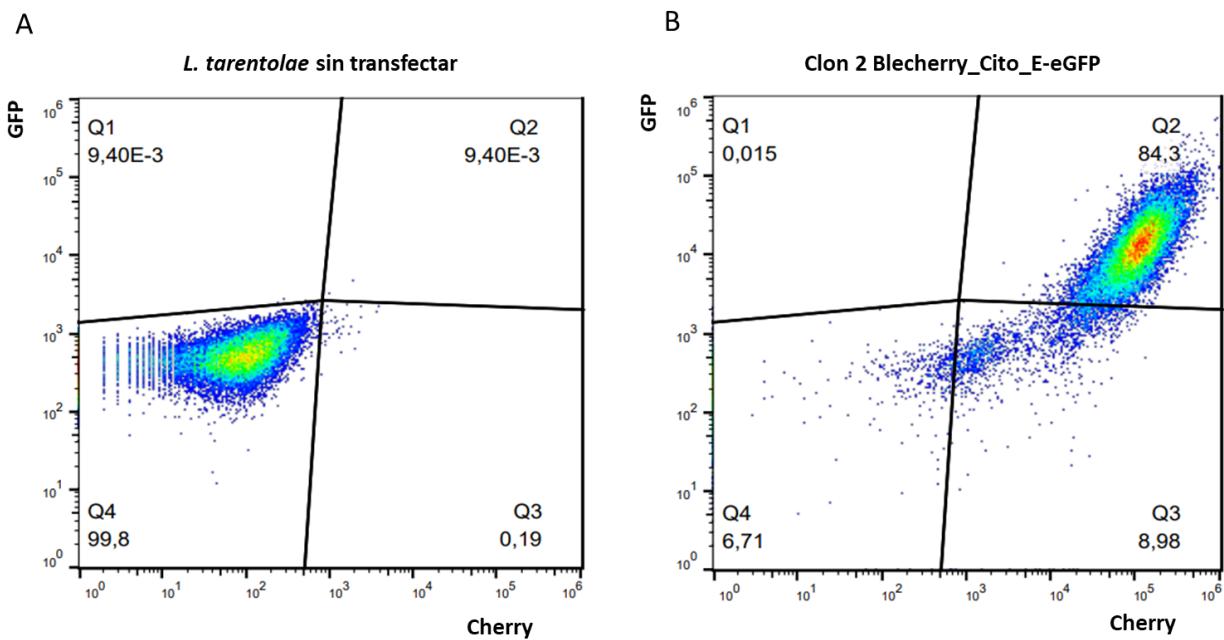
#### Vector Blecherry Cito E-eGFP

La selección de clones sin péptido señal, Blecherry\_Cito\_E-eGFP se realizó mediante análisis de citometría de flujo, aprovechando que ambas proteínas fluorescentes quedan retenidas en el citoplasma celular. El clon 2 presentó los mayores niveles de intensidad media de fluorescencia (IMF) de la eGFP, y niveles elevados de fluorescencia de Cherry (**Figura 27**).

En la **Figura 28** se muestra un gráfico de puntos representativo del análisis de citometría para la fluorescencia emitida por las proteínas eGFP y Cherry en muestras de cultivo correspondientes al clon 2.



**Figura 27. Análisis de la intensidad media de fluorescencia de los clones Blecherry\_Cito\_E-eGFP evaluados por citometría de flujo.** Los números en el eje x indican los clones. **A)** Resultados de intensidad media de fluorescencia (IMF) de todas las células positivas para eGFP. **B)** Resultados de IMF de todas las células positivas para Cherry.



**Figura 28. Gráfico de puntos de fluorescencia de las proteínas Cherry y eGFP evaluada por citometría de flujo.** eGFP (excitación: 488 nm / emisión: 515-545 nm) y Cherry (excitación: 561 nm / emisión: 613-628 nm). **A)** Control negativo: *L. tarentolae* sin transfectar. **B)** Clon 2, Blecherry\_Cito\_E-eGFP inducido con tetraciclina.

En la **Tabla 5** se listan todas las construcciones expresadas en *L. tarentolae* y los clones seleccionados.

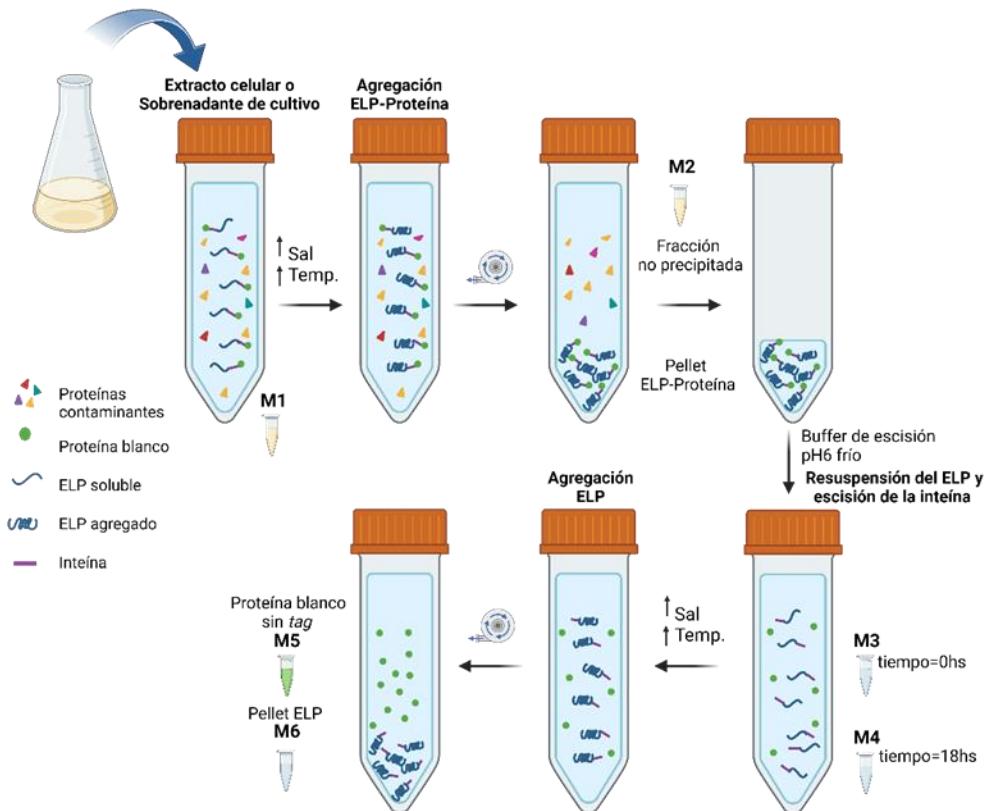
**Tabla 5.** Líneas celulares de *L. tarentolae* generadas y clones seleccionados para estudio en esta tesis.

Abreviatura Construcción	Cepa <i>L. tarentolae</i>	Clon	Péptido señal	Proteína de interés	Etiqueta	Inteína	Sistema de expresión
Hyg2_E-I-FSH	LOC	B6	SI	FSH	ELP	ΔI-CM	Constitutivo
Blecherry_E-I-FSH	T7/TR	A4		FSH	ELP		Inducible
Hyg2_E-I-eGFP	LOC	B9		eGFP	ELP		Constitutivo
Blecherry_E-I-eGFP	T7/TR	C6		eGFP	ELP		Inducible
Blecherry_E30-eGFP	T7/TR	D2		eGFP	ELP (30 repetidos)	Sin inteína	Inducible
Blecherry_E-FSH	T7/TR	E6		FSH	ELP		Inducible
Blecherry_Cito_E-eGFP	T7/TR	Dcyto 2	NO	eGFP	ELP	Sin inteína	Inducible

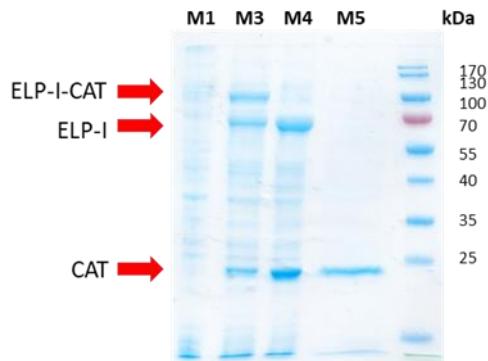
### 4.3 Purificación de proteínas por el método de ciclado de transición inversa

En primera instancia, con el fin de adquirir experiencia en el método de purificación mediante ciclado de transición inversa (**Figura 29**), se reprodujo el proceso de purificación de la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT) desarrollado por Banki y colaboradores (48) empleando *E. coli* como sistema de expresión. La proteína recombinante CAT fusionada a un ELP de 110 repetidos y a la inteína ΔI-CM (E-I-CAT, 90 kDa) se logró precipitar mediante incubación a 30°C durante 10 minutos en presencia de 1,5 M de NaCl. Como ha sido previamente reportado, es habitual observar que durante este proceso parte de la proteína recombinante experimenta una escisión prematura, liberando CAT de la etiqueta E-I (M3, **Figura 30**). Luego, este precipitado se resuspendió en buffer pH 6 a 4°C para favorecer la reacción de escisión mediada por la inteína (M4, **Figura 30**). Finalmente, al realizar otra ronda de precipitación se eliminó el ELP y otros contaminantes que precipitan en estas condiciones. En el sobrenadante se pudo observar la presencia de una proteína con peso molecular aparente similar al esperado para la proteína CAT

libre (26 kDa) (M5, **Figura 30**). En conclusión, se llevó a cabo exitosamente la purificación por ciclado de transición inversa y liberación mediada por  $\Delta$ I-CM para un sistema modelo (E-I-CAT).



**Figura 29. Esquema del método de purificación mediante ciclado de transición inversa y corte mediado por inteína.** El aumento de temperatura y/o la adición de sal [NaCl o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] al sobrenadante o lisado celular contenido una proteína de fusión a ELP (M1) desencadena la transición de fase, provocando la agregación de esta proteína. La centrifugación de la muestra separa la fusión ELP agregada (M3) de otras proteínas contaminantes (M2) («centrifugación en caliente»). La proteína de fusión ELP agregada en el pellet se re solubiliza en buffer frío, pH 6 que promueve el corte de la inteína liberándose la proteína de interés del ELP (M4). El agregado de sal y aumento de temperatura promueve el agregado del ELP libre. A este paso le sigue un centrifugado en caliente, que separa el ELP, en el pellet (M6), de la proteína libre que permanece en solución (M5). Imagen generada utilizando el programa Biorender.

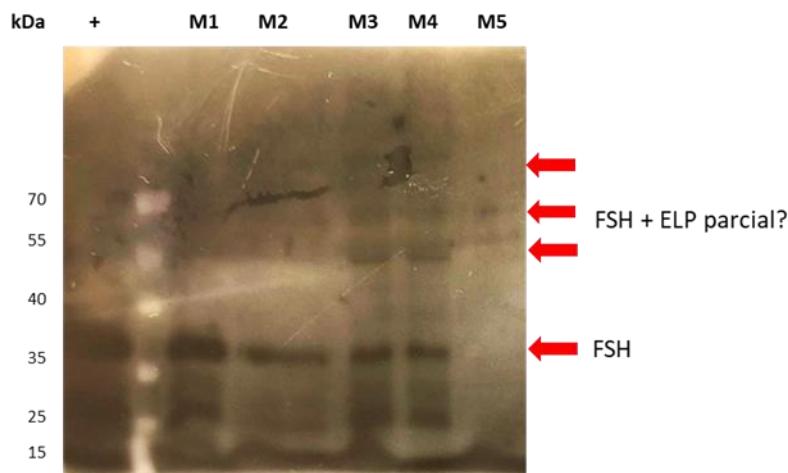


**Figura 30. Evaluación de la purificación de E-I-CAT por ciclado de transición inversa.** Las flechas rojas indican el peso molecular esperado para la CAT libre, la asociada a ELP-I y el ELP-I libre. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. **M1:** Extracto total de proteínas. **M3:** fracción precipitada. **M4:** fracción precipitada luego de 18 hs en condiciones de corte de la inteína. **M5:** CAT libre purificada del ELP escindido.

#### 4.3.1 Proteínas eGFP y FSH fusionadas a ELP<sub>ΔI</sub>-CM secretadas al medio de cultivo

Posteriormente, se realizó la primera prueba de purificación de E-I-FSH producida en *L. tarentolae* en forma constitutiva (Hyg2\_E-I-FSH), cuyo resultado se evaluó mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico para FSH (Figura 31). La precipitación se llevó a cabo incubando a 30°C durante 10 minutos en presencia de NaCl 1,5 M como sal precipitante. Tanto en el sobrenadante de cultivo de *L. tarentolae* como en la fracción precipitada no se observó la presencia de una banda con un peso molecular aparente compatible con E-I-FSH (91,6 kDa; Figura 31). En cambio, se evidenció a la FSH libre, sin la etiqueta de ELP, lo cual indicaría que se estaría produciendo el corte prematuro de la inteína (fracción M1). Luego de realizar la precipitación con NaCl y temperatura se observa la banda de FSH libre (~37 kDa) en la fracción M2, que corresponde a las proteínas que se mantienen en solución, así como en la fracción precipitada (M3 y M4), lo cual sugiere que las condiciones empleadas favorecen la precipitación de parte de la FSH libre. En el material precipitado además se evidenciaron bandas de unos 55, 70 y 90 kDa que podrían corresponder a la FSH asociada a distintos fragmentos de ELP o agregados de FSH

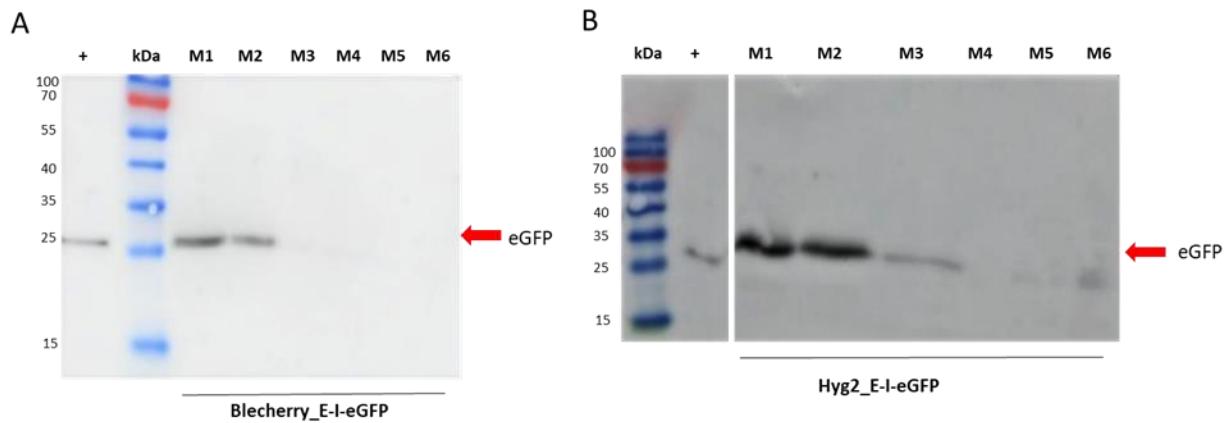
los cuales se encuentran en baja proporción en el sobrenadante y solo son visibles luego de concentrarse por precipitación.



**Figura 31. Evaluación de la purificación de E-I-FSH por ciclado de transición inversa.** Imagen de membrana de Western blot revelada con anticuerpo anti FSH, donde las flechas rojas indican la FSH libre y la FSH agregada o asociada a distintos fragmentos de ELP. +: FSH pura (control positivo), **M1**: Sobrenadante de cultivo de *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-FSH. **M2**: fracción soluble luego de precipitar ELP. **M3**: fracción precipitada. **M4**: Alícuota a las 18hs de corte de la inteína. **M5**: fracción soluble luego de segunda precipitación.

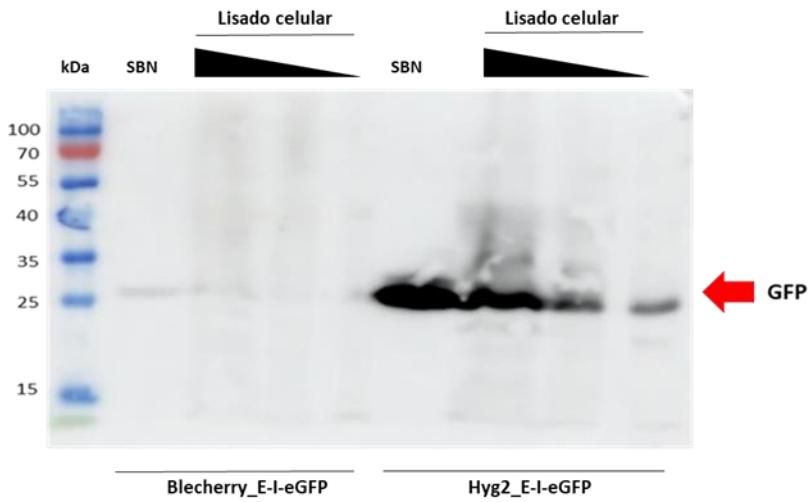
Las mismas condiciones de purificación se aplicaron a sobrenadantes de cultivo de *L. tarentolae* expresando de forma constitutiva o inducible la construcción de E-I-eGFP. En este caso, se empleó un anticuerpo específico para GFP en el análisis por Western blot (**Figura 32.A-B**). Para ambos clones se observó en las muestras de sobrenadante de cultivo la presencia de una banda con un peso molecular aparente (PM) similar al de la eGFP libre, sin la etiqueta de ELP, lo cual evidencia que también para esta construcción se estaría produciendo el corte prematuro de la inteína (**Figura 32.A-B**, fracción M1). Luego de realizar la precipitación con NaCl a 30°C, en la fracción M2 que corresponde a las proteínas que se mantienen en solución, se observa una banda de eGFP libre. En la fracción M3 y M4, en la cual se concentran las proteínas que precipitan en las condiciones evaluadas, no se visualizaron bandas del PM esperado para la construcción completa ni la eGFP libre (92,4 kDa y 26,9 kDa respectivamente). A diferencia de lo observado

para FSH (**Figura 31**), la mayor parte de la GFP libre no precipita bajo condiciones de fuerza iónica elevada.



**Figura 32. Evaluación de purificación de E-I-eGFP por ciclado de transición inversa.** Imágenes de Western blot revelado con anticuerpo anti-GFP correspondientes a: **A)** *L. tarentolae* clon inducible, Blecherry\_E-I-eGFP. **B)** *L. tarentolae* clon constitutivo, Hyg2\_E-I-eGFP. +: control positivo de GFP, **M1**: Sobrenadante de cultivo de E-I-eGFP. **M2**: fracción soluble luego de precipitar. **M3**: fracción precipitada. **M4**: Alícuota a 18 hs de corte de la inteína. **M5**: fracción soluble luego de la segunda precipitación. **M6**: fracción precipitada luego de segunda precipitación.

Con el fin de evaluar si el corte de la inteína ocurría a nivel intracelular previo a la secreción de las proteínas al medio extracelular, evaluamos por Western blot lisados celulares de ambos clones. La presencia de una banda de PM compatible con la eGFP no etiquetada en los lisados celulares (**Figura 33**) muestra claramente que la construcción sufre un corte altamente eficiente a nivel intracelular.

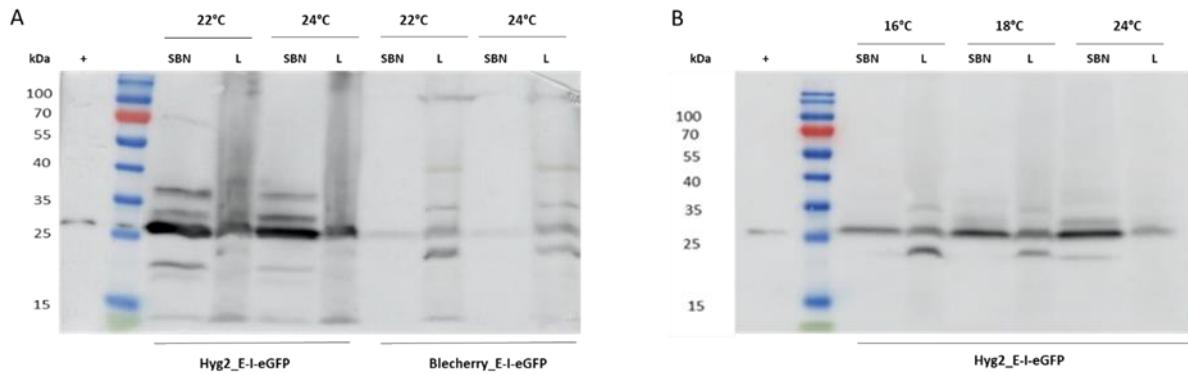


**Figura 33. Evaluación de E-I-eGFP intracelular y secretada.** Western blot con anticuerpo anti-GFP del sobrenadante (SBN) y distintos volúmenes de lisado celular de *L. tarentolae* Blecherry\_E-I-eGFP y *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-eGFP.

Ha sido descrito que la actividad proteolítica de la inteína  $\Delta$ I-CM es inducida por un descenso del pH y el aumento de temperatura (69). El pH del medio de cultivo se monitoreó y mostró mantenerse estable a valores superiores a 7,3, por lo que la variable en la cual podemos incidir es en la temperatura de cultivo. Con los clones productores de E-I-eGFP se realizaron ensayos variando éste parámetro y evaluando la integridad de la construcción recombinante mediante técnica de Western blot con anticuerpo anti-GFP.

En primer lugar, se estudió el efecto en la actividad autoproteolítica de disminuir la temperatura de cultivo de 26°C a 24°C y 22°C. En estas condiciones se verificó mediante observación al microscopio un buen estado y motilidad celular, aunque la proliferación celular se vió enlentecida ya que las OD mostraron una relación directa con la temperatura de cultivo: Hyg2\_E-I-eGFP a 22°C se alcanzó una OD 4,35 mientras que a 24°C una OD 5,43. Blecherry\_E-I-eGFP a 22°C una OD 0,96 y a 24 °C una OD 1,03. En muestras de los cultivos realizados a menores temperaturas se detectaron, tanto en sobrenadantes como en lisados celulares, además de la eGFP libre bandas que presentaron un PM mayor al de la eGFP no etiquetada (**Figura 34.A**). En principio esto sugiere una menor eficiencia de corte por parte de la inteína al reducir en al menos dos grados la temperatura de cultivo. Dado que el clon de *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-eGFP mostró una mayor tasa de proliferación y nivel de expresión a menor temperatura es que fue seleccionado para ensayos

de crecimiento a 18°C y 16°C. Estas últimas condiciones no resultaron en un incremento marcado en la proporción de bandas de mayor PM que la eGFP no etiquetada respecto a la alcanzada a una temperatura de cultivo de 24°C (**Figura 34.B**).



