

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Química e Ingeniería



**Expresión heteróloga, purificación, y análisis de la actividad
proteolítica de la cisteína proteinasa 3 de *Entamoeba histolytica***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

ELISEO REYES VÁSQUEZ

Tijuana B. C.

Mayo de 2018.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No.26

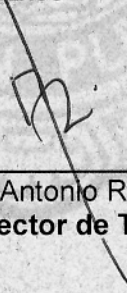
Tijuana, B. C., a 17 de mayo de 2018

C. Eliseo Reyes Vásquez
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra quien será el responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Expresión heteróloga, purificación, y análisis de la actividad proteolítica de la cisteína proteinasa 3 de *Entamoeba histolytica*", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

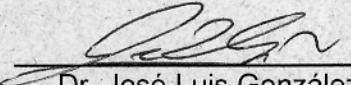
- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII. ANEXOS



Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

Reyes Vásquez, Eliseo
**Expresión heteróloga, purificación, y análisis de la actividad
proteolítica de la cisteína proteinasa 3 de *Entamoeba histolytica***
Tesis de licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: “Reyes Vásquez, Eliseo. Expresión heteróloga, purificación, y análisis de la actividad proteolítica de la cisteína proteinasa 3 de *Entamoeba histolytica*. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Mayo de 2018.”
- 3) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Reyes Vásquez, Eliseo. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2018.

Tesis: Expresión heteróloga, purificación, y análisis de la actividad proteolítica de la cisteína proteinasa 3 de *Entamoeba histolytica*
Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo
Institución: Universidad Autónoma de Baja California
Sustentante: Eliseo Reyes Vásquez
Fecha: Mayo de 2018

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC, bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra, con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): Fondo Sectorial SEP-CONACYT para Investigación en Ciencia Básica (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para Investigación en Salud (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra.

Los resultados correspondientes fueron presentados en el 5to. Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores en Baja California, realizado en el BIT Center de Tijuana, Baja California, los días 28 y 29 de septiembre de 2017. La participación en el evento académico fue apoyada por la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC.

Tesis: Expresión heteróloga, purificación, y análisis de la actividad proteolítica de la cisteína proteinasa 3 de *Entamoeba histolytica*
Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo
Institución: Universidad Autónoma de Baja California
Sustentante: Eliseo Reyes Vásquez
Fecha: Mayo de 2018

El presente Manuscrito de Tesis fue Revisado y Aprobado por un Comité Académico, conformado por los profesores:

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Presidente)
Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Secretaria)
Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, Dra. (Sinodal)
Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Suplente)
Pablo Alfonso Madero Ayala, QFB (Suplente)

Dedicatoria

A Dios, mi familia y mis amigos.

Agradecimientos

Agradecer primeramente a Dios por haberme permitido concluir esta etapa de mi vida.

A mi padre y madre por apoyarme y sobre todo tenerme paciencia, espero que con este trabajo se sientan orgullosos y demostrarles que sus esfuerzos e inversiones valieron la pena.

Mi familia en general, que a pesar de la distancia me han apoyado. También agradecer a mi prima Lorena por apoyarme y animarme en mis horas de estudio.

A mis compañeros y la gran familia del laboratorio de biotecnología; Ekaterina, Celina, Veronica, Berenice, Ana Laura, Uziel, Pablo, Álvaro. Por darme la oportunidad de convivir con ustedes, distraerme y compartir el mismo estrés estudiantil.

A Ekaterina por haberme apoyado en la teoría de este proyecto, darme sobre todo consejos en la teoría y en la parte experimental. Muchas gracias, fue un gusto haber trabajado con las EhCP's. También haber compartido algunos momentos agradables dentro y fuera del laboratorio.

A Celina, gracias por haberme distraído, aunque creo que fue lo contrario. Por cantar en el laboratorio, canciones que no me gustaban. Espero que nuestra amistad no se pierda como hasta ahora y sigamos reuniéndonos para comer al menos dos veces al día.

A Vero, a pesar del poco tiempo que se pudo convivir, por compromisos personales, te agradezco por ser mi amiga/hermana del laboratorio. Gracias por tolerar mis exageraciones que no eran.

A Zulahi por escucharme, en nuestros ratos de platica que tenemos, como en mi practica de mi defensa, te lo agradezco, también haber compartido viajes y reuniones junto con los demás amigos: Brisa y Samuel, gracias por considerar su amigo, haber estudiado y trabajado juntos la carrera, que nuestra amistad nunca se pierda como es hasta ahora.

Y sobre todo gracias al Dr. Marco Ramos y la Dra. Rosy Mares por darme la oportunidad de trabajar en su campo, por sus enseñanzas (conocimiento y experiencia), fortalecer mis conocimientos como químico y al mismo tiempo madurar. Y sobre todo haberme permitido haber participado en este proyecto.

Contenido

Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	6
Contenido.....	7
Índice de Figuras y Tablas.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Amibiasis como problema de salud	11
1.1.1. Amibiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	11
1.1.2. Ciclo de vida y enfermedad intestinal.....	11
1.1.3. Factores de virulencia	13
1.2. Cisteína proteinasas (CP) como factores de virulencia de protozoarios parásitos	14
1.3. La CP3 de <i>E. histolytica</i>	15
1.4. <i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión heteróloga	16
1.4.1. <i>E. coli</i> como modelo	16
1.4.2. Compartimientos subcelulares en <i>E. coli</i>	16
1.5. <i>E. coli</i> Shuffle Express como sistema bacteriano para la producción de <i>EhCP3</i>	17
2. OBJETIVO E HIPÓTESIS	18
2.1. Objetivo.....	18
2.2. Hipótesis.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Reactivos.....	19
3.2. Equipos	19
3.3. Plásmidos	19
3.4. Células bacterianas y medios de cultivo.....	20
3.5. Co-transformación de <i>E. coli</i> SHuffle Express con pQEhCP3-2 y pREP4	20
3.5.1. Preparación de bacterias competentes.....	20
3.5.2. Transformación de <i>E. coli</i> SHuffle Express con pQEhCP3-2.....	21
3.5.3. Co-transformación <i>E. coli</i> SHuffle Express portadora de pQEhCP3-2 con pREP4.....	21
3.6. Análisis de expresión de <i>EhCP3</i> a mini-escala	21
3.6.1. Inducción de la expresión en cultivo a mini-escala.....	21
3.6.2. Análisis de solubilidad proteica.....	21
3.6.3. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	22
3.7. Producción recombinante de <i>EhCP3</i> a midi-escala	22
3.7.1. Inducción de la expresión en cultivo a midi-escala.....	22
3.7.2. Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes (8 M de urea)	22
3.7.3. Purificación de <i>EhCP3</i> por cromatografía de afinidad a níquel y replegamiento oxidativo en columna	23
3.7.4. Purificación de <i>EhCP3</i> por cromatografía exclusión molecular	23
3.7.5. Cuantificación de <i>EhCP3</i> mediante micro-Bradford	23
3.8. Análisis de la actividad proteolítica de <i>EhCP3</i>.....	24
3.8.1. Ensayo zimográfico	24
3.8.2. Ensayo fluorométrico.....	24
3.9. Tratamiento de datos y análisis estadístico	24