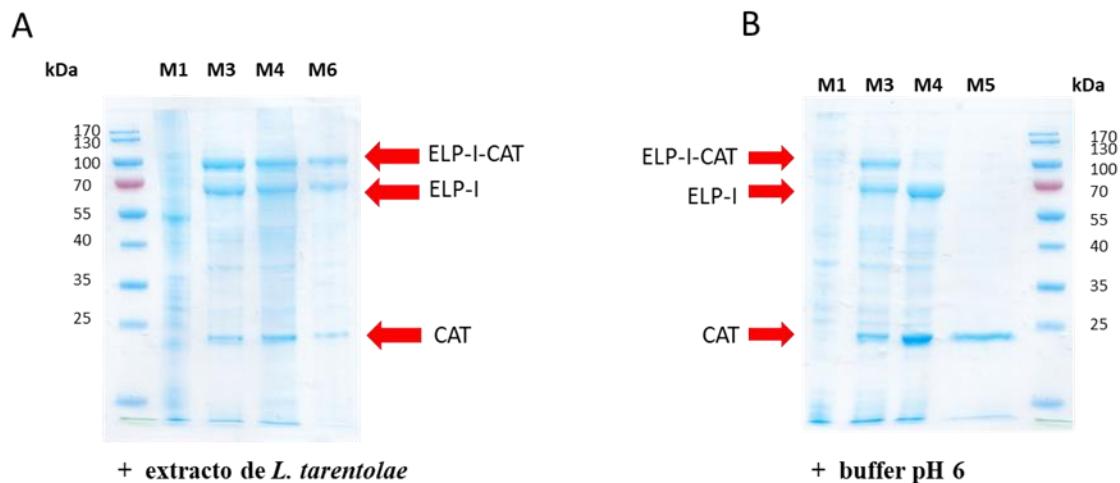
**Figura 34. Efecto de la disminución de la temperatura de cultivo de *L. tarentolae* en la producción de E-I-eGFP en el sobrenadante e interior celular. A)** Western blot para GFP de muestras de sobrenadante (**SBN**) y lisado celular (**L**) para *L. tarentolae* Blecherry\_E-I-eGFP y *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-eGFP cultivadas a 22°C y 24°C. +: control positivo GFP. **B)** Western blot para GFP de muestras de sobrenadante (**SBN**) y lisado celular (**L**) de *L. tarentolae* Hyg2\_E-I-eGFP cultivada a 24°C, 18°C y 16°C. +: Control positivo GFP.

Por otro lado, las diferencias relativas en la cantidad de proteína de interés secretada y retenida a nivel intracelular guardan una relación directa con la temperatura de cultivo y con el hecho que la secreción de proteínas es un proceso activo que requiere de energía. En ese sentido, se observa que a medida que la temperatura de cultivo disminuye es menor la proporción de proteína secretada (**Figura 34.B**). Los resultados de densitometría de las bandas mostradas en la figura 34.B indican que la relación de proteína en sobrenadante y en el lisado desciende de 4,0 a 24°C, 2 a 18°C y de 1 a 16°C.

En resumen, estos estudios indican que el descenso de temperatura de cultivo solo evita de manera parcial y poco significativa el corte prematuro de la inteína a nivel intracelular.

Ya que no hay reportes previos de la expresión de proteínas fusionadas a la inteína  $\Delta$ I-CM en *L. tarentolae* decidimos evaluar si la escisión de la inteína es desencadenada por algún componente intracelular de este protozoario. Con este objetivo se evaluó el efecto de un extracto celular de *L. tarentolae* en la proteína recombinante CAT producida en *E. coli* y que está fusionada a un ELP

de 110 repetidos y a la inteína  $\Delta$ I-CM (E-I-CAT). La E-I-CAT presente en el extracto de *E. coli* se precipitó en las condiciones descritas anteriormente. Una fracción del precipitado se resuspendió en extracto de *L. tarentolae* a pH 8,8 (fracción M4 **Figura 35.A**) y otra fracción en las condiciones óptimas de corte de la inteína a pH 6 (fracción M4 **Figura 35.B**). Luego de incubar por 18 horas a temperatura ambiente no se evidenció el corte de E-I-CAT en presencia del extracto de celular de *L. tarentolae* ya que no se observó una disminución en la intensidad de la banda de E-I-CAT ni un incremento en la intensidad de la E-I ni de CAT libre respecto a la fracción M3. Estos cambios que indican escisión de la inteína, sí se evidenciaron en presencia de buffer pH 6 (**Figura 35.B**).

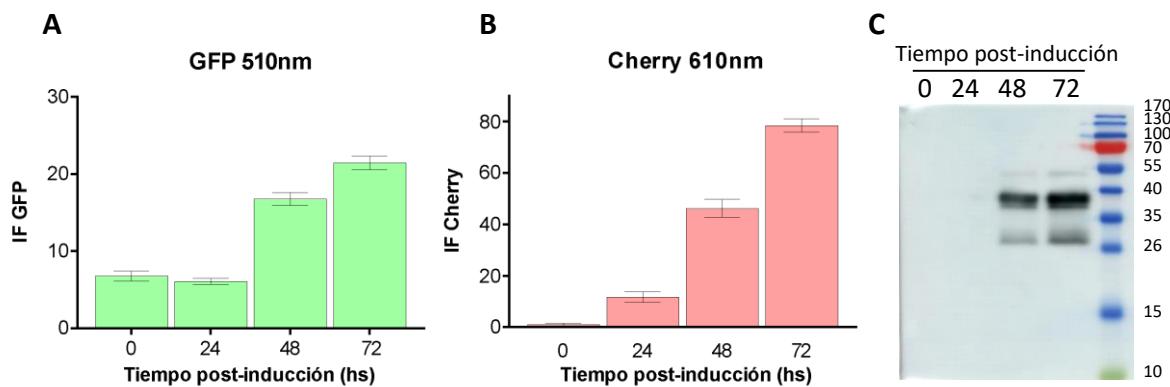


**Figura 35. Análisis por SDS-PAGE de la proteína ELP-I-CAT producida en *E. coli* e incubada con un extracto celular de *L. tarentolae*. A)** Evaluación de la integridad de ELP-I-CAT en presencia de un extracto celular de *L. tarentolae*. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Las flechas rojas indican el peso molecular esperado para la CAT libre, asociada a ELP-I y para el ELP-I libre. **M3:** fracción precipitada. **M4:** fracción precipitada e incubada 18 hs junto con el extracto de *L. tarentolae*. **M6:** Pellet de precipitación de ELP en fracción M4, resuspendido en PBS 1X. **B)** Evaluación del corte de ELP-I-CAT en presencia de buffer pH 6. **M3:** fracción precipitada. **M4:** fracción precipitada e incubada 18 hs a pH 6. **M5:** fracción soluble luego de precipitar ELP en fracción M4 (CAT libre).

### 4.3.2 Proteína eGFP fusionada a ELP secretada al medio de cultivo

#### 4.3.2.1 Optimización de las condiciones de expresión del E30-eGFP secretado

Dado los resultados obtenidos, donde no se encontraron condiciones fisicoquímicas que minimicen la escisión prematura de la inteína, se continuó trabajando con las construcciones etiquetadas con ELP pero sin la inteína con el fin de poner a punto el proceso de precipitación mediado por el ELP expresado en *L. tarentolae*. Con el propósito de obtener la mayor cantidad de proteína posible se optimizó el tiempo de inducción. Luego de realizar la inducción de los cultivos se tomaron alícuotas de cultivo a las 24, 48 y 72 hs y el estado de los parásitos se controló mediante observación al microscopio. Los niveles de eGFP y Cherry fueron evaluados mediante fluorimetría y también Western blot para la eGFP.



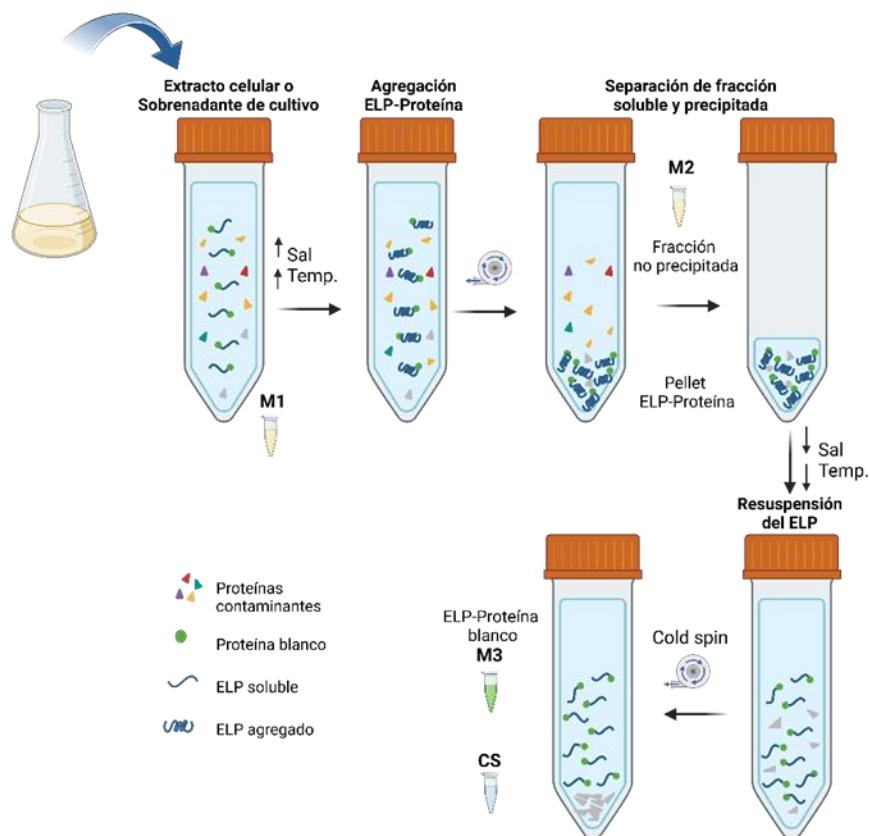
**Figura 36. Expresión de E30-eGFP secretado.** Muestras del sobrenadante de cultivo obtenidos a las 0, 24, 48 y 72hs post inducción analizadas por fluorimetría para **A**) eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm) y **B**) Cherry (excitación 590 nm, emisión a 610 nm), y por **C**) Western blot con anticuerpo anti-GFP. En A y B se grafica el promedio y desviación estándar de dos réplicas.

Los datos de intensidad de fluorescencia y análisis por Western blot muestran un incremento progresivo de los niveles de eGFP durante el curso del cultivo, alcanzando niveles mayores a las 72 hs post inducción (**Figura 36.A y C**). En el caso de la proteína reportera Cherry, cuya expresión es citoplasmática, también se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia con el correr de las horas, con un nivel máximo a las 72hs de inducción (**Figura 36.B**). En el Western blot de los

sobrenadantes de cultivo de E30-eGFP se observa una banda mayoritaria del tamaño esperado (40 kDa) y una baja proporción de eGFP libre (**Figura 36.C**).

#### 4.3.2.2 Precipitación del ELP en clon *L. tarentolae* Blecherry\_E30-eGFP

A las construcciones con etiqueta de ELP sin inteína se les aplicó el método de purificación mediante ciclado de transición inversa que se esquematiza en la **figura 37**. A continuación se describe la optimización de distintos parámetros de este proceso.



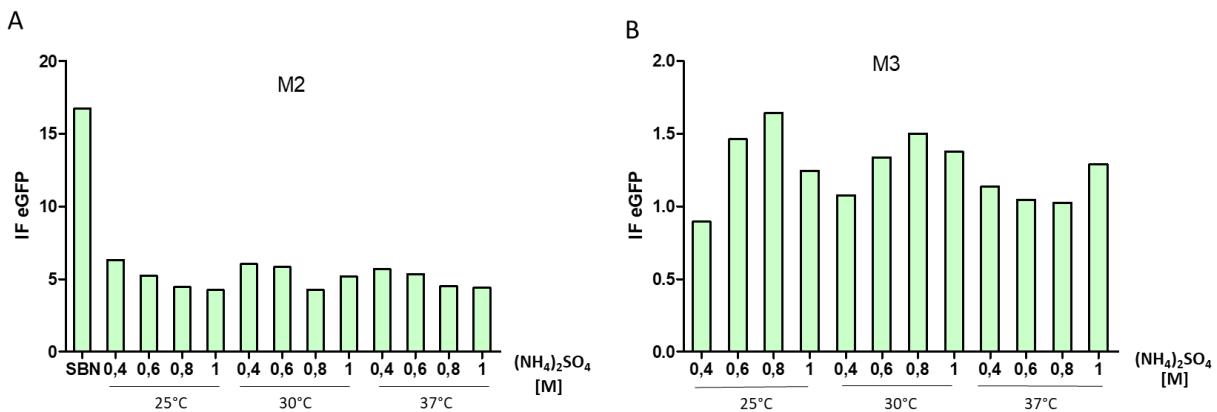
**Figura 37. Esquema del método de purificación mediante ciclado de transición inversa para las construcciones sin inteína.** El aumento de temperatura y la desolvatación del medio por agregado de sal [NaCl o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] al sobrenadante de cultivo (**M1**) con una proteína de fusión ELP desencadena la transición de fase, provocando la agregación de la proteína fusionada a ELP. La centrifugación de la muestra separa la fusión ELP-proteína agregada de otros contaminantes (**M2**) («centrifugación en caliente»). La proteína de fusión ELP agregada en el pellet se disuelve en buffer con baja carga salina y frío, seguido de una centrifugación a 4 °C («Cold Spin»). En la fracción soluble de esta centrifugación permanece la fusión ELP-proteína (**M3**) y en el pellet las proteínas incapaces de resolubilizarse (**CS**).

#### 4.3.2.3 Efecto de la temperatura y concentración salina en la precipitación de ELP

Con el propósito de optimizar las condiciones de precipitación del ELP en la construcción E30-eGFP que cuenta con un ELP estimado de 30 repetidos, se realizó una matriz de prueba que evaluó diferentes concentraciones salinas y temperaturas tal como se describe en la **Tabla 6**. Como sal precipitante se utilizó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ya que, según reportes posteriores al trabajo de Banki y colaboradores (52), esta sal es más eficiente en la precipitación del ELP que el NaCl (57). Se tomaron alícuotas de la fracción soluble (M2) e insoluble (M3) en todos los casos. Las muestras fueron evaluadas por fluorimetría (**Figura 38**) y Western blot utilizando anticuerpos anti GFP (**Figura 39**).

**Tabla 6.** Condiciones evaluadas para la precipitación del E30-eGFP.

Temperatura (°C)	Concentración $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M)
25	0.4
	0.6
	0.8
	1.0
30	0.4
	0.6
	0.8
	1.0
37	0.4
	0.6
	0.8
	1.0

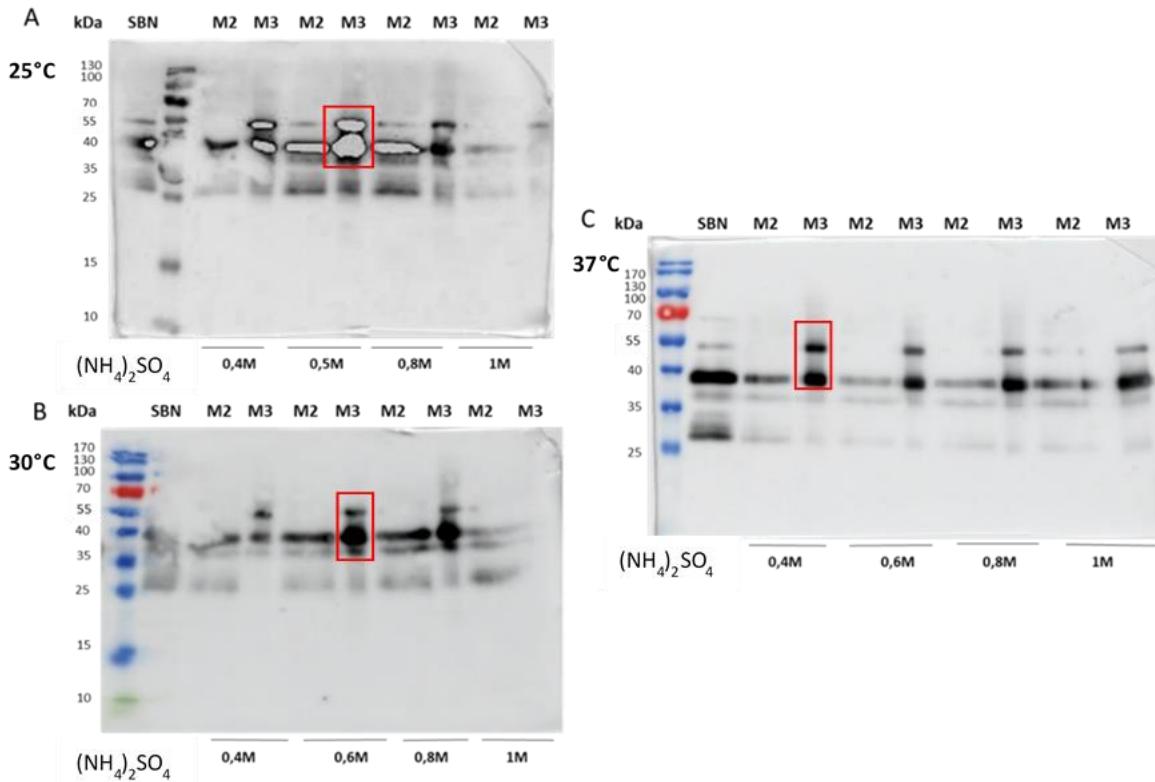


**Figura 38. Evaluación del proceso de precipitación del ELP30-eGFP bajo diferentes condiciones.** Se incubó el sobrenadante de cultivo del clon Blecherry\_E30-eGFP a diferentes temperaturas (25°C, 30°C y 37°C) por 15 minutos en presencia de concentraciones crecientes de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se evaluó la Intensidad de fluorescencia (IF) emitida por eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm) en distintas fracciones. **A)** IF de eGFP en el sobrenadante de cultivo (**SBN**) y la fracción no precipitada (**M2**). **B)** IF eGFP en la fracción precipitada (**M3**).

Los resultados de emisión de fluorescencia para eGFP a 510 nm, tanto para la fracción no precipitada, M2, como para la fracción precipitada, M3, indican que esta construcción, no muestra un cambio drástico en la precipitación al variar la temperatura y concentración salina. En todas las temperaturas hay una disminución de la eGFP en la fracción soluble (M2) al ir aumentando la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (**Figura 38.A**). Al evaluar los niveles de eGFP en la fracción precipitada (M3) tanto a 25°C como a 30°C se observa una tendencia a aumentar la eGFP precipitada al ir aumentando la concentración  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta 0,8 M. Llamativamente a 1 M de esta sal, el nivel de eGFP recuperada en la M3 disminuye (**Figura 38.B**). Probablemente esta disminución no se deba a una menor precipitación de la proteína, teniendo en cuenta los valores observados en las fracciones no precipitadas M2 (**Figura 38.A**), sino a una mayor dificultad para resolubilizarla. Aumentando la temperatura de precipitación a 37°C no mejora los rendimientos de agregación.

El análisis de estas fracciones por Western blot para GFP mostró concordancia con los resultados de fluorescencia de eGFP (**Figura 39**). Se observa una banda mayoritaria del PM esperado para

E30-eGFP (40 kDa) así como una banda de mayor peso molecular (55 kDa) y eGFP libre de etiqueta (26,9 kDa). A partir de las imágenes obtenidas se puede observar que no hay cambios drásticos al variar la concentración salina y que las concentraciones intermedias del precipitante dan lugar a mejores rendimientos (recuadros rojos **Figura 39**).

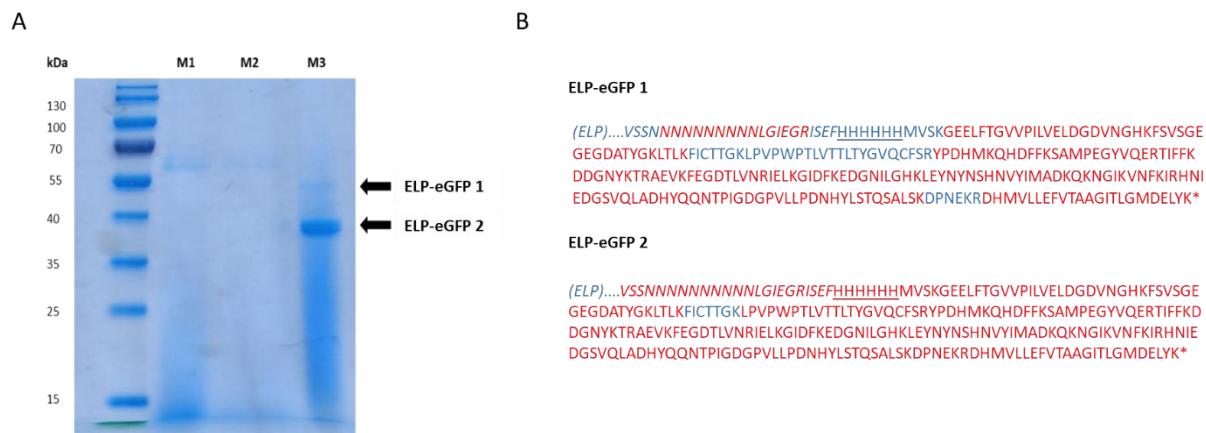


**Figura 39. Evaluación de la precipitación del ELP30-eGFP bajo diferentes condiciones, mediante Western blot con anticuerpo anti GFP de.** Se analizaron muestras de las fracciones M2 y M3 de los ciclos de precipitación del ELP30-eGFP durante 15 minutos, a diferentes concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y temperaturas. **A)** 25°C, **B)** 30°C, y **C)** 37°C. **SBN:** Sobrenadante de cultivo. **M2:** fracción soluble luego de precipitar ELP. **M3:** fracción insoluble luego de precipitar ELP.

#### 4.3.2.4 Identificación de la proteína purificada por espectrometría de masa

Se seleccionó la condición de precipitación a 30°C y 0,6 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y para proceder a escalar el proceso con un volumen de 25 mL de sobrenadante. La eficiencia del proceso se analizó por

SDS-PAGE, observándose una banda mayoritaria de 40 kDa y una minoritaria de 55 kDa aproximadamente (**Figura 40.A**). Estas bandas fueron escindidas del gel y sometidas a mapeo peptídico mediante tratamiento con tripsina y análisis por espectrometría de masa, identificándose en ambas muestras la presencia de eGFP con grado de cobertura de 97% y 84% de la secuencia aminoacídica (**Figura 40.B**). Cabe mencionar que la secuencia de ELP no tiene sitios de corte para tripsina (u otras proteasas) por lo que no es posible observar fragmentos peptídicos derivados del mismo.



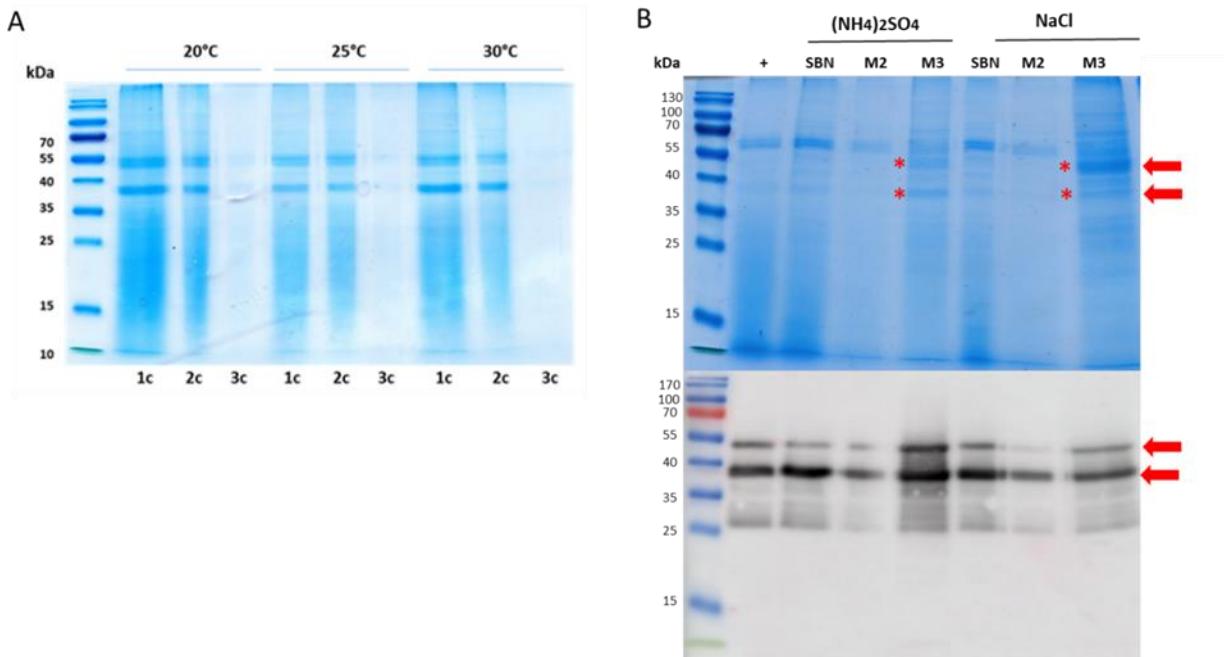
**Figura 40. Evaluación de la purificación de ELP-eGFP expresada por *L. tarantolae* Blecherry\_E30-eGFP e identificación por espectrometría de masa. A) SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie. M1: Sobrenadante de cultivo. M2: fracción no precipitada (0,6 M sulfato de amonio y 30°C). M3: fracción precipitada y resuspendida en 100 µl de PBS-1X. B) Análisis por espectrometría de masa de las bandas ELP-eGFP 1 y 2 purificadas del gel. Secuencia de eGFP precedida de 6 repetidos de Histidina (subrayados), secuencia espaciadora (italica), y ELP. Se muestran en letra roja los péptidos identificados en cada banda y en azul los aminoácidos que no fueron detectados.**

#### 4.3.2.5 Efecto del número de ciclos de precipitación en el grado de pureza

A continuación, se evaluó el efecto en el rendimiento de pureza de realizar varios ciclos consecutivos de precipitación. Además, se ensayó si con la disminución de la temperatura de precipitación a 25°C y 20°C, se observaba una menor precipitación de proteínas inespecíficas. Se trabajó con sobrenadante de cultivo del clon Blecherry\_E30-eGFP haciendo de 1 a 3 ciclos de

precipitación del ELP y analizando las fracciones precipitadas (M3) por SDS-PAGE (**Figura 41.A**). Pudo evidenciarse, que con la realización de más ciclos de precipitación no se aumenta significativamente la pureza de la muestra y con un tercer ciclo se pierde gran parte de la fusión E30-eGFP. Estos resultados fueron similares en las tres temperaturas de precipitación evaluadas, lo cual muestra que en la precipitación a 20°C se obtuvieron niveles de recuperación y pureza similares. Esto permite ampliar el rango de condiciones de precipitación que podrían aplicarse a proteínas blanco más sensibles a éste parámetro.

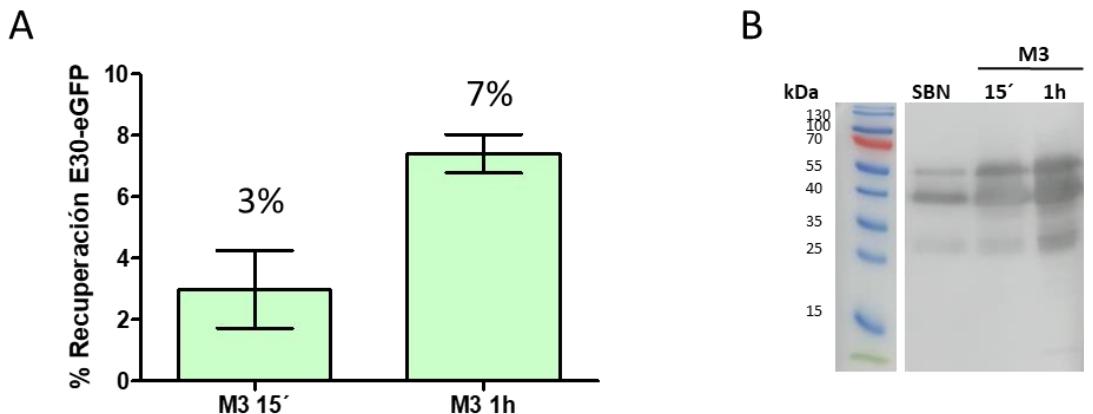
Como mencionamos anteriormente, el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ha sido descrito como mejor precipitante de ELP en comparación al NaCl, lo que permite disminuir la temperatura de precipitación. Del mismo modo el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  podría ser más eficiente precipitando otras proteínas del sobrenadante de *L. tarentolae*, por lo qué evaluamos la pureza y rendimiento obtenidos con ambas sales. Se evaluó la precipitación del E30-eGFP utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M como precipitante a 25°C y del NaCl 1,5 M a 30°C. Según los resultados del Western blot con anticuerpos anti-eGFP y en el SDS-PAGE, se obtuvo una mayor cantidad y pureza de la proteína de interés con el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en comparación al NaCl (**Figura 41.B**).



**Figura 41. Evaluación del número de ciclos y sal precipitante en la purificación de E<sub>30</sub>-eGFP expresado por *L. tarentolae* Blecherry\_E30-eGFP. A)** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Se trabajó con 1 a 3 ciclos (c) de precipitación del ELP [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 M, 15 minutos] a 20°C, 25°C y 30°C. **B)** Panel superior, SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y panel inferior Western blot con anticuerpos anti GFP utilizando dos sales como precipitantes, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 M a 25°C o NaCl 1,5 M a 30°C. +: Control positivo E30-eGFP. **SBN:** Sobrenadante de cultivo. **M2:** Sobrenadante luego de precipitar ELP. **M3:** E30-eGFP precipitado y resuspendido. Las flechas y asteriscos rojos indican las dos bandas principales de E-eGFP.

#### 4.3.2.6 Efecto del tiempo de precipitación en la recuperación de ELP

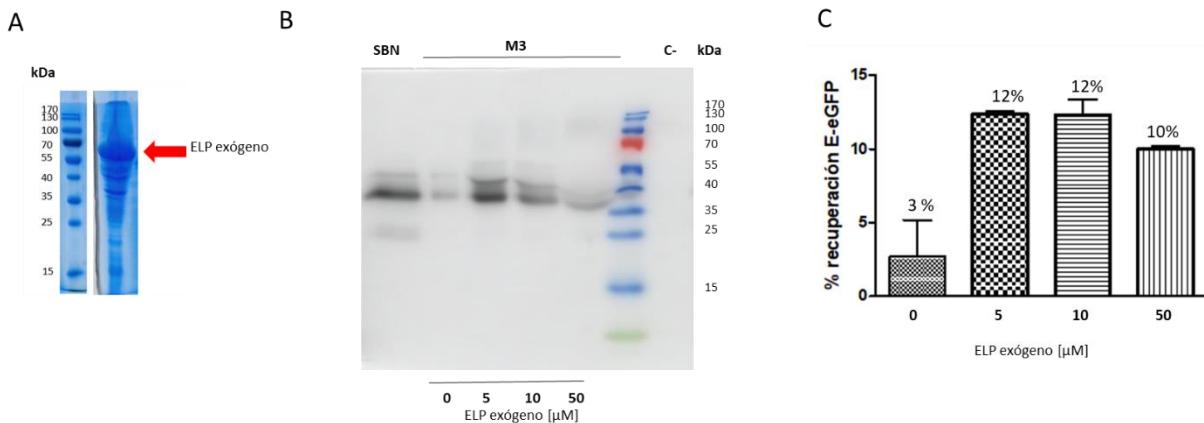
Habiendo observado que en la fracción soluble (M2) aún queda gran parte de la proteína de interés sin precipitar se buscó incrementar el porcentaje de recuperación de la proteína en la fracción precipitada (M3). Para ello se evaluó el efecto de aumentar el tiempo de precipitación. Utilizando sulfato de amonio 0,6 M a temperatura 25°C y precipitando durante 15 minutos se recupera un 3% del E30-eGFP, mientras que precipitando durante 1 hora se recuperó un 7% (**Figura 42.A**). Tanto por medición de fluorescencia como por Western blot (**Figura 42.B**), se evidenció un incremento en la precipitación del E30-eGFP al aumentar el tiempo de precipitación a 1 hora.



**Figura 42. Evaluación del tiempo de precipitación de E30-eGFP.** Condiciones de precipitación: 0,6 M sulfato de amonio, a 25°C, 15 minutos o 1 hora. **A)** Porcentaje de recuperación de E30-eGFP calculado a partir de medición de fluorescencia de eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm) en fracción precipitada (M3) respecto al sobrenadante. Se muestra el promedio y desviación estándar de réplicas. **B)** Western blot con anticuerpos anti GFP. **SBN:** Sobrenadante de cultivo. **M3:** Fracción precipitada de E30-eGFP durante 15 minutos y 1 hora.

#### 4.3.2.7 Uso de ELP exógeno como catalizador del proceso de precipitación

La producción de proteínas recombinantes mediante su secreción al medio de cultivo presenta varias ventajas, como permitir la producción de proteínas glicosiladas, no requerir la lisis de las células y facilitar su purificación ya que el medio de cultivo tiene una baja concentración proteica en relación al interior celular. Como contrapartida, la proteína secretada se diluye considerablemente en el medio de cultivo. Dado que los niveles de expresión de la proteína de interés no fueron elevados, el efecto de dilución en el sobrenadante puede estar afectando la eficiencia de la precipitación. La concentración previa del sobrenadante por ultrafiltración no mejoró los rendimientos de precipitación dado que se perdía proteína por adsorción a la membrana de filtración. Por lo que se evaluó la utilización de un ELP exógeno como “carrier” para favorecer el proceso (55). Un ELP exógeno de 110 repeticiones fue producido en *E. coli* y se purificó por ciclado de transición inversa (**Figura 43.A**). Utilizando este ELP a una concentración de 5, 10 y 50  $\mu$ M y sulfato de amonio 0,6 M a 25°C, se logró incrementar de 3 a 12 el porcentaje de recuperación del E30-eGFP (**Figura 43.B-C**). De las concentraciones de ELP exógeno ensayadas, 5  $\mu$ M parecería ser la más adecuada.

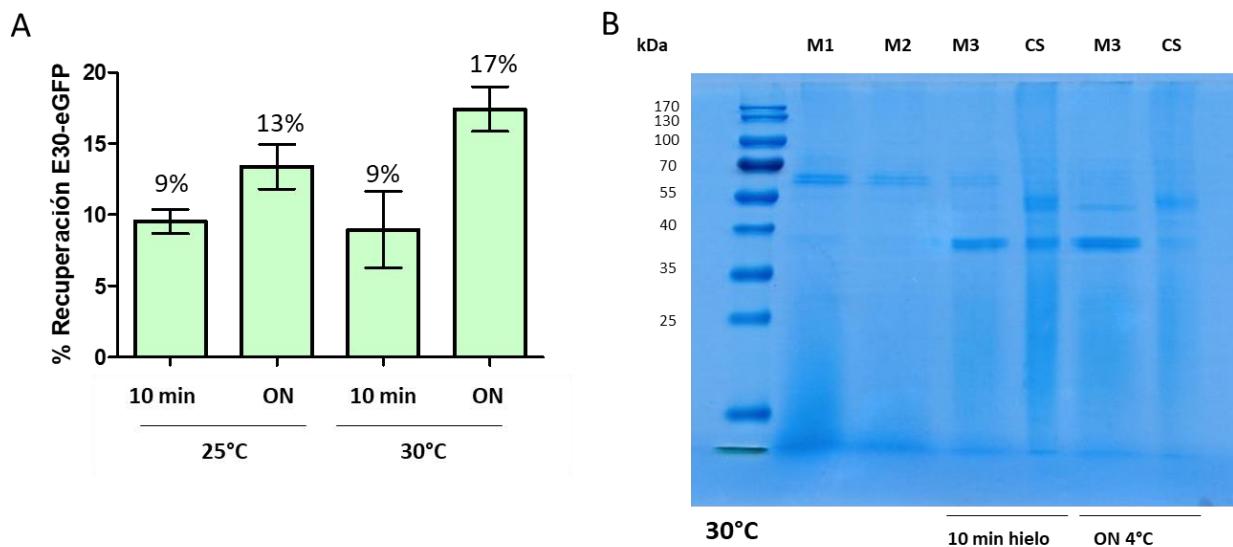


**Figura 43. Evaluación de la precipitación de E30-eGFP utilizando un ELP exógeno como catalizador de la precipitación. A)** ELP exógeno de 110 repeticiones, producido en *E. coli* y purificado mediante 3 ciclos de ciclado de transición inversa. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. **B)** Western blot con anticuerpos anti-GFP. **SBN:** Sobrenadante de cultivo. **M3:** Fracción precipitada de E30-eGFP sin ELP exógeno, con 5 μM, 10 μM y 50 μM de ELP exógeno. **C-:** ELP exógeno, 50 μM. **C)** Porcentaje de recuperación en la fracción precipitada (M3) del E30-eGFP sin ELP exógeno, con 5 μM, 10 μM y 50 μM de ELP exógeno evaluado mediante medición de intensidad de fluorescencia de eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm). Se muestra el promedio y desviación estándar de dos réplicas. Condiciones de precipitación: 0,6 M sulfato de amonio, 15 minutos, a 25°C.

#### 4.3.2.8 Resolubilización del ELP precipitado

Con el fin de mejorar la resolubilización del E30-eGFP en la fracción precipitada, M3, se trabajó en las condiciones de resuspensión de la misma. Se partió de las fracciones precipitadas obtenidas utilizando sulfato de amonio 0,6 M e incubando a dos temperaturas, 25°C y 30°C. Estos precipitados se resuspendieron en buffer Tris 50 mM, EDTA 2 mM pH 8,8 frío y se incubaron durante 10 minutos en hielo u “overnight” (ON) a 4°C. En el análisis de emisión de fluorescencia de eGFP se observó un incremento en el porcentaje de recuperación, realizando la resuspensión del E30-eGFP ON a 4°C respecto a la condición de 10 minutos en hielo (**Figura 44.A**). La condición de precipitación a 30°C se escaló a un volumen de 25 mL de manera de tener suficiente cantidad de proteína para visualizar las bandas en un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Como lo muestra la **Figura 44.B**, se observan bandas del tamaño esperado para el E30-eGFP, con niveles

de pureza similares y sin evidencia de degradación de la proteína (**Figura 44.B**). Estos resultados muestran que la resolubilización ON a 4°C sería la más adecuada.

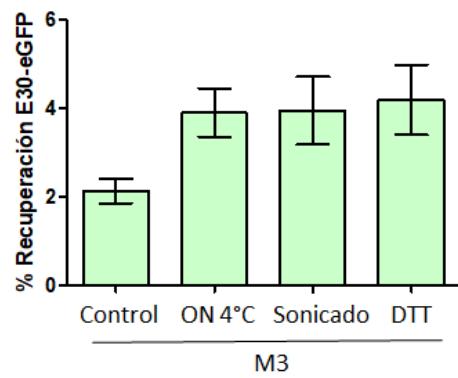


**Figura 44. Evaluación de la resuspensión del E30-eGFP.** **A)** Porcentaje de recuperación de E30-eGFP determinado por fluorescencia de eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm) en la fracción precipitada M3 resuspendida durante 10 minutos en hielo (**M3-10 min**) y ON 4°C (**M3-ON**). Condiciones de precipitación: 0,6 M sulfato de amonio, precipitación durante 15 minutos, a 25 y 30°C. Se trabajó con réplicas y se muestra el desvío estándar. **B)** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. **M1:** Sobrenadante de cultivo. **M2:** Sobrenadante luego de precipitar E30-eGFP (0,6 M sulfato de amonio y 30°C). **M3:** E30-eGFP resuspendido durante 10 minutos en hielo u ON a 4°C. **CS:** *Cold spin*. Fracción no resuspendida en buffer frío, luego de centrifugar 10 minutos.

Se continuó trabajando en la resuspensión del precipitado probando condiciones adicionales. Además de extender el tiempo de resuspensión en frío de 10 minutos a ON a 4°C, se probó resuspender la fracción precipitada mediante sonicado en baño de agua por 10 minutos, lo cual favorece la disgregación de proteínas. Otra condición evaluada fue el tratamiento con el agente reductor DTT que rompe enlaces disulfuro inter- o intra-polipéptidos que estén expuestos al

solvente. Nuestra hipótesis es que algunos de estos complejos covalentes podrían estar afectando el rendimiento de resolubilización al mantener la proteína agregada. La eGFP presenta dos cisteínas (Cis) en su secuencia. La Cis48 está cerca de la superficie de la proteína y en condiciones de desnaturización leves, este residuo podría quedar expuesto al disolvente, activándose. Mientras que la Cis70 está profundamente enterrado en el interior de la proteína y lo que la hace relativamente inactiva (82).

La adición de DTT o sonicado en baño de agua no promovió una mayor recuperación que la obtenida al incubar ON a 4°C. Mediante las diferentes metodologías de resuspensión se logró casi duplicar el porcentaje de recuperación respecto al control (**Figura 45**).



**Figura 45. Evaluación de la resuspensión del E30-eGFP bajo diferentes condiciones fisicoquímicas.**  
Porcentaje de recuperación de E30-eGFP determinado por fluorescencia de eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm) en la fracción precipitada, **M3**. Control: resuspendido durante 10 minutos en hielo; ON a 4°C; sonicado en baño de agua; agregado de DTT (1 mM). Condiciones de precipitación: 0,6 M sulfato de amonio, precipitación durante 15 minutos, a 25°C. Se graficó el promedio y desviación estándar de dos réplicas.

#### 4.3.3 Proteína eGFP fusionada a ELP y expresadas en citoplasma de *L. tarentolae*

La precipitación del ELP secretado al medio de cultivo en la quimera E30-eGFP se mejoró utilizando un ELP exógeno como catalizador de la agregación. Esto refuerza la idea que la baja

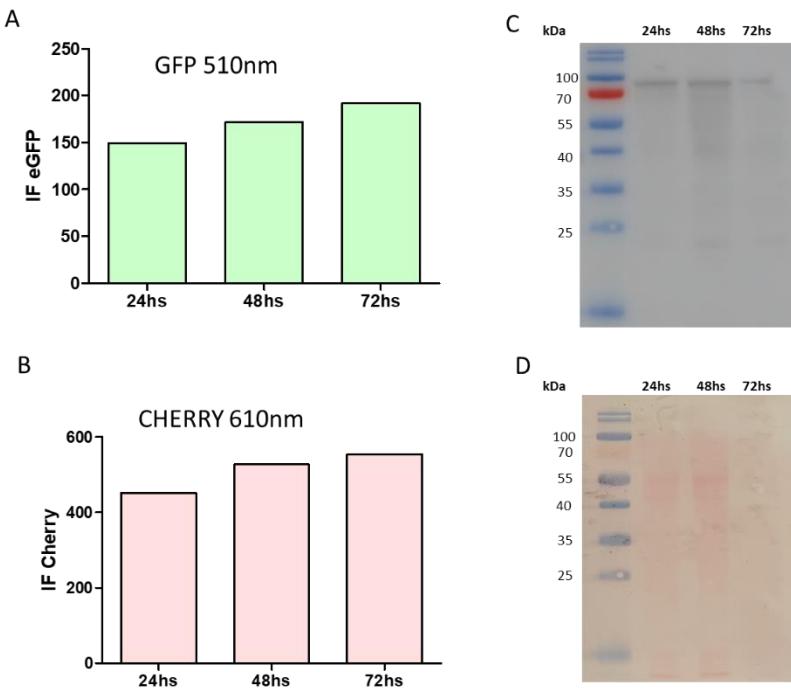
concentración del ELP en el sobrenadante condiciona en gran medida su precipitación. Con el fin de evaluar el efecto del incremento en la concentración del ELP en la precipitación del mismo, se decidió expresar la construcción en el citoplasma de *L. tarentolae*.

#### **4.3.3.1 Optimización de las condiciones de expresión del ELP-eGFP citoplasmático**

Se optimizó el tiempo de inducción para esta construcción, tomando alícuotas de los cultivos a las 24, 48 y 72 hs y evaluando el estado de los parásitos mediante observación al microscopio.

Los niveles de eGFP y la proteína reportera Cherry se evaluaron mediante fluorimetría y el de la primera también por Western blot.

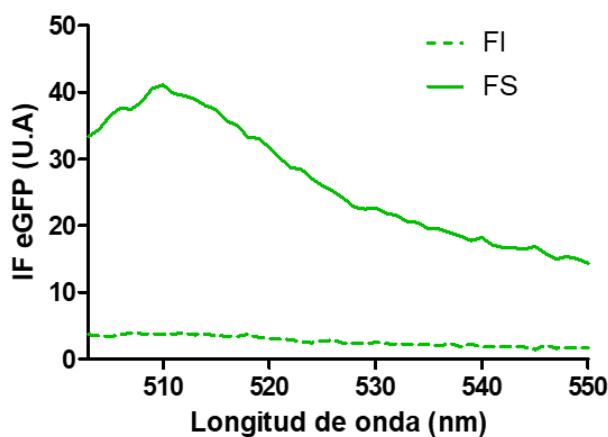
Para el E-eGFP de expresión citoplasmática el mayor valor de emisión de fluorescencia de eGFP y Cherry se obtuvo a las 72hs post inducción (**Figura 46.A-B**). Sin embargo, a ese tiempo fue significativa la proporción de células lisadas, según observación al microscopio. En todas las muestras analizadas, se logró evidenciar en el Western blot de los lisados celulares una banda del PM esperado (74 kDa). Siendo la banda de mayor intensidad la obtenida a las 48 hs post inducción (**Figura 46.C**). La densidad óptica del cultivo a las 24, 48 y 72 hs post inducción fue de 2,9, 4,4 y 2,6 respectivamente. Este resultado está en concordancia con la lisis celular observada al microscopio a las 72 hs, la cual ocasiona la liberación de la proteína al medio de cultivo, pudiendo ser detectada su presencia por la técnica de fluorimetría sobre muestras de cultivo, pero no por la técnica de Western blot en muestras de lisados de células (**Figura 46.C-D**).