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1. Inducción de <i>EhCP3</i> recombinante en <i>E. coli</i> SHuffle Express	26
4.2. <i>EhCP3</i> recombinante se agrega en cuerpos de inclusión y se solubiliza con 8 M de urea	26
4.3. Producción recombinante de <i>EhCP3</i> y análisis zimográfico	27
4.4. <i>EhCP3</i> recombinante exhibe actividad proteolítica.....	28
5. CONCLUSIONES.....	29
6. BIBLIOGRAFÍA.....	30

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1-1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	12
Figura 1-2. Proteasas de <i>E. histolytica</i> como factores de virulencia durante la Amibiasis Intestinal.	14
Figura 1-3. Localización de proteasas en <i>E. histolytica</i> .	15
Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pREP4.	20
Figura 3-1. Representación esquemática del plásmido pQEhCP3-2.	20
Figura 4-1. Análisis de inducción de <i>EhCP3</i> en <i>E. coli</i> SHuffle Express (portadora de pQEhCP3-2 y pREP4).	26
Figura 4-2. Purificación de <i>EhCP3</i> mediante cromatografía de afinidad a níquel acoplada a replegamiento oxidativo en columna (A) y análisis zimográfico (B).	27
Figura 4-3. Análisis cuantitativo de la actividad proteolítica de la <i>EhCP3</i> recombinante pura.	28
Tabla 1-1. Función de las cisteína proteinasas expresadas en protozoarios parásitos de importancia médica.	15

Abreviaturas

CP	Cisteína proteínasas
DTT	Ditiotreitol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h; min; seg	Horas; minutos; segundos
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	KiloDaltons
L, mL, μ L	Litros, mililitros, microlitros
M, mM	Molar, milimolar
mg, μ g	Miligramos, microgramos
$^{\circ}$ C	Grados centígrados (Celsius)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
URF	Unidades relativas de fluorescencia
V	Volts

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Amibiasis como problema de salud

1.1.1. Amibiasis y *Entamoeba histolytica*

La amibiasis es una infección intestinal causado por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. A nivel mundial, esta patología es prevalente en regiones tropicales y subtropicales donde la calidad sanitaria es baja o deficiente. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existe mayor incidencia en África, Asia, y Latinoamérica. De manera notable, anualmente se reportan cerca de 100 mil muertes derivadas de la enfermedad y se estima que alrededor del 10% de la población mundial está infectada [Fleming et al., 2015]. En México, la amibiasis intestinal es una de las 20 enfermedades más comunes, ubicándose en el 15° lugar [Rojas et al., 2016].

La infección inicia mediante el consumo de alimentos o bebidas contaminadas con el parásito. Una vez establecida la enfermedad intestinal, los pacientes son tratados con metronidazol, con o sin paromomicina. Sin embargo, a pesar de que la mayoría logra una remisión de la infección, algunos llegan a mostrar complicaciones, tales como dolor epigástrico, náusea, y vómito, entre otras alteraciones gastrointestinales [Fleming et al., 2015]. Por otro lado, cuando la infección se disemina (extraintestinal), la enfermedad presenta complicaciones más graves, p.ej., absceso hepático amibiano (más común) [Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009].

E. histolytica es un protozoo unicelular micro-aerófilo; es decir, puede sobrevivir en ambientes con bajos niveles de oxígeno. Durante su ciclo de vida, presenta dos estadios estables: (i) trofozoito, o forma invasiva, que es pleomórfico, mono-nucleado, y puede medir 10-60 µm de diámetro, y (ii) quiste, o forma infectiva, que es esférico, tetra-nucleado, y presenta un diámetro de 10-20 µm. De manera interesante, comparte similitud morfológica con *E. dispar* y *E. moshkovskii*, dos amibas no patógenas que se han identificado en evacuaciones de individuos no enfermos [Serrano-Luna et al., 2013].

1.1.2. Ciclo de vida y enfermedad intestinal

La Figura 1-1 esquematiza el ciclo de vida de *E. histolytica*. Inicialmente, los quistes ingeridos viajan hacia el estómago, donde su pared se reblandece e inician el proceso denominado *desenquistamiento*. Durante su trayecto por el intestino delgado, tal proceso es facilitado por acción de enzimas líticas. Al llegar al íleon, el parásito eclosiona liberando un trofozoito tetra-nucleado, el cual, de manera inmediata, sufre una duplicación nuclear seguida de una división celular, rindiendo

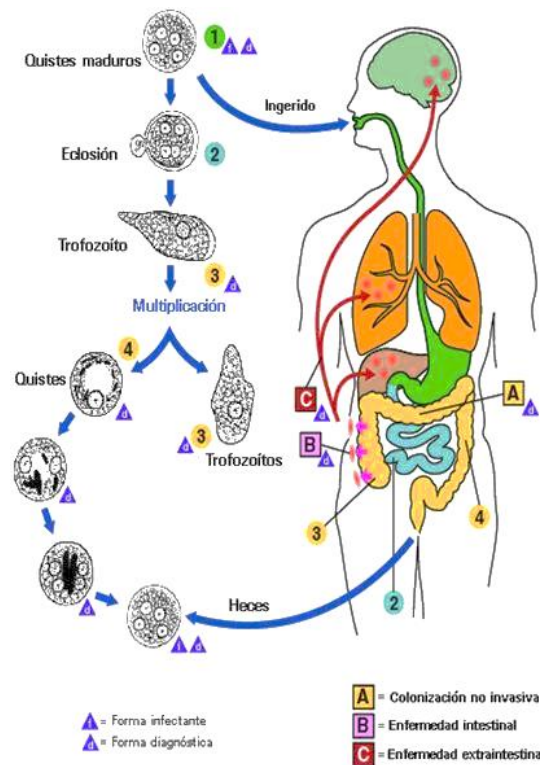


Figura 1-1. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Tomado de Centro de control de enfermedades de E.U.A. (CDC, <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>).