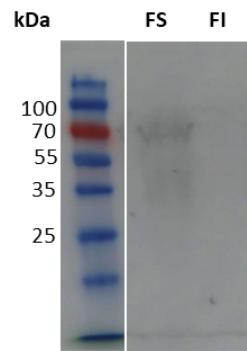
**Figura 46. Expresión de E-eGFP citoplasmático.** Muestras de cultivo y lisados celulares obtenidos a las 24, 48 y 72 hs post inducción **A)** intensidad de fluorescencia (IF) de eGFP (excitación 488 nm, emisión 510 nm) de cultivos celulares, **B)** intensidad de fluorescencia de Cherry (excitación 590 nm, emisión a 610 nm) de cultivos celulares y **C)** Western blot con anticuerpo anti GFP de lisados celulares. **D)** Tinción con rojo *ponceau* de membrana de Western blot.

Con el fin de corroborar que la producción intracelular de la construcción no provoque su agregación, se evaluó la presencia de la eGFP en las fracciones soluble e insoluble del extracto total de proteínas producido a partir del clon *L. tarentolae* Blecherry\_Cito\_E-eGFP (**Figura 47**). Los resultados del análisis de fluorescencia de eGFP y el Western blot indicarían que la E-eGFP producida a nivel intracelular no estaría sufriendo procesos de agregación, ya que su presencia se detecta en muestras de la fracción soluble de los extractos celulares.

A



B



**Figura 47. Evaluación de la fracción soluble e insoluble del extracto de proteínas de *L. tarentolae* Blecherry\_Cito\_E-eGFP. A)** Espectro de emisión de fluorescencia de eGFP de la fracción soluble (FS) e insoluble (FI) del extracto celular (excitación = 488 nm y emisión = scan de 500 a 550 nm). **B)** Western blot con anticuerpo anti-GFP de ambas fracciones del extracto.

#### 4.3.3.2 Precipitación del ELP en clon *L. tarentolae* Blecherry\_Cito\_E-eGFP

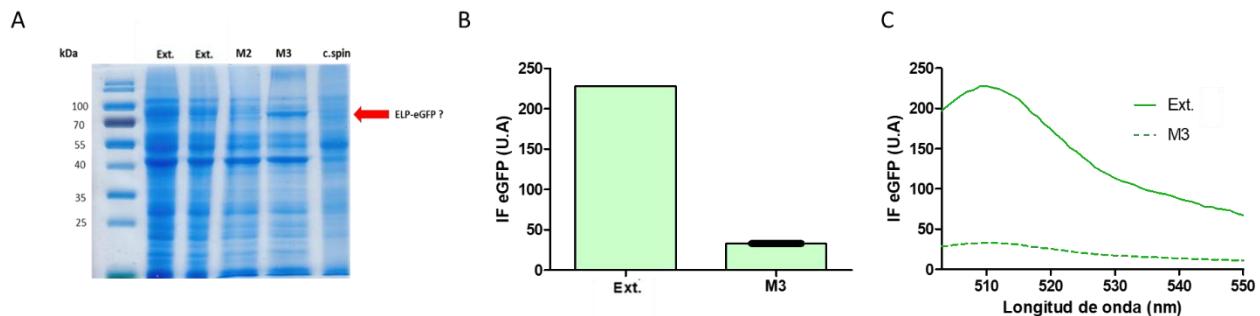
Se trabajó con la fracción soluble del extracto total de proteínas del clon Blecherry\_Cito\_E-eGFP de *L. tarentolae* para realizar una primera prueba de precipitación del ELP agregando igual volumen de sulfato de amonio 1,2 M (0,6 M concentración final) e incubando a 30°C durante 15 minutos.

Tras resuspender el ELP, se realizó una centrifugación corta en frío con el fin de eliminar contaminantes que no permanezcan en solución en la fracción M3. Para ello se centrifugó la M3 a 4°C, durante 10 minutos a 10000 g (*cold spin*: C. spin). Alícuotas de las distintas fracciones fueron evaluadas por SDS-PAGE (**Figura 48.A**). En la fracción precipitada, se visualizó una banda diferencial respecto a la fracción M2 y al pellet del *cold spin*, que correspondería al PM esperado para la construcción, 74 kDa.

Se midió la fluorescencia de eGFP a 510 nm en la fracción soluble del extracto de proteínas del clon y en la fracción precipitada M3 (**Figura 48.B-C**). De este ensayo se puede inferir que en las

condiciones de trabajo precipitaba cerca de un 14% del ELP, con un menor grado de pureza en comparación con el E-eGFP purificado a partir de sobrenadante de cultivo (**Figura 40 y 41**).

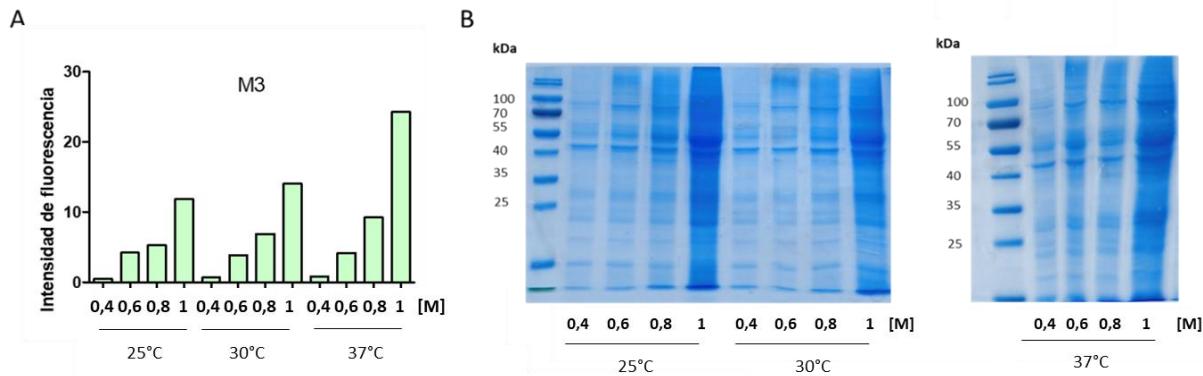
Al analizar la purificación para esta construcción mediante Western blot en las condiciones habituales, se observó una reactividad inespecífica del anticuerpo a lo largo de todo el carril que contenía la muestra de E-eGFP precipitada. Se intentó optimizar el protocolo modificando varias condiciones: se realizaron más de dos ciclos de precipitación del ELP, se agregó DNase al extracto, se cargaron distintas cantidades del extracto en los geles para Western blot, se realizaron distintos ciclos de sonicado del extracto, incluso se produjo más de un lote de extracto de proteínas. Sin embargo, en ninguno de los casos se lograron bandas definidas.



**Figura 48. Evaluación de la precipitación del E-eGFP expresado citosólicamente.** **A)** Electroforesis SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. **Ext.:** Fracción soluble del extracto de proteínas del clon de *L. tarentolae* Blecherry\_Cito\_E-eGFP. Se cargaron diferentes cantidades del mismo (1X y 2X). **M2:** fracción de las proteínas que no precipitan bajo esas condiciones. **M3:** fracción precipitada del E-eGFP. **C.spin:** pellet del *cold spin*. La flecha roja indica el tamaño esperado de E-eGFP. **B)** Intensidad de fluorescencia de la eGFP (excitación = 488 nm y emisión = 510 nm) en la fracción soluble del extracto de proteínas del clon Blecherry\_Cito\_E-eGFP y de la fracción precipitada (**M3**). Se grafica el promedio y desviación estándar de dos réplicas. **C)** Espectro de fluorescencia de eGFP de una muestra del extracto (excitación = 488 nm y emisión = scan de 500 a 550 nm).

Para la construcción E-eGFP citoplasmática se realizó la misma matriz de precipitación de ELP30-eGFP secretado según la **Tabla 6**, partiendo en este caso de la fracción soluble del extracto de proteínas. Se agregó el sulfato de amonio y se incubó durante 15 minutos para cada temperatura

y concentración salina. Los resultados se muestran en la **Figura 49**. Se observa claramente que, al aumentar la temperatura y la concentración salina, mejora la precipitación del ELP (**Figura 49.A**), pero también precipitan más contaminantes (**Figura 49.B**).



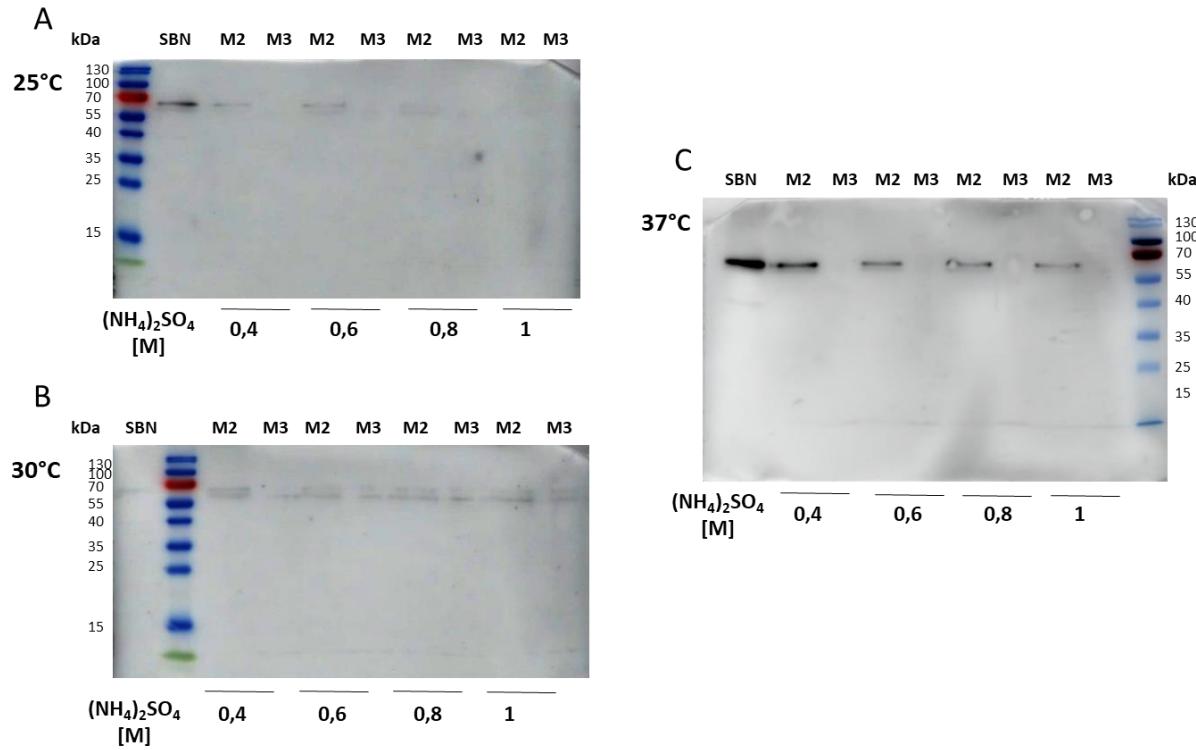
**Figura 49. Evaluación de la precipitación bajo diferentes condiciones del E-eGFP expresado en citosol.**  
**A)** Intensidad de fluorescencia (IF) de eGFP (excitación = 488 nm y emisión = 510 nm) de la fracción precipitada (**M3**), para cada temperatura y concentración salina. **B)** SDS-PAGE teñido con azul Coomassie de las fracciones precipitadas, **M3**, para cada temperatura y concentración salina.

#### 4.3.4 Proteína bFSH fusionada a ELP secretada al medio de cultivo

##### 4.3.4.1 Precipitación del ELP en clon *L. tarentolae* Blecherry\_E-FSH

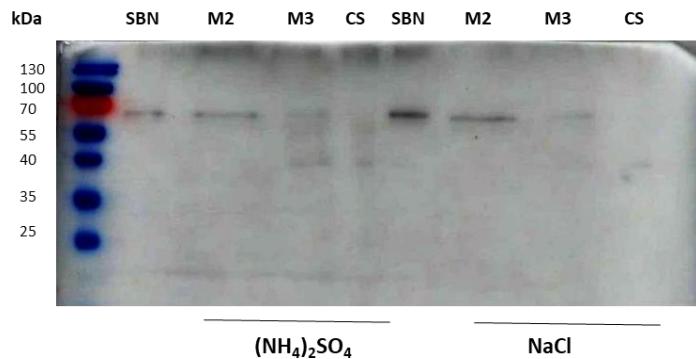
Las condiciones de precipitación del ELP pueden variar por influencia de la proteína que se encuentre fusionada al mismo (52,55,56). Por este motivo, con el fin de optimizar las condiciones de precipitación del ELP para la construcción E-FSH se realizó una matriz de prueba de diferentes concentraciones salinas y temperaturas según la **Tabla 6**. Se utilizó como precipitante al sulfato de amonio, se tomaron alícuotas de las fracciones M2 y M3 en todos los casos y se evaluaron mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-FSH (**Figura 50.A-C**). En el sobrenadante de cultivo se visualizó una banda del tamaño esperado para E-FSH (73 kDa). En todas las condiciones evaluadas se evidenció la presencia de E-FSH en la fracción no precipitada M2 y solo se lograron

visualizar bandas del tamaño esperado en la fracción precipitada (M3) obtenida a 30°C (**Figura 50.B**).



**Figura 50. Evaluación de la precipitación del E-FSH bajo diferentes condiciones.** Se analizaron muestras de los ciclos de precipitación del ELP durante 15 minutos, a diferentes concentraciones de sulfato de amonio (0,4-1 M) y temperaturas. **A)** 25°C, **B)** 30°C, y **C)** 37°C.

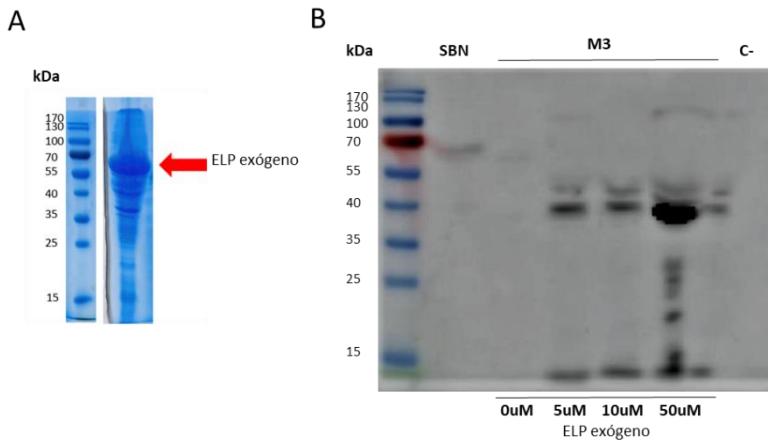
Se probó cambiar el precipitante por NaCl 1,5 M e incubando a 30°C. En estas condiciones la mayor parte del E-FSH permanece en la fracción M2 y no parece haber diferencias utilizando ambas sales como precipitantes (**Figura 51**). Cabe mencionar que los niveles de expresión de esta construcción, así como la sensibilidad del Western son bajos lo cual dificultó la evaluación de este ensayo.



**Figura 51. Comparación de la precipitación del E-FSH con diferentes sales.** Western blot con anticuerpo anti-FSH utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M a 30°C o NaCl 1,5 M a 30°C como precipitantes. **SBN:** Sobrenadante de cultivo. **M2:** Fracción no precipitada. **M3:** fracción precipitada y resuspendida.

#### 4.3.4.2 Uso de ELP exógeno como catalizador de la precipitación de E-FSH

Habiendo obtenido buenos resultados con la utilización de un ELP como catalizador de la precipitación de E-eGFP procedimos a utilizar esta estrategia para la E-FSH. Incluimos un ELP exógeno de 110 repeticiones a una concentración de 5, 10 y 50  $\mu\text{M}$  (**Figura 52.A**). En las condiciones evaluadas, con el aumento del ELP exógeno se visualiza la aparición de bandas en la fracción precipitada, M3 (**Figura 52.B**). Si bien las bandas son específicas de la construcción, ya que no aparecen en el control negativo (solo ELP exógeno), éstas no son del tamaño esperado (73 kDa). Esto podría deberse a que durante el proceso de precipitación se esté produciendo una degradación parcial de la proteína de fusión.



**Figura 52. Evaluación de la precipitación del E-FSH utilizando un ELP exógeno como *carrier* de precipitación. A)** ELP exógeno de 110 repeticos, producido en *E. coli* y purificado mediante 3 ciclos del método de ciclado de transición inversa. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. **B)** Western blot con anticuerpos anti-FSH. **SBN:** Sobrenadante de cultivo. **M3:** Fracción precipitada de E-FSH sin ELP exógeno, con 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M de ELP exógeno. Condiciones de precipitación: 0,6 M sulfato de amonio, durante 15 minutos, a 30°C. **C-:** 50  $\mu$ M de ELP exógeno.

## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La expansión del mercado de moléculas bioactivas ha llevado a la necesidad de desarrollar métodos rentables y eficientes para el proceso de producción y purificación de proteínas recombinantes, especialmente en el área agro-veterinaria, donde los márgenes de rentabilidad suelen ser limitados. En este trabajo nos propusimos evaluar un sistema de purificación no convencional, basado en la utilización de la etiqueta de ELP fusionada a la inteína  $\Delta I\text{-CM}$  para la expresión de proteínas en *L. tarentolae*. Este método, al no requerir de sistemas cromatográficos, resulta más económico y fácil de escalar, lo cual lo convierte en una alternativa atractiva para la producción industrial en gran escala.

El sistema ELP-inteínas se ha utilizado mayoritariamente con *E. coli* como huésped de expresión. En parte debido a que este tipo de inteínas experimentan auto-escisión *in vivo* cuando son expresadas a temperaturas altas ( $>32^\circ\text{C}$ ) y bajo pH ( $<7.4$ ), lo que provoca que no puedan ser utilizadas en células de mamífero, ya que las condiciones de crecimiento afectarían negativamente los rendimientos. Sin embargo, existen reportes exitosos en el empleo de inteínas en células de insecto (71) y en plantas (72), organismos donde las temperaturas de crecimiento son inferiores. Por lo anteriormente descrito, nos planteamos la hipótesis de que *L. tarentolae* sería un buen sistema de expresión de proteínas recombinantes de origen animal cuya purificación se realice por el sistema basado en etiquetas de ELP e inteínas, dado que este organismo crece a temperaturas moderadas, en comparación con las células de mamíferos. Además, este protozoario realiza modificaciones postraduccionales muy similares a las de eucariotas superiores.

Para cumplir con los objetivos, planteados se generaron 10 construcciones para la expresión en *L. tarentolae* de las proteínas recombinantes bFSH y eGFP fusionadas a inteína  $\Delta I\text{-CM}$  y/o etiqueta de ELP de 110 repeticiones (**Tabla 2**). Una de las construcciones generadas que expresa eGFP cuenta con un ELP de menor tamaño, producto de una delección posiblemente originada durante el proceso de amplificación del plásmido en *E. coli*. Como resultado de la transfección de *L. tarentolae*, se obtuvieron cepas recombinantes expresando 7 de las construcciones diseñadas, bajo regulación constitutiva y/o inducible (**Tabla 5**).

En aquellas construcciones que tienen la inteína  $\Delta$ I-CM, se evidenció el corte prematuro de la misma, ya sea que la misma estuviera fusionada a la proteína eGFP o la bFSH y que el sistema de expresión fuera inducible o constitutivo (**Figura 31-32**). Para determinar si el corte de la inteína ocurría a nivel intracelular o una vez secretada al medio de cultivo, se analizaron por Western blot lisados celulares de los clones que expresaban la eGFP. Los resultados mostraron claramente que la escisión ocurre a nivel intracelular, con una eficiencia notablemente alta (**Figura 33**).

Si bien está descrito que este tipo de inteína puede exhibir cierta activación *in vivo* durante el proceso de expresión (51), fue un evento inesperado que la reacción fuera tan eficiente a la temperatura de cultivo de *L. tarentolae*.

Dado que la actividad proteolítica de la inteína  $\Delta$ I-CM se ve favorecida por un descenso del pH y un aumento de la temperatura (69), se monitoreó el pH del medio de cultivo, observándose que se mantuvo estable, con valores superiores a 7,3 durante todo el proceso de expresión. Por lo tanto, la temperatura de cultivo podría ser uno de los factores que contribuyen a dicha activación. Sin embargo, reducir la temperatura de cultivo hasta 16 °C solo evitó de forma parcial y poco significativa el corte prematuro de la inteína a nivel intracelular (**Figura 34**).

Dado que no hay reportes previos de la expresión de proteínas fusionadas a la inteína  $\Delta$ I-CM en *L. tarentolae*, nos planteamos evaluar si la escisión de la inteína es desencadenada por algún componente intracelular de este protozoario. Con este objetivo, extractos celulares de *L. tarentolae* fueron incubados con la proteína recombinante CAT fusionada a un ELP de 110 repetidos y a la inteína  $\Delta$ I-CM (E-I-CAT) producida en *E. coli*. No se evidenció el corte de E-I-CAT en presencia del extracto de celular de *L. tarentolae*, a diferencia de lo que ocurre en presencia de buffer de corte a pH 6 (**Figura 35.A-B**). Estos resultados estarían indicando que el corte de la inteína probablemente sea favorecido por un plegamiento particular de esta secuencia producida en *L. tarentolae* o por ambientes particulares de los distintos compartimentos subcelulares.

Una alternativa interesante para evitar el corte prematuro de la inteína sería el uso de inteínas en *trans* (66). En este caso, dos segmentos de inteína se transcriben y traducen por separado como inteínas trans-splicing, también conocidas como “Split inteínas”, las cuales se ensamblan posteriormente para llevar a cabo la reacción de *splicing*. Si bien la utilización de las mismas resolvería el problema de la escisión durante la expresión, este método tiene sus limitaciones.

No siempre el re-ensamblaje de los fragmentos de la inteína ocurre de forma eficiente (65), además de tornar más laborioso y costoso el proceso de producción por el hecho de tener que expresar ambos fragmentos por separado.