ocho trofozoitos mono-nucleados. Si las condiciones son favorables, los trofozoitos migran hacia la región íleocecal, donde se establecen y colonizan, mediante adhesión y duplicación celular, ocasionando la enfermedad intestinal. En caso contrario, si las condiciones son desfavorables, el trofozoito sigue su curso a través del intestino grueso, durante el cual, por acción de un estímulo aún desconocido, sufre dos duplicaciones nucleares continuas y sintetiza una pared quística (proceso llamado «enquistamiento»). Finalmente, el quiste maduro (tetra-nucleado) es liberado al medio ambiente a través de las heces, el cual, en condiciones precarias de higiene, puede contaminar alimentos o bebidas [Serrano-Luna et al., 2013].

La principal manifestación clínica de la enfermedad intestinal es la colitis amibiana, que se caracteriza por fiebre, dolor abdominal, y diarrea. De manera ocasional, estos síntomas se pueden acompañar de hematoquecia (heces color rojo-marrón, ocasionado por un sangrado intestinal). Por otro lado, como infección parasitaria, muestra leucocitosis y, en casos extremos, anemia. El epitelio gastrointestinal representa la primera línea de defensa, ya que posee una capa de mucosa que evita la adherencia del trofozoito. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo tiende a reducir la interacción

parásito-tejido, vía la producción de anticuerpos neutralizantes (IgA) dirigidos contra lectinas de superficie amibiana. Además, durante las primeras etapas de la infección, el sistema responde con quimiocinas y citocinas que reclutan componentes celulares inmunitarios [Fleming et al., 2015].

1.1.3. Factores de virulencia

Existen diversos factores de virulencia que se han asociado al desarrollo de la amibiasis; sin embargo, tres revisten especial interés para la patogenia: (i) la lectina de unión a residuos de galactosa y N-acetil-galactosamina, (ii) los amibaporos, y (iii) las cisteína proteinasas.

Lectina de unión a galactosa y N-acetil-galactosamina: En la superficie del trofozoito, se encuentra la «lectina Gal/NAcGal», la cual posee la habilidad de unirse a residuos de los azúcares galactosa y N-acetil-galactosamina, presentes en la superficie de células epiteliales, y favorece la adhesión al intestino del hospedero. Esto es importante para el estilo de vida de *E. histolytica*, ya que constituye la primera etapa para el establecimiento y la colonización parasítica. La lectina Gal-NAcGal contiene tres subunidades, una pesada (hgl) de 170 kDa y una ligera (lgl) de 31-35 kDa, unidas por enlaces disulfuros, y una intermedia (igl) de 150 kDa, asociada no covalentemente al dímero hgl-lgl [Clark et al., 2007; Sánchez et al., 2016].

Amibaporos: También llamados «péptidos formadores de poros», son polipéptidos secretados por el trofozoito que se incorporan a membranas e inducen la formación de canales acuosos en las células del hospedero. Estos canales permiten el paso de iones (salida de K^+ Na^+ y entrada de Ca^{++}), ocasionado lisis celular por choque osmótico [Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009; Ralston y Petri, 2011]. Una de las principales funciones de los amibaporos es su actividad citotóxica [Winkelmann et al., 2006]. Existen 3 isoformas: EhAP-A, EhAP-B, y EhAP-C, expresadas en proporción de 35:10:1. [Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009]

Cisteína proteinasas: Son factores fundamentales para la citotoxicidad amibiana. De manera interesante, el análisis del genoma reveló que *E. histolytica* contiene 50 genes que codifican para cisteína proteinasas (EhCP) [Ralston y Petri 2011]. Desafortunadamente, el papel funcional de cada EhCP aún no se ha establecido claramente; sin embargo, mediante diferentes ensayos: moleculares, bioquímicos, e inmunohistoquímicos, se determinó que un subgrupo se expresa en altos niveles (en el estadio de trofozoito) y participa activamente durante enfermedad intestinal (Figura 1-2): EhCP1, EhCP2, EhCP3, EhCP4, EhCP5, y EhCP112 [Serrano-Luna et al., 2013].

De manera general, la actividad proteolítica de las EhCP se ha asociado a la degradación de diferentes sustratos polipeptídicos del hospedero, tales como factores del complemento, proteínas de la matriz extracelular, inmunoglobulinas e interleucinas, y mucina [Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009].

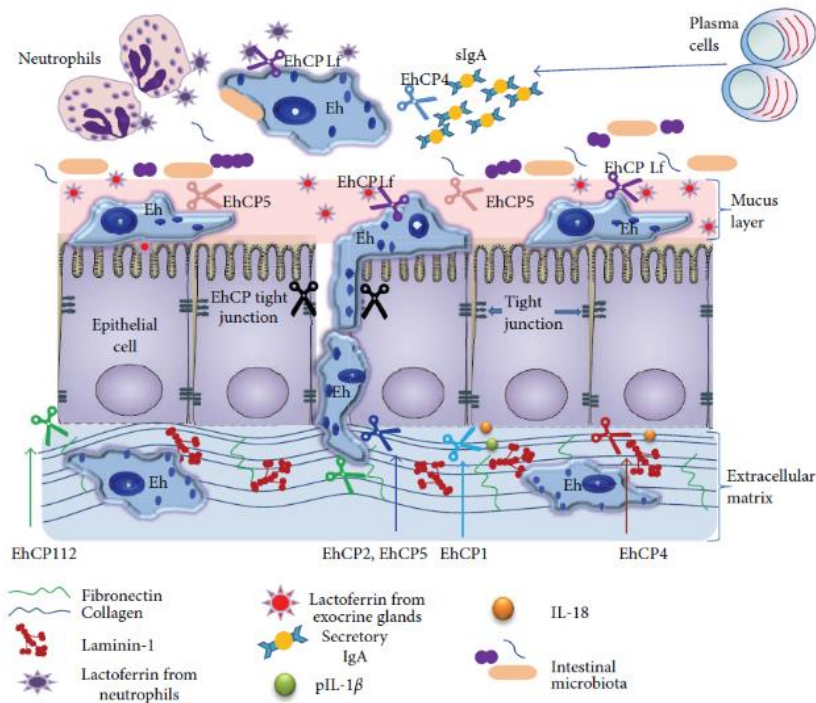


Figura 1-2. Proteasas de *E. histolytica* como factores de virulencia durante la Amibiasis Intestinal.