Dado que nuestro objetivo era generar herramientas que reduzcan los costos asociados a los procesos de purificación, sigue siendo la opción más rentable la exploración de otros tipos de inteínas en *cis*, en el contexto de *L. tarentolae*.

A pesar de que no fue posible utilizar la inteína ΔI-CM de manera funcional en *L. tarentolae*, se evaluó el uso de etiquetas ELP para la purificación de eGFP producida en este sistema.

Dado que no hay reportes de proteínas fusionadas a ELP expresadas en este protozoario, se optimizó la precipitación del ELP de 30 repetidos fusionado eGFP. Para ello, se diseñó una matriz experimental que evaluó diferentes concentraciones salinas y temperaturas. Se observó que esta construcción no muestra un cambio drástico en el comportamiento de precipitación frente a variaciones de estos parámetros. En todas las temperaturas ensayadas, se evidenció una disminución progresiva de la eGFP en la fracción soluble no precipitada (M2) al ir aumentando la concentración de la sal (**Figura 38.A**). Paralelamente, en la fracción precipitada (M3), tanto a 25°C como a 30°C, se observó un incremento de la eGFP recuperada al ir aumentando la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta los 0,8 M. Sin embargo, empleando 1 M de esta sal, el nivel de eGFP detectado en la M3 disminuye (**Figura 38.B**). Teniendo en cuenta la cantidad de proteína de fusión observada en las fracciones no precipitadas M2 (**Figura 38.A**), creemos que esta disminución no se debe a una menor precipitación de la proteína, sino a una mayor dificultad para resolubilizarla. Aumentando la temperatura de precipitación a 37°C revirtió esta tendencia. En general, las concentraciones intermedias del precipitante arrojaron mejores rendimientos (**Figuras 38-39**). Utilizando, 30°C y 0,6 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se escaló el proceso y el análisis por SDS-PAGE mostró las mismas dos bandas cercanas a los 40 y 55 kDa que fueron también observadas en los Western blots. Estas bandas se analizaron por espectrometría de masa, identificándose con una amplia cobertura a la eGFP (**Figura 40**). Por tanto, la diferencia en el peso molecular observada estaría dada por diferencias en el número de repetidos de ELP. En el trabajo de Hassouneh y colaboradores (83), establecen que en algunos casos el ELP puede experimentar cortes

inespecíficos durante la expresión, en este sentido, las secuencias repetitivas ricas en prolina, valina, glicina y alanina pueden ser estructuralmente inestables, algunas regiones podrían adoptar conformaciones susceptibles a clivaje no enzimático o facilitar el ataque proteolítico. También podrían ocurrir eventos de rearreglo genético, tanto a nivel de ADN como durante la transcripción/traducción, que produjeran variantes con menos repetidos de ELP.

El rendimiento de esta recuperación de ELP30-eGFP, evaluada por fluorimetría, se encuentra entre el 2 y el 3 % de la proteína presente en el sobrenadante. Banki y colaboradores (51) obtuvieron una recuperación del 21.5% para la eGFP expresada a altos niveles en *E. coli* y purificada mediante ciclado por transición inversa. A su vez, los mismos autores expresaron otras proteínas fusionadas al ELP como la Glutation S-transferasa (GST),  $\beta$ -lactamasa y Catalasa, obteniendo rendimientos de 18 a 30% aproximadamente.

Con el fin de incrementar la cantidad de proteína recuperada, se evaluó aumentar el tiempo de precipitación del ELP (15 minutos a 1 hora), incrementándose más del doble la cantidad de ELP30-eGFP obtenida.

Además, se trabajó en mejorar el proceso de resuspensión de la fracción precipitada (M3). Para ello, se compararon diferentes condiciones: extender el tiempo de resuspensión en frío de 10 minutos a ON a 4°C, la sonicación en baño de agua y la adición del agente reductor DTT. Estas dos últimas condiciones no mostraron una mejora adicional en comparación con la incubación prolongada a 4°C, con la cual se logró casi duplicar el porcentaje de recuperación respecto al control (**Figura 45**).

La producción de proteínas recombinantes mediante su secreción al medio de cultivo presenta varias ventajas, como permitir la producción de proteínas glicosiladas, no requerir la lisis de las células y facilitar su purificación, ya que el medio de cultivo tiene una baja concentración proteica en relación al interior celular. Como contrapartida, la proteína secretada se diluye considerablemente en el medio de cultivo. Dado que los niveles de expresión de la proteína de interés no fueron elevados, el efecto de dilución en el sobrenadante puede estar afectando la eficiencia de la precipitación. También podría estar asociada con la variabilidad inter-experimento en la eficiencia del proceso de precipitación que se observa. Varios autores recomiendan, como estrategia para abordar el problema de los bajos niveles de expresión, el

agregado de ELP libre como agente agregante durante el proceso de purificación (81, 82). Por ello, se evaluó la utilización de un ELP exógeno para favorecer el proceso, lo cual resultó en un incremento de 4 veces en el porcentaje de recuperación del E30-eGFP (**Figura 43.B-C**), reafirmando la idea de que la baja concentración del ELP en el sobrenadante condiciona en gran medida su precipitación. Los resultados obtenidos están en concordancia con los obtenidos por Christensen y col. (84), quienes, utilizando ELP libre como co-precipitante en el proceso de purificación, lograron incrementar entre 3 a 6 veces la recuperación respecto a la purificación sin adición del ELP, cuando partían de 1 µg de las proteínas fusionadas a ELP.

Otro aspecto en que se abordó fue mejorar la pureza del producto. Si bien en la purificación en *E. coli*, varios autores recomiendan realizar más de un ciclo de precipitación para incrementar la pureza (83), en este trabajo pudo evidenciarse que con la realización de más ciclos de precipitación de esta proteína de fusión producida en *L. tarentolae*, no se aumenta significativamente la pureza de la muestra y con un tercer ciclo se pierde gran parte de E30-eGFP. Se demostró que es factible realizar la precipitación a menores temperaturas (20°C y 25°C), sin que esto impacte negativamente en la pureza de las muestras. Esto permitiría ampliar el rango de condiciones de precipitación que podrían aplicarse a proteínas blanco más sensibles a este parámetro.

Teniendo en cuenta el marcado efecto de la dilución de la ELP-eGFP secretado sobre la precipitación de la proteína, se decidió expresar la construcción en el citoplasma de *L. tarentolae* y en este caso con un ELP de 110 repetidos. Se optimizó la expresión del E110-eGFP citoplasmático, observando los mejores resultados a las 48hs post inducción (**Figura 46.C**).

Se evaluaron las fracciones solubles e insolubles del extracto total y se corroboró que la producción intracelular del E110-eGFP fuera soluble (**Figura 47**). Con esta fracción se realizó la precipitación a 30°C, con 0,6 M sulfato de amonio, durante 15 minutos. En estas condiciones se obtuvo un 14% del E110-eGFP (**Figura 48.B**), valor que está en el orden de lo reportado para este sistema en *E. coli* (51). Sin embargo, dada la gran cantidad de proteínas intracelulares, el nivel de pureza se ve comprometido cuando se compara el método de purificación de E30-GFP a partir del sobrenadante de cultivo (**Figuras 40 y 41**).

La evaluación de diferentes temperaturas y concentraciones salinas mostró claramente que, al aumentar estos dos parámetros, la precipitación del ELP es más eficiente (**Figura 49.A**), pero también precipitan más contaminantes (**Figura 49.B**). En este sentido, la purificación a partir de sobrenadante y empleando ELP exógeno como agregante parece ser más conveniente en cuanto a la relación rendimiento/pureza.

Se continuó trabajando con la segunda proteína modelo seleccionada, la bFSH. Está descrito que las condiciones de precipitación del ELP pueden verse influenciadas por la proteína de fusión (52,55,56). Por esto, con el fin de optimizar las condiciones de precipitación del ELP para la construcción E-FSH secretada, se realizó una matriz experimental de diferentes concentraciones salinas y temperaturas como se hizo para las otras construcciones. Si bien en el sobrenadante de cultivo se visualizó una banda del tamaño esperado para E-FSH (73 kDa), en todas las condiciones evaluadas esta proteína permaneció en la fracción no precipitada (M2). Solo en la precipitación realizada a 30°C se logró recuperar E-FSH en la fracción precipitada (**Figura 50.B**).

Se probó cambiar el precipitante por NaCl 1,5 M e incubando a 30°C, pero se observó el mismo comportamiento (**Figura 51**). Cabe mencionar que los bajos niveles de expresión de esta construcción, sumado a la limitada sensibilidad de la técnica del Western blot, podrían estar dificultando la detección del ELP-FSH en la fracción M3.

Habiendo obtenido buenos resultados con la utilización del agregado del ELP exógeno durante la precipitación de E-eGFP, procedimos a utilizar esta estrategia para la E-FSH. Llamativamente, se observaron bandas de menor peso molecular al esperado. Esto podría deberse a que durante el proceso de precipitación se esté produciendo una degradación parcial de la construcción.

Si bien se presentaron desafíos en cuanto a la estrategia inicial que nos habíamos planteado respecto a la utilización de la inteína en *L. tarentolae*, se logró utilizar una etiqueta de ELP, no convencional, alternativa a los sistemas cromatográficos existentes, mediante una metodología relativamente sencilla y económica. Logramos concentrar y purificar un E30-eGFP a partir de sobrenadante de cultivo, con un porcentaje de recuperación variable, con máximo obtenido de 17% en condiciones de 30°C, 0,6 M sulfato de amonio, durante 15 minutos y resolubilizando ON a 4°C.

## 6. PERSPECTIVAS

En futuras líneas de trabajo, sería relevante evaluar otras inteínas en *L. tarentolae* con el fin de optimizar el control del clivaje y la eficiencia del sistema de purificación. En particular, la exploración de inteínas en trans o split inteins (66) podría ofrecer un mayor control regulado del clivaje, mientras que la incorporación de inteínas alternativas en cis, como Npu (85), representa una opción potencialmente más rentable y robusta. Asimismo, resultaría valioso analizar el comportamiento de la inteína ΔI-CM en distintos compartimentos celulares, comparando su desempeño en el citoplasma frente al del sistema secretor, para determinar si el entorno intracelular influye en su estabilidad y clivaje.

En relación con la purificación basada en ELP, futuras mejoras podrían centrarse en incrementar la expresión de proteínas secretadas, particularmente de bFSH. Para ello, sería pertinente evaluar variantes de ELP con un menor número de repetidos, lo que podría reducir la carga metabólica del hospedador y favorecer una mayor secreción. Asimismo, la realización de transformaciones sucesivas de los clones permitiría aumentar el número de copias de la construcción, potenciando así los niveles de expresión. Por último, la validación del sistema con proteínas blanco adicionales, incluyendo otras moléculas bioactivas de interés veterinario, contribuiría a consolidar la versatilidad y aplicabilidad de esta estrategia de purificación no cromatográfica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Klatt, S., et al. (2019). *Leishmania tarentolae: Clasificación taxonómica y su aplicación como un prometedor hospedador de expresión biotecnológica*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 13(7), e0007424. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007424>
2. Basile, G., & Peticca, M. (2009). *Recombinant protein expression in Leishmania tarentolae*. Molecular Biotechnology, 43(3), 273–278. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9213-5>
3. Wheeler, R. J., et al. (2011). *The cell cycle of Leishmania: Morphogenetic events and their implications for parasite biology*. Molecular Microbiology, 79(3), 647–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x>
4. Klatt, S. (2013). *Evaluation of the protozoan parasite L. tarentolae as a eukaryotic expression host in biomedical research* [Tesis de doctorado, Max Planck Institute for Molecular Genetics Department of Vertebrate Genomics, Berlín, Alemania].
5. Raymond, F., et al. (2012). *Genome sequencing of the lizard parasite Leishmania tarentolae reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species*. Nucleic Acids Research, 40(3), 1131–1147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr834>
6. Iatta, R., Mendoza-Roldan, J. A., Latrofa, M. S., Cascio, A., Brianti, E., Pombi, M., Gabrielli, S., & Otranto, D. (2021). *Leishmania tarentolae and Leishmania infantum in humans, dogs and cats in the Pelagie archipelago, southern Italy*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 15(9), e0009817. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009817>
7. Mendoza-Roldan, J. A., Votýpka, J., Bandi, C., Epis, S., Modrý, D., Tichá, L., Volf, P., & Otranto, D. (2022). *Leishmania tarentolae: Una nueva frontera en la epidemiología y control de las leishmaniasis*. Transboundary and Emerging Diseases, 69(5), e1326–e1337. <https://doi.org/10.1111/tbed.14660>
8. Andrade, F. F. D., Vitório, J. G., Canuto, G. A. B., Nunes, F. F. C., Rodrigues, I. A., Almeida, A. P. M. M., Nascimento, F. C., Costa, A. O., Vieira, T. D. S., Silva, A. C. C., André, L. C., Gontijo, C. M. F., Junqueira, C., Toledo, J. S., Fernandes, A. P., & Soares, R. P. (2024). *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae versus especies patógenas: Evaluación*

*comparativa de actividad proteasa, glicoconjungados, resistencia al complemento y composición del metaboloma.* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 119, e230243.

<https://doi.org/10.1590/0074-02760230243>

9. Khan, A. H., Bayat, H., Rajabibazl, M., Sabri, S., & Rahimpour, A. (2017). *Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33.
10. Klatt, S., et al. (2013). *Production of glycosylated soluble amyloid precursor protein alpha (sAPPalpha) in Leishmania tarentolae.* Journal of Proteome Research, 12(1), 396–403. <https://doi.org/10.1021/pr300693f>
11. Jena Bioscience. (s.f.). *Lexsy brochure.* Recuperado de [https://www.jenabioscience.com/images/b3e879b381/Lexsy\\_brochure\\_web.pdf](https://www.jenabioscience.com/images/b3e879b381/Lexsy_brochure_web.pdf)
12. Fritzsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R., & Pohl, H. D. (2007). *Characterization of the growth behavior of Leishmania tarentolae: a new expression system for recombinant proteins.* Journal of Basic Microbiology, 47(5), 384–393. <https://doi.org/10.1002/jobm.200710111>
13. Taheri, T., Seyed, N., Mizbani, A., et al. (2016). *Leishmania-based expression systems.* Applied Microbiology and Biotechnology, 100, 7377–7385. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7712-4>
14. Niimi, T. (2012). *Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite Leishmania tarentolae: A review.* Methods in Molecular Biology, 824, 307–315. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_15)
15. Jena Bioscience. (s.f.). *LEXSY IE-blecherry4 datasheet.* Recuperado de [https://www.jenabioscience.com/files/jenabioscience/datasheet\\_extern/EGE-1420\\_LEXSY\\_IE-blecherry4.pdf](https://www.jenabioscience.com/files/jenabioscience/datasheet_extern/EGE-1420_LEXSY_IE-blecherry4.pdf)
16. Wiese, M., Ilg, T., Lottspeich, F., & Overath, P. (1995). *Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in Leishmania mexicana secreted acid phosphatase.* EMBO Journal, 14(6), 1067–1074. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07089.x>

17. Phan, H. P., Sugino, M., & Niimi, T. (2009). *The production of recombinant human laminin-332 in a Leishmania tarentolae expression system*. Protein Expression and Purification, 68, 79–84.
18. Kianmehr, A., et al. (2016). *Purification and Characterization of Recombinant Darbepoetin Alfa from Leishmania tarentolae*. Molecular Biotechnology, 58, 566–572.
19. Gazdag, E. M., Cirstea, I. C., Breitling, R., Lukes, J., Blankenfeldt, W., & Alexandrov, K. (2010). *Purification and crystallization of human Cu/Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan Leishmania tarentolae*. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 66(Pt 8), 871–877. <https://doi.org/10.1107/S1744309110019330>
20. Hemayatkar, M., et al. (2010). *Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in Leishmania tarentolae*. Biotechnology Journal, 5(11), 1198–1206. <https://doi.org/10.1002/biot.201000233>
21. Mirzaahmadi, S., Asaadi-Tehrani, G., Bandehpour, M., Davoudi, N., Tahmasbi, L., Hosseinzadeh, N., Mirzahoseini, H., Parivar, K., & Kazemi, B. (2011). *Expression of recombinant human coagulation factor VII by the Lizard Leishmania expression system*. Journal of Biomedical Biotechnology, 2011, 873874. <https://doi.org/10.1155/2011/873874>
22. Davoudi, N., Hemmati, A., Khodayari, Z., Adeli, A., & Hemayatkar, M. (2011). *Cloning and expression of human IFN-γ in Leishmania tarentolae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27, 1893–1899. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0648-4>
23. Klatt, S., & Konthur, Z. (2012). *Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in Leishmania tarentolae*. Microbial Cell Factories, 11, 97. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-97>
24. Taromchi, A. H., Kazemi, B., Mahmazi, S., & Bandehpour, M. (2013). *Heterologous Expression of Human IL-29 (IFN-λ1) in Iranian Lizard Leishmania*. Iranian Journal of Biotechnology, 11(3), 168–174. <https://doi.org/10.5812/ijb.12468>

25. Jørgensen, M. L., et al. (2014). *Expression of single-chain variable fragments fused with the Fc-region of rabbit IgG in Leishmania tarentolae*. Microbial Cell Factories, 13, 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-9>
26. Mlynarcik, P., et al. (2015). *Deciphering the interface between a CD40 receptor and borrelial ligand OspA*. Microbiological Research, 170, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.003>
27. Yadegari, Z., et al. (2015). *Expression of Recombinant Human Amelogenin in Iranian Lizard Leishmania and Its Biological Function Assay*. Iranian Journal of Public Health, 44(7), 987–996.
28. Ben-Abdallah, M., et al. (2011). *Production of soluble, active acetyl serotonin methyl transferase in Leishmania tarentolae*. Protein Expression and Purification, 75(1), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.07.011>
29. Abreu, C., et al. (2024). *Expression and functional characterization of chimeric recombinant bovine follicle-stimulating hormone produced in Leishmania tarentolae*. Microbial Biotechnology, 17(4), e14444. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14444>
30. Bolhassani, A., et al. (2015). *VLP production in Leishmania tarentolae: A novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1*. Protein Expression and Purification, 116, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.08.024>
31. Pion, C., et al. (2014). *Characterization and immunogenicity in mice of recombinant influenza haemagglutinins produced in Leishmania tarentolae*. Vaccine, 32(43), 5570–5576. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.092>
32. Grzyb, K., et al. (2016). *Immunogenicity and functional characterization of Leishmania-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex*. Scientific Reports, 6, 30627. <https://doi.org/10.1038/srep30627>
33. Baechlein, C., et al. (2013). *Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism Leishmania tarentolae and its application in a serological assay*. Journal of Virological Methods, 193(1), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.05.018>

34. Varotto-Boccazz, I., et al. (2021). *Epidemic Preparedness—Leishmania tarentolae as an Easy-to-Handle Tool to Produce Antigens for Viral Diagnosis: Application to COVID-19*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 736530. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736530>
35. Data Bridge Market Research. (s.f.). *Global biotechnology market*. Recuperado de <https://www.databridgemarketresearch.com/es/reports/global-biotechnology-market>
36. Walsh, G., & Walsh, E. (2022). *Biopharmaceutical benchmarks 2022*. *Nature Biotechnology*, 40, 1722–1760.
37. Kim, H., Lee, Y.-K., Kang, S. C., Han, B. K., & Choi, K. M. (2016). *Recent vaccine technology in industrial animals*. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 5, 12–18.
38. Martínez, R., et al. (2006). *No Title*.
39. Geary, T. W., Grings, E. E., MacNeil, M. D., De Avila, D. M., & Reeves, J. J. (2006). *Use of recombinant gonadotropin-releasing hormone antigens for immunosterilization of beef heifers*. *Journal of Animal Science*, 84, 343–350.
40. Liu, Y., et al. (2015). *Immunization of dogs with recombinant GnRH-1 suppresses the development of reproductive function*. *Theriogenology*, 83, 314–319.
41. Jennings, M. W., et al. (2009). *The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model*. *Animal Reproduction Science*, 116, 291–307.
42. Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2014). *Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle*. *Theriogenology*, 81, 38–48.
43. Vercruyse, J., Knox, D. P., Schetters, T. P. M., & Willadsen, P. (2004). *Veterinary parasitic vaccines: Pitfalls and future directions*. *Trends in Parasitology*, 20, 488–492.
44. Saraswat, M., et al. (2013). *Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends*. *BioMed Research International*, 2013, 312709. <https://doi.org/10.1155/2013/312709>
45. Moody, N. (2021). *Impact of a mutation known to improve Npu intein splicing activity on an engineered cleaving variant of the intein* [Tesis de maestría, The Ohio State University].
46. Lichy, J. J., et al. (2005). *Comparison of affinity tags for protein purification*. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.019>

47. Khan, F., et al. (2012). *Histidine affinity tags affect MSP1(42) structural stability and immunodominance in mice*. *Biotechnology Journal*, 7(1), 133–147. <https://doi.org/10.1002/biot.201100331>
48. Wu, J., & Filutowicz, M. (1999). *Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale*. *Acta Biochimica Polonica*, 46(3), 591–599.
49. Zhao, X., et al. (2013). *Several affinity tags commonly used in chromatographic purification*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 581093. <https://doi.org/10.1155/2013/581093>
50. Fan, Y., et al. (2018). *Column-Free Purification Methods for Recombinant Proteins Using Self-Cleaving Aggregating Tags*. *Polymers*, 10(5), 468. <https://doi.org/10.3390/polym10050468>
51. Banki, M. R., Feng, L., & Wood, D. W. (2005). *Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags*. *Nature Methods*, 2, 659–661.
52. Banki, M. R., & Wood, D. W. (2005). *Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up*. *Microbial Cell Factories*, 4, 1–6.
53. Vpgvg, G.-, et al. (1992). *Production and Purification of a Recombinant Elastomeric Polypeptide*. 347–352.
54. Meyer, D. E., & Chilkoti, A. (1999). *Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides*. *Nature Biotechnology*, 17, 1112–1115.
55. Meyer, D. E., & Chilkoti, A. (2004). *Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides*. *Biomacromolecules*, 5, 846–851.
56. Trabbic-Carlson, K., et al. (2004). *Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: A role for surface hydrophobicity?* *Protein Engineering, Design & Selection*, 17, 57–66.
57. Fong, B. A., et al. (2009). *Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution*. *Protein Expression and Purification*, 66(2), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.03.009>

58. Ge, X., & Filipe, C. D. M. (2006). *Simultaneous phase transition of ELP tagged molecules and free ELP: an efficient and reversible capture system*. Biomacromolecules, 7(9), 2475–2478. <https://doi.org/10.1021/bm060507n>
59. Conley, A. J., et al. (2009). *Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants*. Biotechnology and Bioengineering, 103(3), 562–573. <https://doi.org/10.1002/bit.22278>
60. Lahiry, A., Fan, Y., Stimple, S. D., Raith, M., & Wood, D. W. (2018). *Inteins as tools for tagless and traceless protein purification*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 93, 1827–1835. <https://doi.org/10.1002/jctb.5415>
61. Han, T.-C. (2016). *Control of intein-mediated self-cleaving tag for recombinant protein purification* [Tesis doctoral, Ohio State University].
62. Novikova, O., et al. (2016). *Intein clustering suggests functional importance in different domains of life*. Molecular Biology and Evolution, 33(3), 783–799. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv271>
63. Novikova, O., et al. (2014). *Enigmatic distribution, evolution, and function of inteins*. The Journal of Biological Chemistry, 289(21), 14490–14497. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.548255>
64. Elleuche, S., & Pöggeler, S. (2010). *Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(2), 479–489. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2628-x>
65. Elleuche, S., & Pöggeler, S. (2016). *Inteins and their use in protein synthesis with fungi*. In M. Schmoll & C. Dattenböck (Eds.), *Gene expression systems in fungi: Advancements and applications* (pp. 479–489). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_13)
66. Shi, C., et al. (2013). *A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(2), 829–835. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4601-3>

67. Pavankumar, T. L. (2018). *Inteins: Localized distribution, gene regulation, and protein engineering for biological applications.* Microorganisms, 6(1), 19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010019>
68. Du, Z., Zheng, Y., Patterson, M., Liu, Y., & Wang, C. (2011). *pK(a) coupling at the intein active site: Implications for the coordination mechanism of protein splicing with a conserved aspartate.* Journal of the American Chemical Society, 133(26), 10275–10282. <https://doi.org/10.1021/ja203209f>
69. Wood, D. W., & Camarero, J. A. (2014). *Intein applications: From protein purification and labeling to metabolic control methods.* The Journal of Biological Chemistry, 289(21), 14512–14519. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.552653>
70. Wood, D. W., Wu, W., Belfort, G., Derbyshire, V., & Belfort, M. (1999). *A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations.* Nature Biotechnology, 17, 889–892. <https://doi.org/10.1038/13612>
71. Khanna, M., et al. (2013). *Expression and purification of functional human glycogen synthase-1 (hGYS1) in insect cells.* Protein Expression and Purification, 90, 78–83.
72. Liu, K. (2015). *Purification of recombinant proteins in plants using small-molecule dependent inteins fused to ELP or HFBI.*
73. Jena Bioscience. (s.f.). *Plexsy-hyg2.* Recuperado de <https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression/lexsy-configuration/vectors/ege-232-plexsy-hyg2>
74. Jena Bioscience. (s.f.). *Plexsy IE-blecherry4.* Recuperado de <https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression/lexsy-configuration/vectors/ege-255-plexsy ie-blecherry4>
75. Addgene. (s.f.). *pET/EICAT.* Recuperado de <https://www.addgene.org/71461/>
76. Addgene. (s.f.). *Vector database entry 2489.* Recuperado de <https://www.addgene.org/vector-database/2489/>
77. Grunberg, K. (2022). *Expresión y purificación de la hormona folículo estimulante bovina (bFSH) en un sistema eucariota alternativo* [Tesis de maestría, Universidad de la República].