Tomado de Serrano-Luna (2013).

1.2. Cisteína proteinasas (CP) como factores de virulencia de protozoarios parásitos

Estos factores de virulencia son elementales para protozoarios parásitos de importancia médica, ya que facilitan los procesos de infección y la citotoxicidad [Bruchhaus *et al.*, 2003]. De manera específica, están involucrados en la hidrólisis de proteínas de importancia fisiológica del hospedero, p.ej. hemoglobina, interleucinas, y anticuerpos, permitiéndoles la supervivencia y la evasión del sistema inmune [Verma *et al.*, 2016].

Las CP pertenecen a la superfamilia de enzimas parecidas a papaína [Grzonka *et al.*, 2001]. Típicamente, contienen un sitio activo conformado por tres aminoácidos (triada catalítica): Cys, His, y Asn. Además, se expresan como zimógenos (pro-enzima), con un pro-dominio que impide el contacto del sustrato con el sitio activo [Verma *et al.*, 2016], suelen presentar pesos moleculares entre 21 y 30 kDa, y exhiben máxima actividad proteolítica en un ambiente ácido (pH de 4.0 a 6.5) [Grzonka *et al.*, 2001].

Las CP participan en diferentes etapas del ciclo de vida de diversos protozoarios parásitos de importancia médica [Rosenthal, 1999]. La Tabla 1-1 enlista algunas funciones ya definidas.

Tabla 1-1. Función de las cisteína proteinasas expresadas en protozoarios parásitos de importancia médica.

Protozooario parásito	Función de CP
<i>Leishmania</i>	Proteólisis intracelular.
<i>Trypanosoma brucei</i>	Diferenciación parasitaria.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Diferenciación parasitaria. Invasión de células hospederas.
<i>Plasmodium</i>	Degradación de hemoglobina. Ruptura e invasión del eritrocito.
<i>Entamoeba histolytica</i>	Invasión tisular. Activación del complemento.
<i>Giardia</i>	Desenquistamiento.
<i>Trichomonas</i>	Fijación en células epiteliales.
<i>Toxoplasma</i>	Proteólisis intracelular.
<i>Cryptosporidium</i>	Invasión de células hospederas.

1.3. La CP3 de *E. histolytica*

El gen codificante para *EhCP3* (GenBank No. X87214: 927 pb, carente de intrones) se expresa como un polipéptido precursor (pre-pro-enzima) de 308 aminoácidos, con un péptido señal de 13 residuos (N-terminal), seguido de un pro-dominio de 79 residuos, y un dominio catalítico C-terminal de 216 residuos (UniProt No. P36184). Los residuos Cys¹¹⁵, His²⁵¹, y Asn²⁷¹ corresponden a la triada catalítica. Aunque su estructura terciaria (3D) no se ha resuelto, se predice la formación de dos enlaces disulfuros: Cys¹¹²↔Cys¹⁵³ y Cys¹⁴⁶↔Cys¹⁸⁶, los cuales presumiblemente estabilizan su conformación. A pesar de que el análisis estructural sugirió una alta similitud con proteínas parecidas a catepsina L, los estudios funcionales *in vitro* mostraron que exhibe preferencia por sustratos de catepsina B [Serrano-Luna *et al.*, 2013], indicando que *EhCP3* posee propiedades estructurales y funcionales atípicas.

No obstante, su función y participación en la patogenicidad de *E. histolytica* no se han definido de manera clara, es prevalente la noción que sugiere a *EhCP3* como factor clave en la

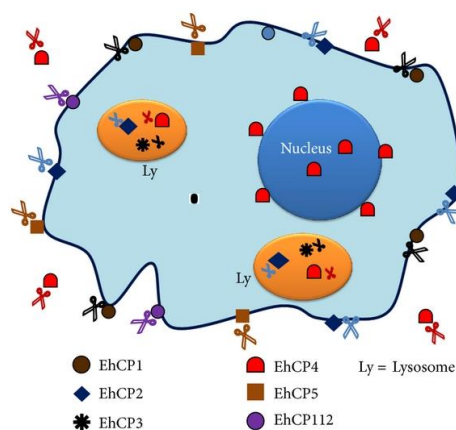


Figura 1-3. Localización de proteasas en *E. histolytica*.

Tomado de Serrano-Luna (2012).

digestión de nutrientes durante la invasión de tejidos [Que *et al.*, 2002]. Esta hipótesis se apoya en la observación (reportada) que demuestra una expresión activa y una localización subcelular notoria en lisosomas de trofozoitos durante la fagocitosis de eritrocitos (Figura 1-3) [Serrano-Luna *et al.*, 2013].

1.4. *Escherichia coli* como sistema de expresión heteróloga

Las proteínas son biomoléculas utilizadas en una amplia variedad de protocolos científicos y tecnológicos, desde ensayos bioquímicos analíticos hasta diagnóstico clínico e intervención terapéutica. Habitualmente, la obtención de proteínas puras a partir de sus fuentes naturales representa un procedimiento laborioso y de bajo rendimiento. Además, algunas proteínas dependen de modificaciones post-traduccionales, p. ej., enlaces disulfuro, que son importantes para su estabilidad y función [Lobstein *et al.*, 2012] En la actualidad, la producción recombinante es una alternativa viable para la obtención de proteínas de interés biomédico, farmacéutico e industrial. Diversos modelos celulares se han utilizado de manera favorable, siendo bacterias, levaduras, y células de mamíferos o de plantas, los sistemas de mayor aplicación.