78. Jena Bioscience. (s.f.). *LT-101 L. tarentolae laboratory strain P10*. Recuperado de <https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression/lexsy-cultivation/strains/lt-101-l-t-laboratory-strain-p10>
79. Jena Bioscience. (s.f.). *LT-110 L. tarentolae laboratory strain T7-TR*. Recuperado de <https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression/lexsy-cultivation/strains/lt-110-l-t-laboratory-strain-t7-tr>
80. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., et al. (2022). *ColabFold: Making protein folding accessible to all*. *Nature Methods*, 19, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
81. van den Ent, F., Fusinita, & Löwe, J. (2006). *RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.12.008>
82. Zhang, J., & Wang, B. (2025). *Illuminating green fluorescent protein: Characterizing tri-peptide fluorescent chromophore, probing reactivity of cysteines, and unveiling site-directed modifications through mass spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 259, 116771. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2025.116771>
83. Hassouneh, W., Christensen, T., & Chilkoti, A. (2010). *Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins*. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 6, 6.11.1–6.11.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0611s61>
84. Christensen, T., Trabbic-Carlson, K., Liu, W., & Chilkoti, A. (2007). *Purification of recombinant proteins from Escherichia coli at low expression levels by inverse transition cycling*. *Analytical Biochemistry*, 360(1), 166–168. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.020>
85. Ramirez, M., Valdes, N., Guan, D., & Chen, Z. (2013). Engineering split intein DnaE from *Nostoc punctiforme* for rapid protein purification. *Protein engineering, design & selection* : PEDS, 26(3), 215–223. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs097>

## 8. ANEXOS

## **Anexo 1**

## Secuencia codificante ELP-Inteína-bFSH / eGFP

\*Péptido señal optimizado, en amarillo ELP, en rosado inteína y en azul repetidos de histidina.

bFSH

CGCAGCTGCGAGCTGACGAACATCACGATCACGGTGGAGAAGGAAGAGTGCAGCTCTGCATCAGCAT  
CAACACGACCTGGTGCGCCGGCTACTGCTACACCCCGACCTGGTGTACCGCGACCCGGCCCGCCGAA  
CATCCAGAAGACGTGCACGTTCAAGGAGCTGGTGTACGAGACGGTGAAGGTGCCGGCTGCAGCCCCACC  
ACGCGGACAGCCTGTACACGTACCCGGTGGCGACGGAGTGCCACTGCAGCAAGTGCAGCAGCAGCAGC  
ACCGACTGCACCGTGCAGCGCCCTGGGCCCAGAGCTACTGCAGCTCCGCAGATCAAGGAGAGCAGCAG  
CAGCAAGGCAGCCGCCGCAAGCCTGCCGAGCCCGAGCCGCCTGCCGGGCCGAGCGACACCCGATCC  
TGCCGCAGTTCCGGACGGCGAGTTACGATGCAGGGCTGCCGGAGTGCAAGCTGAAGGAGAACAA  
GTACTTCAGCAAGCCGGACGCCGATCTACCAAGTGCATGGGCTGCTGCTCAGCCGCCTACCCGAC  
CCCGGCCCGCAGCAAGAAGACGATGCTGGTCCGAAGAACATCACCAGCGAGGCCACGTGCTGCGTGG  
CCAAGGCCTCACGAAGGCCACGGTGTACGGCAACGTGCGCGTGGAGAACCAACCGAGTGCCACTGC  
TCCACGTGCTACTACCACAAGAGCTAG

eGFP

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCTCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACG  
TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTG  
AAGTTCATCTGCAACCACCGGCAAGCTGCCCCGGCCCTGGCCCACCCCTGTGACCACCCGTACCTACGGCG  
TGCAGTGCTTCAGCGCTACCCGACCATGAAGCAGCACGACTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAG  
GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG  
TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTCAAGGAGGACGGCAACAT  
CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGA  
ACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGCCGACCACT  
ACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGT  
CCGCCCTGAGCAAAGACCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGCTGCTGGAGTTCGTACCGCCGCC  
GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGTaG

## Secuencia aminoacídica de ELP-Inteína-bFSH / eGFP

\*Péptido señal optimizado, en amarillo ELP, en negrita el linker, en rosado inteína y en azul repetidos de histidina.

**bFSH**

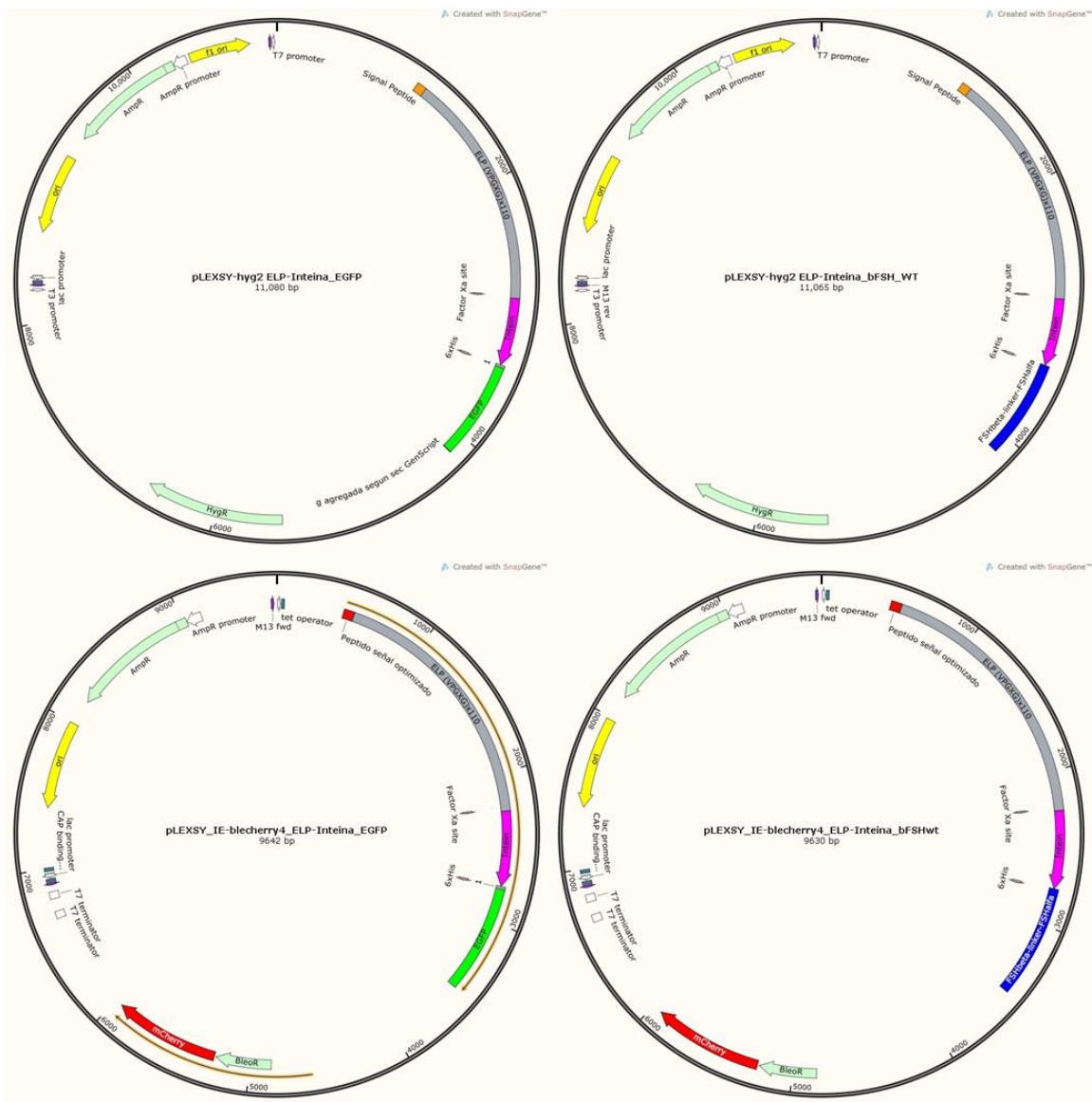
RSCELTNITITVEKEECGFCISINTTWCAGCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYT  
YPVATECHCSKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFREIKESSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQFPDGEFTMQGC  
PECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKMLVPKNITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVENH  
TECHCSTCYYHKS

**eGFP**

MVSKGEELFTGVVPILVLDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFS  
RYPDHKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN  
YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALKDPNEKRD  
HMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

**Anexo 2**

**Construcciones para la expresión en *L.tarentolae***



### Anexo 3

#### Manuscrito para ser presentado a revista arbitrada

## Exploring Elastin-Like Polypeptide Tags and Mini-intein for Recombinant Protein Purification in *Leishmania tarentolae*

Lucia Bassetti, Martina Crispo, Mariela Bollati-Fogolin, Sergio Pantano, Marcelo A. Comini, Cecilia Abreu\*

Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020 Montevideo, 11400, Uruguay

\*Corresponding author

**Keywords:** *Protein expression and purification, Elastin-Like Polypeptide, Leishmania tarentolae, mini-intein ΔI-CM*

## Abstract

Recombinant technology has enabled the production of a wide range of proteins with applications in various fields, including reproduction, food supplements, and medicine. However, the high costs associated with producing and purifying recombinant proteins limit their widespread use in the veterinary field. Therefore, the development of alternative, low-cost strategies for production and purification is essential to address these challenges. The non-pathogenic eukaryotic protozoan *Leishmania tarentolae* has emerged as an affordable expression system for heterologous proteins, providing glycosylation profiles similar to those of higher eukaryotes. Despite this, the cost of recombinant protein purification remains a significant barrier to expanding the use of recombinant products in areas such as livestock.

In this study, we evaluate an unconventional purification tag, the elastin-like polypeptide (ELP), for purifying recombinant proteins secreted by *L. tarentolae*. We also explored the use of the mini-intein ΔI-CM as a cleavable linker between ELP and the target protein. This intein was found to undergo intracellular self-cleavage, precluding its use in secretion-based applications in this host. Despite this limitation, the ELP-mediated purification from the culture supernatant was successfully achieved with a high purity using 0.6 M ammonium sulfate at 25-30 °C. To our knowledge, this is the first report of ELP-based protein purification in a protozoan host, representing a promising tool with broad potential for applications in molecular biology, pharmaceutical development, and other fields that require high-purity proteins with an improved cost-to-benefit ratio.

## 1. Introduction

The application of biotechnology in animal health and production is increasingly expanding. In particular, biological molecules have extended their applications from vaccines for controlling infectious diseases<sup>[1]</sup>, to enhancing productivity by modulating hormones or elements of the immune system<sup>[2]</sup>, to immunocastration<sup>[3]</sup>, reproductive purposes<sup>[4]</sup>, parasite control<sup>[5]</sup>, and several others. They can be obtained from natural sources using extraction methods or produced recombinantly in heterologous organisms. The use of recombinant proteins provides several advantages over protein mixtures obtained from animal extracts, including greater product homogeneity and safety. Recombinant technology also enables the production of proteins that do not exist in nature, such as optimized enzymes or single-chain antibodies, which are useful in diagnosis and treatment of certain diseases. However, the use of recombinant products in animals remains limited, mainly due to the costs associated with the production processes.

Often, obtaining these recombinant products in an active form requires a eukaryotic expression and post-translational machinery. While the mammalian cell systems are effective, they can be costly, labor-intensive, and time-consuming, prompting the exploration of alternative expression platforms that may overcome these limitations. One interesting option is *Leishmania tarentolae*, a unicellular eukaryotic protozoan that parasitizes reptiles, particularly lizards. This protozoan is not pathogenic to mammals, including humans, and is characterized by its rapid growth rate *in vitro* and low culture costs<sup>[6]</sup>. Furthermore, *L. tarentolae* has eukaryotic protein-folding and post-translational modification machinery

that enables it to produce complex proteins in an active form<sup>[7]</sup>. Several options for recombinant protein expression are available for *L. tarentolae*, including secretory or intracellular expression through constitutive (genome-integrated), inducible (genome-integrated or episomal), or cell-free (plasmid-based or PCR-based) expression systems<sup>[8]</sup>. These features make it an excellent choice as a heterologous expression system for eukaryotic protein production.

In our laboratory, we have been using *L. tarentolae* for the expression of eukaryotic proteins, typically along with chromatography-based purification systems<sup>[9]</sup>. When alternative expression systems, such as *L. tarentolae*, replace mammalian cells, the overall production costs decrease. However, purification processes can still account for 45 to 92% of the total production cost<sup>[10]</sup>. Therefore, to further reduce the overall costs of recombinant protein production, it is essential to minimize the expenditures associated with downstream processing. Traditional affinity-based purification methods are often too costly for industrial-scale applications, particularly for proteins that must be produced in large quantities at low cost. In this context, elastin-like polypeptide tag-based purification methods provide a cost-effective, non-chromatographic alternative.

Elastin-like polypeptides (ELPs) are repetitive synthetic polypeptides derived from the hydrophobic domain of tropoelastin. The most commonly used are composed of tandemly repeated blocks of (Val-Pro-Gly-X-Gly)*n*, where X can be any residue except proline (because proline destroys the inverse phase transition property of the ELP), and “*n*” represents the number of pentapeptide repeats in the polypeptide. ELPs exhibit rapid phase transition behavior at a specific temperature referred to as the inverse transition temperature (T<sub>t</sub>)<sup>[11,12]</sup>. ELPs are structurally disordered and soluble in aqueous solutions below their T<sub>t</sub>; however, intramolecular contacts between the nonpolar regions result in aggregation and, hence, precipitation above the T<sub>t</sub><sup>[13]</sup>. The transition of ELPs and their fusion proteins can also be isothermally triggered by reducing the T<sub>t</sub> through the addition of salts from the Hofmeister series<sup>[14]</sup>. The temperature/salt-induced phase transition of ELP is reversible as it resolubilizes when the temperature is reduced below the transition temperature or when the salt concentration is decreased<sup>[15]</sup>. Over the years, the vast majority of ELP-fused proteins have been produced in *Escherichia coli*, with some reports of their expression in plants (*Nicotiana*), fungi (*Aspergillus nidulans*)<sup>[16]</sup>, and yeast (*Pichia pastoris*)<sup>[17]</sup>. Notably, there are no studies of their use in any protozoa.

The removal of the purification tag is another downstream step that adds to production costs, for which the self-cleaving properties of inteins offer innovative solutions. Inteins (intervening proteins) are polypeptide sequences that are excised from precursor proteins through an autocatalytic process known as protein splicing. Through targeted mutations at specific residues, inteins were engineered to perform controlled cleavage reactions in response to stimuli such as pH changes or redox agents<sup>[18]</sup>. These engineered inteins allow for the purification of proteins without residual affinity tags, as the tag is removed during the purification process.

To date, most applications of intein-mediated purification have been carried out using *E. coli* as the expression system. Due to their sensitivity to temperature and pH, inteins often undergo premature self-cleavage when expressed at elevated temperatures (>32 °C) or exposed to acidic conditions (pH <7.4). This limitation has hindered their use in mammalian expression systems, where such growth conditions are the rule and can reduce protein yields. Despite these challenges, inteins have been successfully used in other eukaryotic systems, such as insect cells<sup>[19]</sup> and plants<sup>[20]</sup>, which grow at lower temperatures. Given that *L. tarentolae* grows optimally at 26 °C, it presents a promising alternative host for exploring intein-based strategies in the production of recombinant biomolecules.

In this study, we explore the use of ELP and the pH-inducible mini-intein ΔI-CM<sup>[21]</sup> as a purification system for heterologous protein expression in *L. tarentolae*. To our knowledge, this is the first report of ELP-based purification in a protozoan host.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Plasmid construction

The generation of the expression vectors was outsourced to GenScript. The coding sequence for the enhanced green fluorescent protein (eGFP) was cloned into two commercial vectors that allow its secretion, the constitutive expression vector pLEXSY-Hyg2 (Jena Bioscience), and the inducible, episomal, and bicistronic expression vector pLEXSY\_IE-blecherry4 (Jena Bioscience), which simultaneously expresses the protein of interest and the Cherry fluorescent protein as reporter gene. A 30-repeat ELP sequence was inserted into both vectors, followed by a spacer linker sequence, the mini intein  $\Delta$ I-CM<sup>[21]</sup>, when applicable, and the eGFP sequence. The ELP and  $\Delta$ I-CM sequences used correspond to those from the pET/EI-CAT vector developed by Banki and collaborators<sup>[22]</sup> (AddGeen #71461), while the eGFP sequence was obtained from the peGFP-C3 vector. For the expression of bovine follicle stimulant hormone (bFSH), its coding sequence was obtained from the pLEXSY-Hyg2\_FSH vector<sup>[9]</sup>, fused to 110-repeat ELP sequence and cloned in pLEXSY\_IE-blecherry4 (Jena Bioscience). To improve the secretion efficiency, the native signal peptide present in the commercial vectors was replaced with the signal peptide from *Leishmania mexicana* acid phosphatase, which has demonstrated higher efficiency in recombinant protein secretion<sup>[23]</sup>. A 6-histidine tag was added to the N-terminus of the eGFP and bFSH coding sequences for detection purposes.

### 2.2 Cell culture, transfection and clone selection

For the pLEXSY\_IE-blecherry4 inducible vector, the *L. tarentolae* LEXSY-Host-T7-TR strain (Jena Bioscience) was cultured at 26°C in brain heart infusion (BHI) medium (37 g/L) supplemented with penicillin (50 U/ml), streptomycin (50  $\mu$ g/mL), hygromycin (100  $\mu$ g/mL), nourseothricin (100  $\mu$ g/mL), and hemin (5  $\mu$ g/mL) (Sigma–Aldrich). Cells were transfected with pLEXSY\_IE-blecherry4\_bFSH by nucleofection using the Amaxa Nucleofector 2b (program U033) and the Amaxa Basic Parasite Nucleofector kit 1 (Lonza) according to the manufacturer's instructions. Selection of the transgenic population was performed by culturing the transfected cells in supplemented BHI medium containing bleomycin (100  $\mu$ g/mL, Jena Bioscience). After 24 h, the cells were harvested by centrifugation (2000 *g*, 10 min at room temperature), resuspended in fresh medium and spread over a 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membrane filter (Millipore) placed on agar (10 g/L prepared in 1 M HEPES, pH 7.5) plates containing supplemented BHI, bleomycin (100  $\mu$ g/mL) and 10% fetal bovine serum. The plates were sealed and incubated upside-down at 26°C. Approximately one week later, individual colonies appeared, and nitrocellulose membranes were transferred to a fresh agar plate containing 10  $\mu$ g/mL tetracycline. Two days later, 12 single colonies displaying an intense pink coloration (Cherry protein) were transferred to 1 mL of supplemented BHI medium (24-well plate) and incubated for 24 h at 26°C in the presence of 10  $\mu$ g/mL tetracycline. Next, Cherry and eGFP expression was quantified by measuring fluorescence ( $\lambda$ ex/em = 590/610 nm and  $\lambda$ ex/em = 480/510 nm, respectively) in a Varioskan Flash spectrofluorimeter. The clone with the highest dual fluorescence signal was selected for further studies. The clone producing ELP-FHS was selected based on Cherry expression.

For the pLEXSY-Hyg2 constitutive vector, the *L. tarentolae* LEXSY-Host-P10 strain (Jena Bioscience) was cultured at 26°C BHI medium (37 g/L) supplemented with penicillin (50 U/ml), streptomycin (50  $\mu$ g/mL), and hemin (5  $\mu$ g/mL) (Sigma–Aldrich). Cells were transfected as previously described, with the following exceptions: hygromycin (100  $\mu$ g/mL) was used as the selection antibiotic, induction was not required, and only eGFP expression was analyzed.