1.4.1. *E. coli* como modelo

E. coli es el principal sistema bacteriano de producción de proteínas recombinantes. Por tal motivo, se han desarrollado cepas, con diferentes genotipos y fenotipos, orientadas hacia el mejoramiento y optimización del sistema de producción [Lara, 2011]. Por ejemplo: (i) BL21, que es deficiente de las proteasas Lon y OmpT, reduciendo la degradación de proteínas en el citosol; (ii) Rossetta, que expresa codones raramente utilizados en la bacteria, favoreciendo la expresión de genes eucarióticos; (iii) Origami, que presenta mutaciones en los genes codificantes de tioredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), promoviendo un ambiente citosólico con capacidad de plegamiento oxidativo, y (iv) SHuffle Express, que además de la deficiencia de Lon y OmpT, y de las mutaciones en *trxB* y *gor*, presenta una mutación en el gen *ahpC* (codificante para una tiol-reductasa bacteriana), confiriendo una disminución en la actividad disulfuro reductasa, y contiene una inserción del gen codificante para DsbC (la disulfuro isomerasa bacteriana), mejorando de manera significativa la capacidad citosólica de plegar adecuadamente a proteínas con múltiples enlaces disulfuro [Lara, 2011; Lobstein *et al.*, 2012].

1.4.2. Compartimientos subcelulares en *E. coli*

E. coli posee dos compartimientos subcelulares que contienen maquinarias especializadas para la eficiente producción de proteínas recombinantes: (i) el citosol, naturalmente reductor, que favorece

la producción eficiente de proteínas carentes de enlaces disulfuros, y (ii) el periplasma, con potencial altamente oxidante, que promueve la producción de proteínas correctamente plegadas y oxidadas, ya que posee una maquinaria especializada para esos procesos, tales como las oxidorreductasas DsbA (oxidasa) y DsbC (reductasa e isomerasa) [Lobstein *et al.*, 2012].

1.5. *E. coli* Shuffle Express como sistema bacteriano para la producción de *EhCP3*

Aunque la estructura tridimensional de la proteinasa *EhCP3* no ha sido resuelta por los métodos clásicos (cristalografía de rayos X o resonancia magnética 2D), los estudios de predicción de la estructura terciaria indican la presencia de cuanto menos tres enlaces disulfuro no consecutivos. Ante tal posibilidad, es conveniente considerar un sistema celular que promueva el plegamiento oxidativo y, a su vez, la producción recombinante en condiciones que favorezcan su purificación (es decir, soluble). De manera interesante, la bacteria *E. coli* SHuffle Express representa un sistema bacteriano con potencial para la producción recombinante de *EhCP3*, ya que posee las características genéticas, bioquímicas y celulares que fomentan un correcto plegamiento oxidativo en su compartimiento citosólico.

2. OBJETIVO E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo

Implementar un procedimiento de producción recombinante de la cisteína proteinasa 3 de *E. histolytica* (*EhCP3*), utilizando a pQEhCP3-2 como vector de expresión citosólica y a *E. coli* SHuffle Express como sistema bacteriano, mediante protocolos típicos de sobreexpresión inducida y separación por cromatografía de afinidad a metales, para la obtención de proteína pura y activa.

2.2. Hipótesis

La proteína *EhCP3* puede ser obtenida de manera pura y activa mediante un procedimiento de producción recombinante en *E. coli* SHuffle Express y purificación a partir de extractos solubles de proteínas citosólicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Amresco: cloruro de sodio (NaCl). *Becton Dickinson*: agar bacteriológico; extracto de levadura; triptona. *Biorad*: azul brillante de *Coomassie* R-250. *Fermont*: etanol. *FM Science*: 2-mercaptoetanol. *MP Biomedicals*: glicina. *Productos Químicos de Monterrey*: cloruro de calcio (CaCl₂). *Scientific Industries*: perlas de vidrio 0.1 mm. *Shelton Scientific (IBI)*: dodecil sulfato de sodio (SDS); glicerol; isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); Tris; Tritón X-100. *Sigma*: gelatina de porcino; reactivo de *Bradford*; reactivo *CellLytic* B.

3.2. Equipos

Los cultivos bacterianos en medio líquido se proliferaron en una incubadora con agitación y ambiente controlado de tipo *Incubator Shaker Series 25* (*New Brunswick Scientific Co.*). Las incubaciones en microtubo se realizaron en un termobloque digital *Dry Block Heater* (*VWR*). Las separaciones por micro-centrifugación se realizaron en las centrífugas *Biofuge Fresco* (*Heraeus*) o *MiniSpin Plus* (*Eppendorf*); en tanto las de alto volumen en una centrífuga *Allegra™ X-22R* (*Beckman Coulter*). Los lisados celulares se prepararon en un homogenizador *Disruptor Genie* (*Scientific Industries Inc*) o en un sonicador *Ultrasonic Liquid Processor XL-2000* (*Misonix*). Los registros colorimétricos o fluorométricos de ensayos realizados en micro-volúmenes se obtuvieron usando los espectrofotómetros para lectura de microplacas *Microplate Reader 680* (*Biorad*) y *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (*Varian*), respectivamente.

3.3. Plásmidos

El plásmido pQEhCP3-2 (Figura 3-1) se construyó en el laboratorio de biotecnología de la FCQI-UABC (Dr. Marco Ramos, comunicación personal) y forma parte de la reserva de reactivos biológicos. Es derivado del vector comercial pQE30 (*Qiagen*) y contiene la secuencia codificante para el péptido maduro de *EhCP3* en fase con un hexámero de histidinas en el extremo N-terminal. La expresión proteica está regulada por la secuencia promotora-operadora proT5/lacO, la cual es inducible por el análogo de lactosa IPTG. Además, conserva el gen codificante para la enzima β -lactamasa, que favorece la selección mediante resistencia a ampicilina, y el origen de replicación

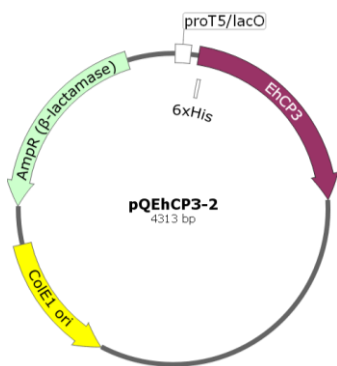


Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pQEhCP3-2.

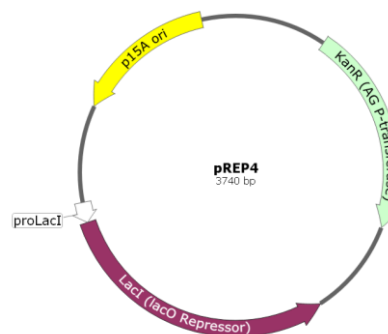


Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pREP4.

Cole1, que permite su mantenimiento de manera episomal. El plásmido comercial pREP4 (Figura 3-2), derivado del vector pACYC177, expresa de manera constitutiva al represor LacI, el cual regula negativamente a la secuencia operadora lacO. Además, incluye el gen codificante para la enzima aminoglucósido fosfotransferasa, que favorece la selección mediante resistencia a kanamicina, y el origen de replicación p15A, que permite su mantenimiento de manera episomal y es compatible con plásmidos que portan al origen Cole1.

3.4. Células bacterianas y medios de cultivo

La bacteria *E. coli* SHuffle Express [*fhuA2* [*lon*] *ompT* *ahpC* *gal* λ att::pNEB3-r1-cDsbC (*Spec^R*, *lacI^a*) Δ trxB *sulA11* R(*mcr-73::miniTn10--Tet^S*)2 [*dcm*] R(*zgb-210::Tn10--Tet^S*) *endA1* Δ gor Δ (*mcrC-mrr*)114::IS10] (New England Biolabs) se utilizó como célula hospedera en los ensayos de expresión y producción recombinante de EhCP3. Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) líquido (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura; 1% de NaCl) o sólido (LB más 1.7% de agar bacteriológico). Cuando fue requerido, los medios se suplementaron con ampicilina (0.15 mg/mL) y/o kanamicina (0.025 mg/mL). Después de la transformación, las bacterias se recuperaron en medio 2X YT (1.6% de triptona; 1% de extracto de levadura; 0.5% de NaCl).

3.5. Co-transformación de *E. coli* SHuffle Express con pQEhCP3-2 y pREP4

3.5.1. Preparación de bacterias competentes

La pastilla celular de 1 mL de cultivo joven en fase de crecimiento exponencial (0.4-0.6 UDO₆₀₀) se obtuvo mediante centrifugación leve (5,000 rpm; 5 min; 10 °C). Enseguida, la pastilla se

lavó con 0.5 mL de agua destilada fría-estéril y se acondicionó con 0.5 mL de solución 100 mM de CaCl_2 fría-estéril. Ambos tratamientos se efectuaron mediante resuspensión celular, incubación en hielo (5 min) y centrifugación leve (5,000 rpm; 5 min; 10 °C). Finalmente, la pastilla se resuspendió en 0.05 mL de solución 100 mM de CaCl_2 fría-estéril y se mantuvo en hielo (5 min).

3.5.2. Transformación de *E. coli* SHuffle Express con pQEhCP3-2

Una suspensión de células competentes (*E. coli* SHuffle Express) se mezcló con 1 μL de solución del ADN plasmídico pQEhCP3-2 (± 100 ng) y se incubó en hielo durante 30 min. El choque térmico se realizó de la siguiente manera: 1.5 min a 42 °C seguidos de 5 min en hielo. Inmediatamente, las células se recuperaron en 1 mL de 2X YT (1 h a 37 °C). Las transformantes estables se proliferaron durante la noche (14-16 h) a 37 °C en medio LB sólido suplementado con ampicilina.

3.5.3. Co-transformación *E. coli* SHuffle Express portadora de pQEhCP3-2 con pREP4

Una suspensión de células competentes (*E. coli* SHuffle Express portadora de pQEhCP3-2) se mezcló con 1 μL de solución del ADN plasmídico pREP4 (± 100 ng) y se incubó en hielo durante 30 min. El choque térmico y la recuperación celular se realizaron como antes. Las transformantes estables se proliferaron en medio LB sólido suplementado con ampicilina y kanamicina.

3.6. Análisis de expresión de *EhCP3* a mini-escala

3.6.1. Inducción de la expresión en cultivo a mini-escala

Inicialmente, una suspensión bacteriana (20 μL) de *E. coli* SHuffle Express co-portadora de pQEhCP3-2 y pREP4 se inoculó en 2 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina y kanamicina. Enseguida, se incubó durante la noche (12-14 h) en condiciones de proliferación celular (37 °C; 300 rpm). Al día siguiente, se preparó un subcultivo (1:100) en 5 mL de medio fresco y se incubó durante 2 h a 37 °C y 300 rpm (fase de pre-inducción). Posteriormente, el inductor (IPTG) se suplementó a una concentración final de 1 mM y se continuó con la incubación durante 4 h a 37 °C y 300 rpm (fase de expresión). Paquetes celulares, provenientes de 1 mL de cultivo, se colectaron mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min) y se almacenaron en congelamiento hasta su análisis.

3.6.2. Análisis de solubilidad proteica

La solubilidad de *EhCP3* se analizó usando tres soluciones: (1) *CellLytic* B; (2) 8 M de urea en 0.1 M de Tris-HCl, pH 8.0; y (3) 1% de Tritón X-100 en 0.1 M de Tris-HCl, pH 8.0. Un paquete

celular se resuspendió en 100 μ L de cada solución. La disrupción celular se favoreció mediante agitación vigorosa (3,000 rpm; 5 min) en presencia de perlas de vidrio (0.1 mm). Las fracciones solubles (FS) se separaron mediante micro-centrifugación (14,500 rpm; 15 min), se mezclaron con 100 μ L de solución 2X para SDS-PAGE y se desnaturalizaron (95-100 °C, 10 min). Las fracciones insolubles (FI) se resuspendieron en 200 μ L de solución 1X para SDS-PAGE, se agitaron vigorosamente en un disruptor (5 min; 3,000 rpm) y se desnaturalizaron (95-100 °C, 10 min). Todas las fracciones se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

3.6.3. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Una muestra de solución de proteínas (10 μ L de cada fracción) en solución 1X para SDS-PAGE (5% de glicerol; 1.25% de SDS; 25 mM de Tris-HCl, pH 6.8; 2.5% de 2-mercaptoetanol; 0.001% de azul de bromofenol) se cargó en un gel de SDS-poliacrilamida al 13.5%. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel sumergido (en solución 1X del amortiguador TANK: 25 mM de Tris; 200 mM de glicina; 0.1% de SDS) durante 90-120 min a voltajes constantes: 80 V (fase de concentración) y 120 V (fase de separación). El patrón de migración se reveló mediante la tinción de proteínas con azul brillante de *Coomassie* R-250 y se documentó de manera digital.