### 2.3 Protein expression

Cells from a static culture in the exponential growth phase ( $4-8 \times 10^7$  cells/mL) were diluted 1:5 in fresh, supplemented BHI medium and incubated for 24 h at 90 RPM and 26°C. Then, the cultures were diluted again 1:5 in fresh medium, and incubation resumed under the same conditions. When the cell density reached  $6-7 \times 10^7$  cells/mL, tetracycline was added (10 µg/mL) to induce protein expression, and incubation was extended for an additional 72 h. Samples were collected at 24, 48, and 72 h post-induction to evaluate Cherry and eGFP expression. For the constitutive expression system, induction was not required, and only eGFP expression was analyzed.

#### 2.4 Inverse transition cycling (ITC) of ELP fusion proteins

Ammonium sulfate  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  was added to the culture supernatant containing ELP fusion proteins (M1) at a 1:1 ratio. Samples were incubated for 15 min at 25°C, 30°C, or 37°C to induce the ELP phase transition and promote aggregation of the fusion protein. The aggregated ELP fusion protein was then separated from soluble contaminants (M2) by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 10 min at room temperature (for large volumes, ultrafiltration with a 0.2 µm filter may be used instead of centrifugation). The pellet was resuspended in a cold, low-salt buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8.8) and centrifuged again at 4°C ("cold spin"). The resolubilized ELP fusion protein remained in the supernatant (M3), while insoluble contaminants formed the cold spin pellet (CS). A schematic representation of the procedure is shown in Figure 2A.

#### 2.5 Mass spectrometry

The bands were excised from the Coomassie-stained gel and processed for identification by mass spectrometry (MS) at the Biochemistry and Analytical Proteomics Unit (UByPA) from the Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. In-gel digestion of selected protein bands was performed overnight at 37 °C by incubation with trypsin (Sequencing grade, Promega). Peptide extraction was performed with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in 60% acetonitrile. Samples were vacuum-dried, resuspended in 0.1% TFA, and desalted using C18 OMIX tips (Agilent). Peptides were analysed on a nano-HPLC (UltiMate 3000, Thermo) coupled to a hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, Thermo). For analysis of supernatant proteins, an elution gradient from 1% to 35% B was applied. LC-MS/MS data analysis was performed in accordance with the PatternLab IV software (<http://www.patternlabforproteomics.org>). The proteome from *L. tarentolae* was downloaded from UniProt (April 2021) (<http://www.uniprot.org>). A target-reverse database including the 127 most common contaminants was generated using PatternLab's database generation tool.

Thermo raw files were searched against the database using the Comet search engine applying the following parameters: fully specific trypsin as proteolytic enzyme allowing up to 2 missed cleavages; methionine oxidation as variable modification and a precursor mass tolerance of 40 ppm. Peptide spectrum matches were filtered using the Search Engine Processor (SEPro), using stringent FDR criteria set at 3% at spectrum level, 2% at peptide level, and 1% at the protein level<sup>[24]</sup>.

#### 2.6 Western blot

Proteins from supernatants or cell extracts were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE). The membranes were blocked overnight in PBS containing 5% (w/v) skim milk and 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-M-T). After washing, membranes were incubated overnight at 4°C with anti-GFP rabbit polyclonal antibody (Chromotek pabg1) or anti-HisTag mouse polyclonal antibody (Genscript A00186) diluted 1:1000 and 1:500 in PBS-M-T, respectively.

Following additional washes, membranes were incubated for 45 min at room temperature with a peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Invitrogen 31460, diluted 1:40000) or anti-mouse antibody (Millipore Ap130p, diluted 1:2000). Peroxidase activity was visualized by chemiluminescence using the Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo), following the manufacturer's instructions. All washing steps consisted of 3–4 rinses in PBS with 0.1% (v/v) Tween 20, 5 min each at room temperature with gentle shaking (100 RPM).

### 2.7 Fluorimetry

Fluorescence from eGFP ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 488/510$  nm) and Cherry ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 590/610$  nm) was measured in samples (200  $\mu\text{L}$ /well) loaded into F-bottom chimney 96-well plates (Greiner), using a Varioskan™ Flash spectrofluorometer (Thermo Scientific).

### 2.8 Recovery Yield Calculations

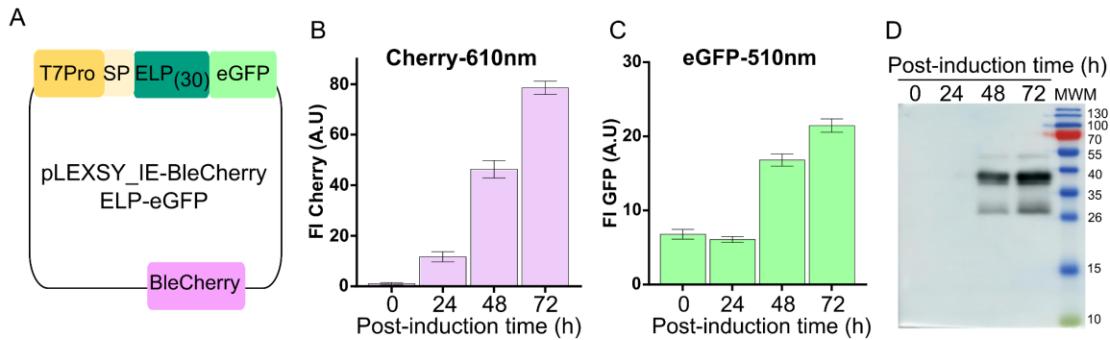
For purification from culture supernatants, fluorescence values were corrected by subtracting the background signal of BHI medium. After purification, the fluorescence of the M3 (resolubilized) fraction was corrected by the concentration factor, calculated as the difference between the original and final sample volume. Recovery percentages were calculated assuming that the corrected fluorescence in the supernatant represents 100% of the produced protein, and the corrected M3 fluorescence represents the recovered fraction.

## 3. Results

### 3.1. Production of eGFP fused to ELP tag

The expression vector pLEXSY\_IE-blecherry4 was used to express an N-terminal ELP-tagged enhanced green fluorescent protein (eGFP) (**Figure 1A**). This vector allows for the inducible expression and secretion of the protein into the culture medium. Additionally, the plasmid co-expresses the Cherry fluorescent protein, which remains in the cytosol of the cell, facilitating the selection of highly expressing clones. Following transfection of *L. tarentolae*, one clone was selected as outlined in section 2.2.

The expression kinetics of eGFP and Cherry reporter proteins were evaluated. Fluorescence intensity measurements indicated that the highest accumulation of the ELP-eGFP was achieved 72 h post-induction (**Figure 1B-C**). Additionally, ELP-eGFP expression was confirmed by Western blot analysis using an anti-GFP antibody, revealing a predominant band at the expected size (~40 kDa), and a smaller band corresponding to free eGFP lacking the ELP tag (~26 kDa). No additional degradation products were detected under any of the conditions tested (**Figure 1D**).



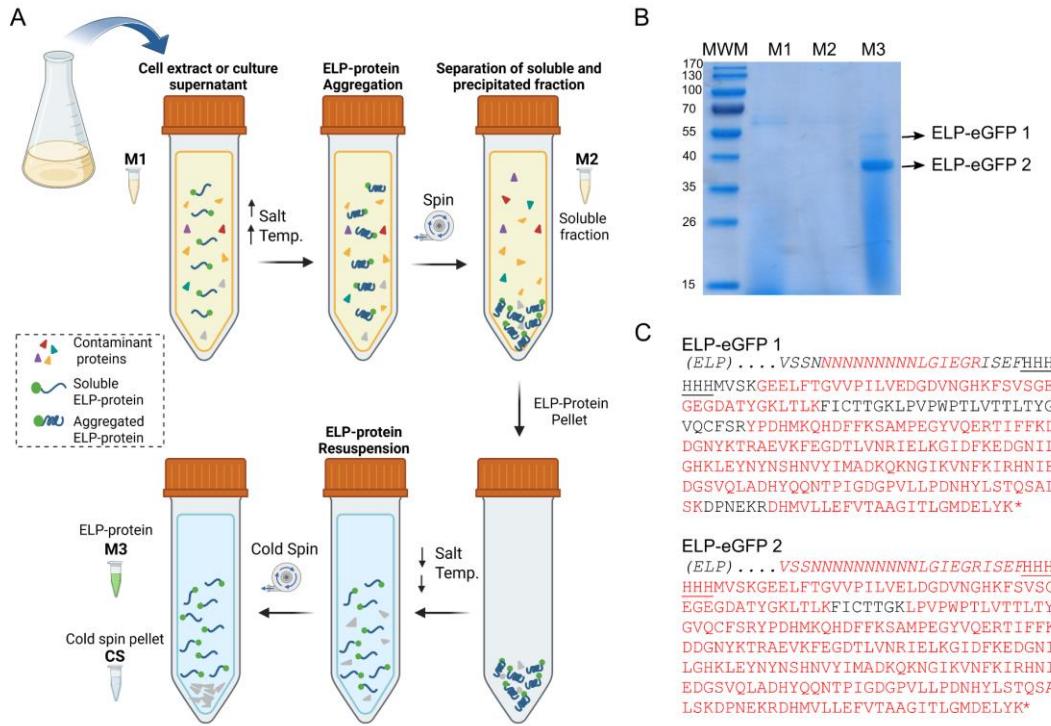
**Figure 1.** **(A)** Diagram and main components of the pLEXSY\_IE-BleCherry4 construct used to express ELP-eGFP. T7Pro: T7 promoter regulated by a Tet operator; SP: secretion signal peptide; ELP<sub>(30)</sub>: elastin-like polypeptide tag (30 pentapeptide repeated); eGFP: enhanced green fluorescent protein; BleCherry: bleomycin resistance gene and Cherry fluorescent protein gene. **(B-D)** Culture samples from induced cells (expressing pLEXSY\_IE-BleCherry\_ELP-eGFP) were collected at 0, 24, 48, and 72 h post induction and were analyzed by: **(B)** Cherry fluorescence intensity (Fl,  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 490/610$  nm); **(C)** eGFP fluorescence intensity (Fl,  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 488/510$  nm), and **(D)** Western blot (supernatant samples) with anti-GFP antibody. Fl is expressed as arbitrary units (A.U). Plots display the mean  $\pm$  standard deviation of three biological replicates.

### 3.2. ELP-eGFP purification by Inverse Transition Cycling

To purify the ELP fusion from the culture medium, Inverse Transition Cycling (ITC) was employed. In this process, an increase in both salt and heat were applied to induce the aggregation of the ELP-tagged protein, followed by resolubilization. The procedure was as follows: the culture supernatant (M1) underwent salt and heat treatment, and then was centrifuged. The pellet was resuspended in a cold low-salt buffer to resolubilize the ELP fusion protein, whereas the supernatant (M2), anticipated to be free of fusion protein, was discarded. A subsequent centrifugation of the resuspended pellet at low temperature (cold spin) removed any insoluble material (cold spin pellet; CS), yielding a supernatant (M3) enriched in the solubilized fusion protein (**Figure 2A**).

The effect of different  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentrations (0.4, 0.6, 0.8 and 1 M) and temperatures (25, 30 and 37°C) on the ITC process was evaluated (**supplementary figure 1**). The results indicate that this construct does not undergo significant precipitation changes under the evaluated conditions. While the precipitated fraction tends to increase up to 0.8 M of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , then drops at 1 M—likely due to reduced resolubilization rather than lower precipitation. Although the results from varying incubation temperatures are similar, 30°C showed slightly better outcomes. Therefore, the precipitation condition at 30°C with 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was selected for scaling-up the process. The efficiency was evaluated by SDS-PAGE, revealing a major band at  $\sim$ 40 kDa and a minor one at  $\sim$ 55 kDa (**Figure 2B**, bands 2 and 1, respectively). This minor band had already been identified as a marginal component in the culture supernatant through Western blot analysis. It should be noted that, as expected, the 26 kDa band corresponding to tag-free eGFP is not recovered (**Figure 1D**).

These bands were excised and subjected to peptide mapping via trypsin digestion followed by mass spectrometry analysis. Notably, the ELP sequence lacks cleavage sites for trypsin or other common proteases, preventing the detection of ELP-derived peptide fragments. The analysis revealed the presence of eGFP in both samples, with an amino acid sequence coverage of 97% and 84%, respectively (**Figure 2C**).



**Figure 2. (A)** Schematic representation of the inverse transition cycling (ITC) purification method for ELP fusion proteins. The temperature is increased, and salt,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , is added to the culture supernatant (M1) containing the ELP fusion protein to induce a phase transition, leading to its aggregation. The aggregated ELP fusion protein is then separated from soluble contaminants (M2) by centrifugation at room temperature ("Spin"). This pellet is subsequently resuspended in a cold, low-salt buffer and centrifuged at 4°C ("Cold Spin"). The solubilized ELP fusion protein remains in the supernatant (M3), while insoluble contaminants that do not resolubilize form the cold spin pellet (CS). Schema created using BioRender (<https://BioRender.com/5ml1v0l>). **(B)** ELP-eGFP purification process analyzed by SDS-PAGE: culture supernatant (M1), soluble (M2), and precipitated fraction (M3) after the ITC with 0.6 M ammonium sulfate and 30°C. **(C)** Mass spectrometry analysis of bands of interest (ELP-eGFP1: 55 kDa, and ELP-eGFP2: ~40 kDa) excised from SDS-PAGE. The eGFP sequence, preceded by a 6×His tag (underlined), and a spacer sequence (italicized), is shown. Peptides identified in each band are highlighted in red.

### 3.3. Effect of precipitation time and resolubilization conditions on ELP recovery

The secretion of recombinant proteins into the culture medium provides several advantages that include, the post-translational processing (if required) of the target protein, the avoidance of cell lysis, and a lower amount of contaminants when compared to the protein-rich intracellular environment. However, secreted proteins are often highly diluted in the culture supernatant, which can reduce the efficiency of ELP-mediated precipitation<sup>[25]</sup>. Since a substantial portion of the protein of interest remained in the soluble fraction (M2), we aimed to improve recovery by increasing the incubation time under precipitation conditions. After 15 min, 3% of ELP-eGFP was recovered in the precipitated fraction, whereas extending the precipitation to 1 hour increased recovery to 7%. Both fluorescence measurements and Western blot analysis confirmed an increase in ELP-eGFP precipitation with the longer incubation time (**Figure 3A-B**).

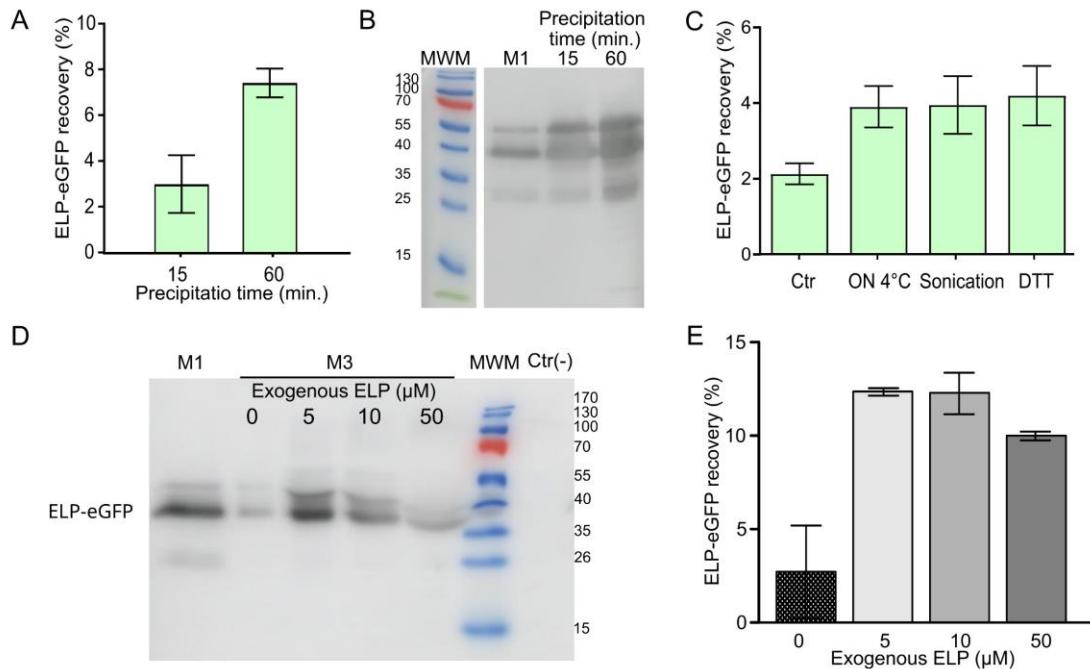
To enhance the recovery of ELP-eGFP from the precipitated fraction (M3), we optimized the resuspension conditions. Precipitates were obtained by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation at 0.6 M and incubation at 30°C for 15 min. These precipitates were then resuspended in a cold buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8.8) and different conditions were evaluated. We tested extending the resuspension time from 10 min

on ice to overnight at 4°C. In addition to prolonged cold incubation, we applied sonication in a water bath for 10 min to aid protein disaggregation, and added the reducing agent dithiothreitol (DTT) to disrupt disulfide bonds that contribute to aggregation. Fluorescence emission analysis of eGFP revealed increased recovery under all tested conditions compared to the 10 min on-ice control (**Figure 3C**). Overall, these optimized methods nearly doubled the amount of soluble ELP-eGFP recovered. Sonication and DTT did not enhance solubility beyond the improvement achieved with extended cold incubation alone.

### 3.4. Use of exogenous ELP as a precipitation facilitator

Although extending precipitation time improves ELP recovery, it should be noted that extended incubation at 25–30°C can compromise the stability of certain proteins. To address this issue, we explored the use of an exogenous elastin-like polypeptide (ELP) as a carrier to improve protein precipitation<sup>[26]</sup>.

An exogenous ELP with 110 repeats was produced in *E. coli* and then purified using ITC. The use of this exogenous ELP at concentrations of 5, 10, and 50  $\mu$ M, along with 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 25°C, increased the percentage recovery of ELP-eGFP from 3% to 12% (**Figure 3D-E**). Among the tested concentrations, 5  $\mu$ M exogenous ELP appeared to be the most effective.



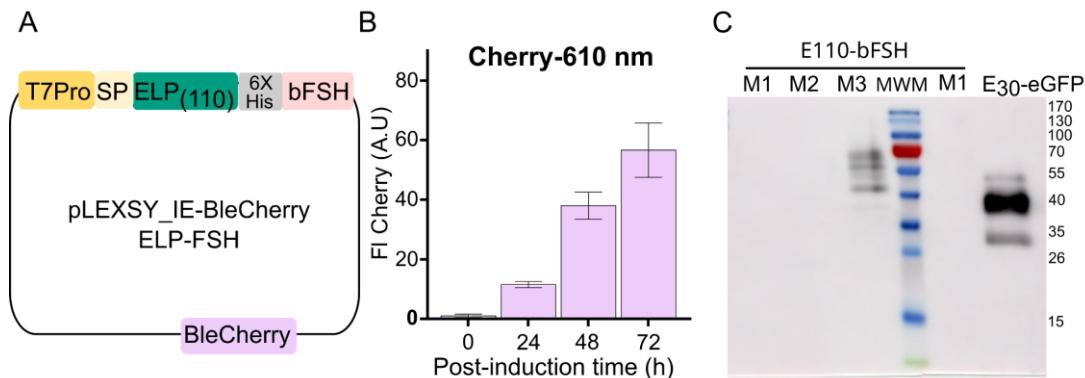
**Evaluation of ELP-eGFP recovery and resuspension under different precipitation and treatment conditions. (A–B)** Effect of precipitation time on ELP-eGFP recovery. Precipitation was performed with 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 25°C for either 15 or 60 min. **(A)** Quantification of ELP-eGFP in the precipitated fraction by eGFP fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 488/510$  nm), expressed relative to the corresponding supernatant. **(B)** Western blot analysis of ELP-eGFP in the supernatant (M1) and precipitated fractions using an anti-GFP antibody. **(C)** Optimization of ELP-eGFP resuspension from the precipitated fraction. Recovery was quantified by eGFP fluorescence after resuspension under the following conditions: control (Ctr, 10 min on ice), overnight (ON) at 4°C, sonication in a water bath (10 min), and addition of 1 mM DTT. All samples were initially precipitated with 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  for 15 min at 25°C. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation (SD) from replicate. **(D–E)** Effect of exogenous ELP on ELP-eGFP precipitation. Precipitation was performed with 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  for 15 min at 25°C in the presence of increasing concentrations of exogenous ELP (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, and 50  $\mu$ M). **(D)** Western blot of the supernatant (M1) and precipitated fractions (M3), probed with an anti-GFP antibody. Negative control (Ctr-) corresponds to 50  $\mu$ M exogenous ELP without ELP-eGFP. **(E)**

Quantification of ELP-eGFP recovery in the precipitated fractions (M3) by fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 488/510$  nm). Data represent the mean  $\pm$  SD from replicates.

### 3.5. ELP-bFSH purification by Inverse Transition Cycling

After successfully purifying the model protein eGFP using ELP-mediated precipitation, we applied the same strategy to purify a protein of veterinary relevance, the bovine follicle stimulant hormone (bFSH). We constructed an inducible expression vector encoding bFSH chimera that our group had previously produced in *L. tarentolae*<sup>[9]</sup>. To enhance precipitation efficiency, the bFSH chimera was fused to an extended ELP tag consisting of 110 pentapeptide repeats (**Figure 4A**). Induction kinetics were monitored using the co-expressed Cherry fluorescent reporter (**Figure 4B**). Despite successful induction, bFSH expression in the culture supernatant remained very low and was barely detectable by Western blot after extended exposure times (**Supplementary Figure 2**). These low protein levels suggest that the expression of bFSH with a 110-repeat ELP tag is challenging for *L. tarentolae*.

To assess the enrichment of the ELP-bFSH fusion protein, the culture supernatant was treated with 0.6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 30 °C for 15 min. The resulting fractions were analyzed by Western blot. As shown in **Figure 4C**, the ELP-bFSH fusion protein, undetectable in the untreated supernatant (M1), was enriched in the precipitated fraction (M3) following ITC. In M3, the expected ~73 kDa ELP-bFSH band was observed, along with additional bands of lower apparent molecular weight, which may correspond to truncated ELP tags (**Figure 4C**).