3.7. Producción recombinante de *EhCP3* a midi-escala

3.7.1. Inducción de la expresión en cultivo a midi-escala

Una suspensión bacteriana (20 μ L) de *E. coli* SHuffle Express co-portadora de pQEhCP3-2 y pREP4 se inoculó en 2 mL de LB líquido suplementado con ampicilina y kanamicina. Enseguida, se incubó durante la noche (12-14 h) en condiciones de proliferación celular (37 °C; 300 rpm). Al día siguiente, se prepararon subcultivos (1:100) en 100 mL de medio fresco y se incubó durante 2 h a 37 °C y 300 rpm (fase de pre-inducción). Posteriormente, el inductor (IPTG) se adicionó a una concentración final de 0.1 mM y se continuó con la incubación durante 6 h a 37 °C y 300 rpm (fase de sobreexpresión). Los paquetes celulares se colectaron mediante centrifugación (9,500 rpm; 15 min; 10 °C) y se almacenaron en congelación hasta la extracción.

3.7.2. Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes (8 M de urea)

Los paquetes celulares se resuspendieron en 5 mL de solución TTB (1% de Tritón X-100; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0) y la lisis celular se completó por sonicación durante 10 min (10 ciclos: 30 seg, ON; 30 seg, OFF; potencia de 15/20; en hielo). La fracción insoluble se colectó mediante centrifugación (9,500 rpm; 10 min; 10 °C) y el precipitado (cuerpos de inclusión) se lavó con 5 mL

de TTB. Enseguida, los cuerpos de inclusión se solubilizaron en 5 mL de la solución 8UTB (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0) mediante 5 min de agitación vigorosa (vórtex) seguidos de 10 min de agitación suave (vaivén en plataforma). La fracción soluble se aisló por centrifugación (9,500 rpm; 10 min; 10 °C) y se clarificó mediante micro-centrifugación (13,000 rpm; 10 min; 10 °C). Los extractos clarificados se almacenaron en refrigeración hasta su purificación.

3.7.3. Purificación de *EhCP3* por cromatografía de afinidad a níquel y replegamiento oxidativo en columna

Inicialmente, se preparó una columna de cromatografía con 0.5 mL (colchón) de resina de agarosa-NTA-níquel, ambientada con solución 8UTB. El extracto clarificado se cargó lentamente en la columna y se pasó tres veces a través de la resina. Inmediatamente, se realizó un replegamiento oxidativo en columna lavando la resina con 7.5 mL de solución RO-10 (100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de GSSG; 10 mM de imidazol, pH 8.0) seguidos de 7.5 mL de solución RO-20 (100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de GSSG; 20 mM de imidazol, pH 8.0). Finalmente, la proteína recombinante (*EhCP3*) se recuperó mediante elución en fracciones (0.5 mL) de solución RO-E (100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de GSSG; 250 mM de imidazol, pH 8.0). La eficiencia de la purificación se verificó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (13.5%) y ensayos zimográficos.

3.7.4. Purificación de *EhCP3* por cromatografía exclusión molecular

La columna de cromatografía PD-10 (*Amersham*) que contiene la resina Sepharose® G-25 (fase estacionaria) fue equilibrada con 25 mL de solución amortiguadora de fosfatos (1X DPBS). Enseguida, se cargaron 2.5 mL de solución de proteína recombinante (*EhCP3*) y se descartó el efluente. Finalmente, *EhCP3* se obtuvo mediante elución con 3.5 mL de solución 1X DPBS.

3.7.5. Cuantificación de *EhCP3* mediante micro-Bradford

De manera conveniente, las soluciones de proteína purificada se diluyeron a una concentración aproximada de 10-40 µg/mL, usando agua destilada como diluyente (habitualmente, se utilizó una dilución 1:25). De manera paralela, se realizó una curva estándar usando diferentes concentraciones de albúmina sérica de bovino (BSA): 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL. En una microplaca de titulación, los volúmenes analíticos de muestra (50 µL) se mezclaron con 100 µL del reactivo de Bradford. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, las absorbancias a longitudes de onda de 450 y 595 nm (A_{450} , A_{595}) se registraron usando un lector de microplacas. La concentración de proteína fue determinada interpolando la relación A_{595}/A_{450} de la muestra analítica

en la curva estándar de BSA (A_{595}/A_{450} en función de $\mu\text{g/mL}$) y multiplicando por el factor de dilución.

3.8. Análisis de la actividad proteolítica de *EhCP3*

3.8.1. Ensayo zimográfico

Las muestras analíticas se prepararon mezclando 1 volumen de solución de proteínas con 1 volumen de solución 2X para SDS-PAGE en condiciones no reductoras (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Enseguida, una alícuota (10 μL) de cada muestra se cargó en un gel de SDS-poliacrilamida al 13.5%, suplementado con gelatina al 0.1%. La separación de proteínas se realizó a 80 V (constante). Una vez concluida, el gel se trató con solución TBST (10 mM de Tris-HCl pH 8.0; 150 mM de NaCl; 2.5% de Tritón X-100) durante 30 min, a temperatura ambiente y agitación leve (vaivén en plataforma). Después, se lavó 3 veces (10 min cada ocasión) con solución TBS (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl). Enseguida, la actividad proteolítica se activó con solución TE-DTT (25 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM de EDTA; 5 mM de DTT) y la hidrólisis del sustrato en el gel se concedió a 37 °C durante 12-14 h. Finalmente, el gel se tiñó durante 4 h con solución CBB (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul brillante de *Coomassie* R-250) y desteñido durante 12-18 h con solución alcohol-ácido (10% de isopropanol; 10% de ácido acético).

3.8.2. Ensayo fluorométrico

Las mezclas de reacción (0.2 mL) se prepararon en solución 1X DPBS conteniendo 8 $\mu\text{g/mL}$ de FITC-gelatina (sustrato fluorogénico) y diferentes cantidades de *EhCP3*. La reacción procedió por 2 h a 37 °C y se detuvo con 50 μL de solución al 20% de ácido tricloroacético. Después de 5 min en hielo, la fracción soluble se aisló mediante centrifugación (13,000 rpm; 10 min; 10 °C) y los productos de hidrólisis se analizaron mezclando 100 μL del sobrenadante con 100 μL de solución 1 M de Tris-HCl (pH 8.0). La señal fluorescente se cuantificó usando un espectrofluorómetro de microplaca, a longitudes de 490 y 525 nm (excitación y emisión).