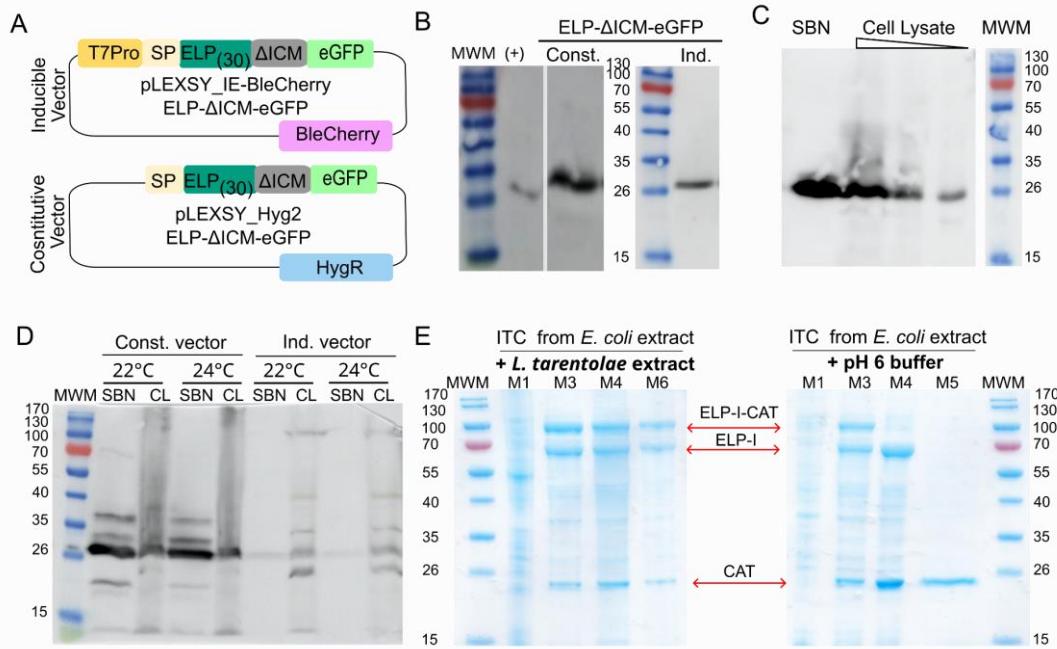


**Figure 4.** **(A)** Diagram and main components of the pLEXSY\_IE-BleCherry4 construct used to express ELP-bFSH. T7Pro: T7 promoter regulated by a Tet operator; SP: secretion signal peptide; ELP<sub>(110)</sub>: elastin-like polypeptide tag (110 pentapeptide repeated); 6xHis: histidin-Tag; bFSH: bovine FSH (9); BleCherry: bleomycin resistance gene and Cherry fluorescent protein gene. **(B)** Culture samples from induced cells (expressing pLEXSY\_IE-BleCherry\_ELP-bFSH) were collected at 0, 24, 48, and 72 h post induction and were analyzed by Cherry fluorescence intensity (Fl,  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 590/610$  nm). Fl is expressed as arbitrary units (AU) and plot displays the mean  $\pm$  standard deviation of three biological replicates. **(C)** Western blot analysis of ITC precipitation of ELP-bFSH. The supernatant (M1), non-precipitated (M2), precipitated fractions (M3), and supernatant from ELP-eGFP (E30-eGFP) as a reference control, probed with an anti-His antibody.

### 3.6. Evaluation of the ΔI-CM mini-Intein as an auto-releaser of the ELP-tag in the *L. tarentolae* system.

We generated inducible and constitutive expression constructs where the ΔI-CM sequence was positioned between ELP and eGFP (ELP-ΔICM-eGFP) (**Figure 5A**). Western blot analysis of the culture supernatants from the corresponding cell lines transfected with these constructs revealed the presence of eGFP lacking the ELP tag. This result suggests that the fusion protein undergoes premature cleavage

**(Figure 5B).** To determine whether intein cleavage occurred at intracellular level, we analyzed cell lysates from the cell line with constitutive expression of the transgene by Western blotting. The presence of a prominent band corresponding to untagged eGFP in the cell lysates **(Figure 5C)** indicates that the construct undergoes highly efficient cleavage within the cells and not upon secretion to the culture medium.



**Figure 5. Western blot and SDS-PAGE analysis of ELP-ΔI-CM-eGFP expression and intein cleavage.** **(A)** Diagram and main components of the inducible vector (pLEXSY<sub>IE</sub>-BleCherry4) and the constitutive vectors (pLEXSY<sub>Hyg2</sub>) used to express ELP-ΔI-CM-eGFP. T7 Pro: T7 promoter regulated by a Tet operator; SP: secretion signal peptide; ELP<sub>(30)</sub>: elastin-like polypeptide tag (30 pentapeptide repeated), ΔI-CM: mini intein, HygR: hygromycin resistance gene; and BleCherry: a fusion of bleomycin resistance and the Cherry reporter protein. **(B)** Western blot of culture supernatants from constitutive (Const.) and inducible (Ind.) *L. tarentolae* ELP-ΔI-CM-eGFP clones, with free-eGFP as a reference control (+). **(C)** Western blot of supernatant (SBN) and increasing amounts of cell lysate from the constitutive *L. tarentolae* ELP-ΔI-CM-eGFP clone. **(D)** Effect of decreasing the culture temperature (24°C, and 22°C) on ELP-ΔI-CM-eGFP production in supernatants (SBN) and cell lysates (CL). **(E)** SDS-PAGE analysis of the effect of *L. tarentolae* cell extract on the cleavage of the ΔI-CM intein in the recombinant ELP-ΔI-CM-CAT protein (E-I-CAT) produced in *E. coli*. Red arrows indicate the expected molecular weights of free CAT, CAT fused to ELP-ΔI (E-I-CAT), and free E-I. M1: cell extract, M3: precipitated fraction, M4: precipitated fraction incubated for 18 h with either *L. tarentolae* extract (left panel) or at pH 6 (right panel), M5: soluble fraction after precipitating ELP in fraction M4 (free CAT), and M6: insoluble fraction after precipitating ELP in fraction M4.

The proteolytic activity of the ΔI-CM intein is induced by a decrease in pH and an increase in temperature<sup>[21]</sup>. In our experiments, the pH of the culture medium remained stable above 7.3, leaving culture temperature as the potential factor for modulating intein activity. To evaluate its effect on autoproteolysis, the culture temperature was reduced from the standard 26°C to 24°C, and 22°C. Microscopic examination confirmed a satisfactory cell motility at all tested temperatures, although growth was progressively slower at lower temperatures. Western blot analysis of supernatant and cell lysate samples showed bands with higher molecular weight than untagged eGFP, as well as free eGFP (**Figure 4D**). A similar profile was observed in cultures grown at 16°C and 18°C (**Supplementary Figure 3**). These results suggest that lowering the culture temperature by at least two degrees led to a partial decrease in intein cleavage efficiency; however, free eGFP remained the predominant species.

As there are no prior reports of proteins fused to the  $\Delta$ I-CM intein being expressed in *L. tarentolae*, we investigated whether an intracellular component of this protozoan could trigger intein cleavage. To test this, we examined the effect of an *L. tarentolae* cell extract on a recombinant E-I-CAT protein (chloramphenicol acetyltransferase (CAT) fused to a 110-repeat ELP and the  $\Delta$ I-CM intein) produced in *E. coli*. The E-I-CAT protein present in the *E. coli* extract was purified by ITC, and the resulting precipitate was divided into two fractions. One was resuspended in the *L. tarentolae* cell extract at pH 8.8 (Figure 4D, left panel), and the other in a buffer at pH 6, which is optimal for intein cleavage (Figure 4D, right panel). After 18 h of incubation at room temperature (M4, Figure 4D) no cleavage was observed in the *L. tarentolae* extract: the intensity of the E-I-CAT band remained unchanged, and no increase in E-I or free CAT was detected relative to fraction M3. In contrast, clear signs of cleavage were observed at pH 6, as E-I-CAT level decreased and the amount of E-I and free CAT increased (Figure 4D).

#### 4. Discussion

The expansion of the bioactive molecule market has driven the need for cost-effective and efficient methods for the production and purification of recombinant proteins—particularly in the agro-veterinary sector, where profit margins are often limited<sup>[27]</sup>. In this study, we aimed to evaluate a non-conventional purification system based on the use of an elastin-like polypeptide (ELP) tag fused to the mini-intein  $\Delta$ I-CM for protein expression in *Leishmania tarentolae*. As this method does not rely on chromatographic systems, it offers a more economical and scalable alternative, making it particularly attractive for large-scale industrial applications.

In this study, we explored the use of the mini-intein  $\Delta$ I-CM as a cleavable linker between ELP and eGFP in *L. tarentolae*, assessing both constitutive and inducible expression systems. Western blot analyses revealed that eGFP was primarily free of the ELP-tag, both in the supernatants and in the cell lysates, indicating that intein-mediated cleavage occurred efficiently inside the cells under standard culture conditions.

Although previous reports have noted some degree of *in vivo* intein cleavage during expression<sup>[22]</sup>, the high efficiency observed at the cultivation temperature of *L. tarentolae* was unexpected. Attempts to suppress cleavage by reducing culture temperature (to 24°C, 18°C, or 16°C) had only a modest effect, suggesting that the proteolytic activity of  $\Delta$ I-CM in this protozoa may be activated through an alternative mechanism, potentially involving host-specific factors. This hypothesis was refuted based on the results obtained upon incubating a ELP\_ΔI-CM\_CAT fusion protein produced in *E. coli* with a *L. tarentolae* cell extract, which revealed no cleavage of the recombinant protein. While these results argue against the presence of a soluble, extractable host's molecule(s) responsible for intein activation, it remains possible that intracellular conditions, such as compartment-specific environments or redox gradients, may promote intein cleavage. Based on this finding,  $\Delta$ I-CM does not appear suitable for secretion-based applications using *L. tarentolae* as expression host.

Regarding the use of ELP, we demonstrated the successful expression and purification of an ELP-tagged eGFP fusion protein in *L. tarentolae* using an inducible secretion system. Western blot analysis revealed a predominant band corresponding to the full-length ELP-eGFP fusion protein. Importantly, no major degradation products were observed, indicating the overall stability of the recombinant protein in the culture medium.

Purification by ITC, capitalized on the unique phase transition behavior of ELPs, combining 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and a temperature of 30°C was sufficient to induce selective aggregation of the fusion protein. Despite the low protein concentration in the culture medium, ITC enables the recovery of the fusion construct, as confirmed by SDS-PAGE and mass spectrometry, which verify the identity of the recovered bands. However, recovery remained modest (~3%), compared to the 21.5% recovery obtained for ELP-eGFP expressed at high levels in *E. coli* and purified using ITC, likely due to the high dilution of ELP-eGFP

in the *L. tarentolae* supernatant. Several authors have proposed the addition of free ELP as a co-precipitation "carrier" to overcome this issue<sup>[26,28]</sup>. We adopted this strategy and observed a fourfold increase in recovery of ELP-eGFP when exogenous ELP was added, reinforcing the idea that low ELP concentration in the supernatant is a limiting factor. Our findings are consistent with those of Christensen et al. <sup>[26]</sup>, who reported 3- to 6-fold increases in recovery of ELP-tagged proteins when using free ELP as a co-precipitant. The mechanism by which exogenous ELP improves precipitation may involve the formation of heterotypic aggregates that enhance the aggregation of the tagged protein.

To further evaluate the applicability of this system to a protein of veterinary interest, we fused a bovine FSH chimera to an extended ELP tag containing 110 pentapeptide repeats. Although induction was successful, bFSH expression levels in the culture supernatant remained very low and were barely detectable by Western blot. This suggests that the expression of bFSH fused to a large ELP tag may pose challenges for *L. tarentolae*, possibly due to overloading of the secretory machinery or issues related to protein stability. Despite these low expression levels, ITC purification enabled specific enrichment of the ELP-bFSH fusion protein. A band corresponding to the full-length fusion protein was observed in the precipitated fraction, while it was undetectable in the untreated supernatant. Additional bands of lower apparent molecular weight were also detected, likely corresponding to truncated ELP-bFSH variants. These results demonstrate that ITC can recover target proteins even at low expression levels, and highlights the compromise between improved precipitation efficiency and the challenges associated with expressing longer ELP repeats.

Overall, these results validate *L. tarentolae* as a suitable host for producing secreted ELP-tagged proteins and demonstrate that combining ELP-tagged secretion with ITC and carrier-assisted precipitation constitutes an effective low-cost purification strategy. Although additional work is required to optimize the recovery yields, these findings are an important proof of concept. The production of biopharmaceuticals in resource-limited settings or for applications where rapid and scalable protein purification is needed may benefit from the data reported here.

## 5. References

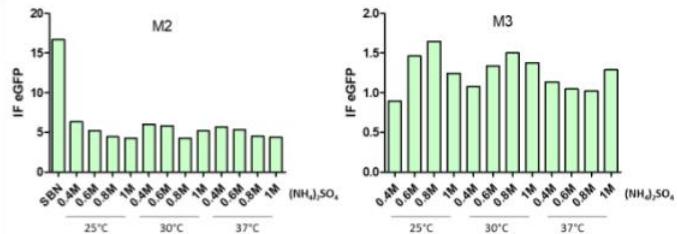
1. Aida, V., Pliasas, V. C., Neasham, P. J., North, J. F., McWhorter, K. L., Glover, S. R., & Kyriakis, C. S. (2021). Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.654289>
2. Vijayaram, S., Sun, Y. Z., Zuorro, A., Ghafarifarsani, H., Van Doan, H., & Hoseinifar, S. H. (2022). Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 130, 294-308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.011>
3. Wang, C., Yang, C., Zeng, Y., & Zhang, M. (2023). GnRH-immunocastration: An alternative method for male animal surgical castration. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1248879>
4. Baruselli, P. S., de Abreu, L. Â., Catassi, B. L. C., dos Santos Oliveira, A. C., Rebeis, L. M., Gricio, E. A., Albertini, S., Sales, J. N. S., & Rodrigues, C. A. (2023). Use of new recombinant proteins for ovarian stimulation in ruminants. *Animal Reproduction*, 20(2). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0092>
5. Sharma, N., Singh, V., & Shyma, K. P. (2015). Role of parasitic vaccines in integrated control of parasitic diseases in livestock. *Veterinary World*, 8(5), 590-598. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.590-598>
6. Klatt, S., Simpson, L., Maslov, D. A., & Konthur, Z. (2019). *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007424>

7. Lai, J. Y., Klatt, S., & Lim, T. S. (2019). Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(3), 380-394. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1566206>
8. de Oliveira, T. A., Silva, W. da, da Rocha Torres, N., Badaró de Moraes, J. V., Senra, R. L., de Oliveira Mendes, T. A., Júnior, A. S., Bressan, G. C., & Fietto, J. L. R. (2019). Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review. *Process Biochemistry*, 87, 164-173. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.019>
9. Abreu, C., Grunberg, K., Bonilla, M., Crispo, M., Pantano, S., Jaeschke, J., Comini, M. A., & Bollati-Fogolín, M. (2024). Expression and functional characterization of chimeric recombinant bovine follicle-stimulating hormone produced in *Leishmania tarentolae*. *Microbial Biotechnology*, 17(4). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14444>
10. Straathof, A. J. J. (2011). The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. En *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 2, pp. 811-814). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00492-X>
11. Mcpherson, D. T., Morrow, C., Minehan, D. S., Wu, J., Hunter, E., & Urry, D. W. (1992). Production and Purification of a Recombinant Elastomeric Polypeptide, G-(VPGVG)19-VPGV, from *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 8(4), 347-352. <https://doi.org/10.1021/bp00016a012>
12. Meyer, D. E., Trabbic-Carlson, K., & Chilkoti, A. (2001). Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: Effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin. *Biotechnology Progress*, 17(4), 720-728. <https://doi.org/10.1021/bp0100490>
13. Christensen, T., Hassouneh, W., Trabbic-Carlson, K., & Chilkoti, A. (2013). Predicting Transition Temperatures of Elastin-Like Polypeptide Fusion Proteins. *Biomacromolecules*, 14(5), 1514-1519. <https://doi.org/10.1021/bm400167h>
14. Fong, B. A., Wu, W. Y., & Wood, D. W. (2009). Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. *Protein Expression and Purification*, 66(2), 198-202. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.03.009>
15. Meyer, D. E., & Chilkoti, A. (1999). Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. En *NATURE BIOTECHNOLOGY* (Vol. 17). <http://biotech.nature.com>
16. Herzog, R. W., Singh, N. K., Urry, D. W., & Daniell, H. (1997). Expression of a synthetic protein-based polymer (elastomer) gene in *Aspergillus nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(4), 368-372. <https://doi.org/10.1007/s002530050942>
17. Fletcher, E. E., Yan, D., Kosiba, A. A., Zhou, Y., & Shi, H. (2019). Biotechnological applications of elastin-like polypeptides and the inverse transition cycle in the pharmaceutical industry. *Protein Expression and Purification*, 153, 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.09.006>
18. Pavankumar, T. L. (2018). Inteins: Localized distribution, gene regulation, and protein engineering for biological applications. *Microorganisms*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010019>
19. Khanna, M., Imasaki, T., Chikwana, V. M., Perez-Miller, S., Hunter, G. O., Mosley, A., Takagi, Y., & Hurley, T. D. (2013). Expression and purification of functional human glycogen synthase-1 (hGYS1) in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 90(2), 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.007>
20. Liu, K., & Menassa, R. (2015). *Purification of Recombinant Proteins in Plants Using Small-Molecule Dependent Inteins Fused to ELP or HFB1*. <http://ir.lib.uwo.ca/etdhttp://ir.lib.uwo.ca/etd/3048>

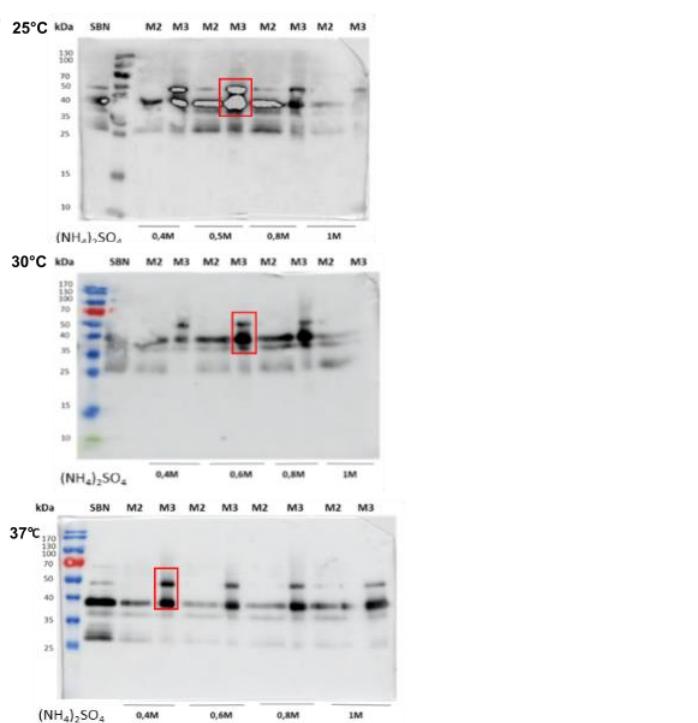
21. Wood, D. W., Wu, W., Belfort, G., Derbyshire, V., & Belfort, M. (1999). A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. En *NATURE BIOTECHNOLOGY* (Vol. 17). <http://biotech.nature.com>
22. Banki, M. R., Feng, L., & Wood, D. W. (2005). Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nature Methods*, 2(9), 659-661. <https://doi.org/10.1038/nmeth787>
23. Klatt, S., & Konthur, Z. (2012). Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microbial Cell Factories*, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-97>
24. Rossello, J., Lima, A., Gil, M., Rodríguez Duarte, J., Correa, A., Carvalho, P. C., Kierbel, A., & Durán, R. (2017). The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism. *Scientific Reports*, 7(1), 10281. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09926-3>
25. Meyer, D. E., & Chilkoti, A. (2004). Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 5(3), 846-851. <https://doi.org/10.1021/bm034215n>
26. Christensen, T., Trabbic-Carlson, K., Liu, W., & Chilkoti, A. (2007). Purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* at low expression levels by inverse transition cycling. *Analytical Biochemistry*, 360(1), 166-168. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.020>
27. Gifre, L., Arís, A., Bach, À., & Garcia-Fruitós, E. (2017). Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial Cell Factories*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0654-4>
28. Hassouneh, W., Christensen, T., & Chilkoti, A. (2010). Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science, SUPPL.* 61. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0611s61>

### Supplementary Figure 1.

A

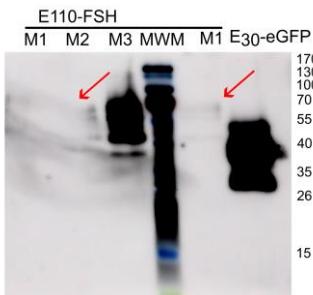


B



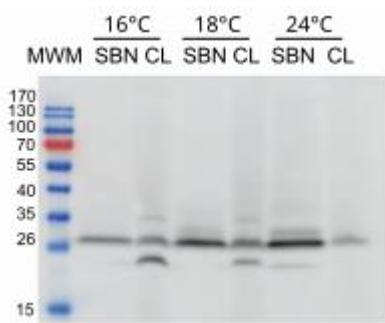
**Figure S1.** Evaluation of ELP-eGFP precipitation under different conditions by (A) Fluorometry and (B) Western blot. Samples from fractions M2 and M3 were analyzed following 15 min precipitation cycles of ELP-eGFP using varying concentrations of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.4, 0.6, 0.8, and 1 M) at different temperatures: 25°C, 30°C, and 37°C. SBN: culture supernatant; M2: soluble fraction after ELP precipitation; M3: insoluble fraction after ELP resolubilization

### Supplementary Figure 2.



**Figure S2.** Western blot of ITC precipitation process of ELP-bFSH. The supernatant (M1), non precipitated (M2), precipitated fractions (M3), and supernatant from ELP-eGFP (E30-eGFP) as a reference control, probed with an anti-His antibody. This Western blot is over-exposed to evidence faint ELP-bFSH bands in M1 and M2 fractions (red arrows).

### Supplementary Figure 3.



**Figure S3.** Effect of decreasing the culture temperature (24°C, 18°C and 16°C) on ELP-ΔICM-eGFP production in supernatants (SBN) and cell lysates (CL) from the constitutive *L. tarentolae* ELP-ΔICM-eGFP clone. Molecular weight marker (MWM).

### Author Contributions

LB.: methodology, investigation and draft writing. M.C., M.B.F and S.P: review and editing. MAC: supervision, review and editing. CA: conceptualization, supervision, funding acquisition, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, and further inquiries can be directed to the corresponding authors.

### Conflict of Interest

All authors declare no competing interests.

### Funding

This project was funded by the National Agency for Research and Innovation (ANII, FMV\_3\_2018\_1\_148443) and by MERCOSUR Structural Convergence Fund (FOCEM, COF 03/11). LB received a fellowship from ANII. C.A., M.C., S.P., M.A.C. and M.B.F. are members of the Basic Sciences

Development Program (PEDECIBA), and M.C., S.P., M.A.C. and M.B.F. are members of the National Research System, Uruguay (SNI).

### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to the Analytical Proteomics Unit (UByPA) from the Institut Pasteur de Montevideo for their support and assistance in the mass spectrometry analysis. They also express their gratitude to Dr. David W. Wood for his openness and willingness to answer questions regarding his work with the mini-intein and ELP, particularly in relation to the plasmid deposited in Addgene.