3.9. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos dos-tres veces. Los datos o resultados que mostraron evidencias de un sesgo no asociado a la hipótesis; p. ej. error experimental, técnico, o humano, fueron eliminados. Los resultados de cada experimento se expresaron como media $\pm$ error

estándar y su significancia fue analizada mediante ANOVA y, de ser necesario, con una prueba t. La significancia estadística se considera cuando $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete computacional *GraphPad™ Prism®* v 4.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Inducción de *EhCP3* recombinante en *E. coli* SHuffle Express

De manera eficiente, *E. coli* SHuffle Express se transformó con los plásmidos pQEhCP3-2 y pREP4, los cuales pueden coexistir gracias a que contienen orígenes de replicación compatibles, ColE1 y p15A.

Inicialmente, la inducción de la proteína recombinante se confirmó mediante un ensayo de expresión a mini-escala. Como se indica en la Figura 4-1, una proteína de aprox. 33 kDa se denota en el carril CI (con inductor, 1 mM de IPTG), concordante con el tamaño esperado para la *EhCP3* recombinante (33.9 kDa).

Cabe destacar que, aparentemente, no se observa expresión en ausencia del inductor (carril SI), lo que corrobora la regulación estricta del sistema de expresión de *EhCP3*, por expresión constitutiva del represor LacI.

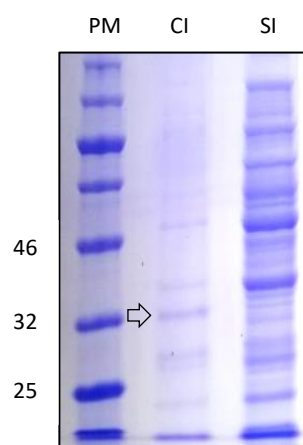


Figura 4-1. Análisis de inducción de *EhCP3* en *E. coli* SHuffle Express (portadora de pQEhCP3-2 y pREP4).

SDS-PAGE al 13.5% teñido con azul de Coomassie. Separación de lisados bacterianos totales. PM, marcador de PM (izquierda, kDa); CI, con inductor (1 mM de IPTG); SI, sin inductor. La flecha indica la movilidad relativa de la *EhCP3* recombinante.

4.2. *EhCP3* recombinante se agrega en cuerpos de inclusión y se solubiliza con 8 M de urea

De manera subsecuente, se analizó la solubilidad de la *EhCP3* recombinante, producida en las condiciones fisiológicas bacterianas (citósol de *E. coli*), mediante un mini-ensayo de solubilización de proteínas totales en condiciones nativas y desnaturalizantes. Los resultados (no mostrados) indicaron que la *EhCP3* recombinante no es soluble en condiciones nativas y, además, aparentemente se agrega en cuerpos de inclusión (ya que se observó una acumulación de la proteína de interés en la fracción insoluble). Sin embargo, las condiciones desnaturalizantes (8 M de urea) mostraron una eficiente extracción de la proteína de interés (<20% permanece en la fracción insoluble), lo que supone una alternativa viable para la solubilización de la *EhCP3* recombinante.

4.3. Producción recombinante de *EhCP3* y análisis zimográfico

Los cuerpos de inclusión se extrajeron de manera eficiente mediante disrupción bacteriana en solución de lisis conteniendo 1% de Tritón X-100 (como agente tensoactivo) y se solubilizaron satisfactoriamente en solución desnaturalizante con 8 M de urea (como agente caotrópico). Enseguida, considerando que la proteína *EhCP3* recombinante contiene un hexámero de histidinas (6xHis) en su extremo N-terminal (y por ende exhibe afinidad por metales divalentes), la fracción de cuerpos de inclusión solubilizados se pasó extensivamente a través de una columna de agarosa cargada de níquel. Una vez unida a la resina, mediante un complejo de coordinación formado entre el níquel y los anillos de imidazol de la etiqueta 6xHis, la proteína se replegó y reoxidó en columna mediante dilución-remoción del agente caotrópico en presencia de 1 mM de glutatión oxidado (como agente oxidante). Después de un lavado en condiciones meramente oxidantes, la *EhCP3* recombinante se obtuvo mediante elución con 250 mM de imidazol (como agente competidor).

Como se aprecia en el panel A de la Figura 4-2, se purificó la proteína *EhCP3* recombinante con un rendimiento aparente >95%. De manera general, el procedimiento implementado se consideró exitoso, ya que *EhCP3* se solubilizó en condiciones desnaturalizantes, a partir de cuerpos de inclusión, se replegó y oxidó en columna, y se recuperó pura, soluble y activa (como se muestra en el panel B de la Figura 4-2).

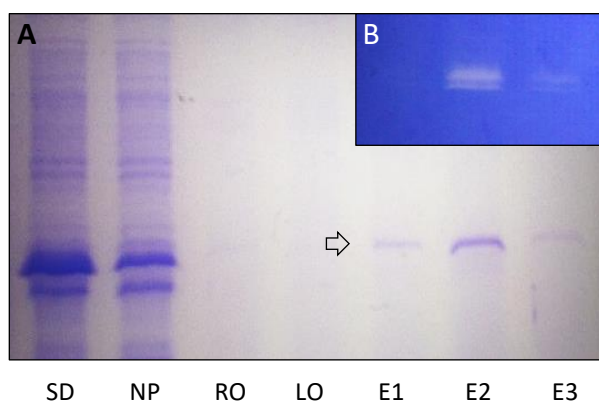


Figura 4-2. Purificación de *EhCP3* mediante cromatografía de afinidad a níquel acoplada a replegamiento oxidativo en columna (A) y análisis zimográfico (B).

(A) SDS-PAGE al 13.5% teñido con azul de *Coomassie*. Separación de fracciones: SD, soluble en agente desnaturalizante (8 M de urea); NP, no pegada; RO, replegamiento oxidativo; LO, lavado oxidativo; E1-E3, eluciones 1-3. La flecha indica la movilidad relativa de la *EhCP3* recombinante. (B) SDS-PAGE al 13.5% suplementado con 0.1% de gelatina y teñido con azul de *Coomassie*. Las fracciones analizadas corresponden al panel A.

El proceso anterior se realizó en varias ocasiones (5 pastillas de 200 mL de cultivo), obteniéndose 4.9 mL de solución de proteína a una concentración de 0.28 mg/mL; esto es, un rendimiento de proteína *EhCP3* recombinante pura de 1.37 mg por litro de cultivo. De manera adicional, se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular, obteniéndose 7 mL de una solución de proteína a una concentración de 0.11 mg/mL; es decir, un rendimiento de recuperación de 57.4% (0.786 mg de *EhCP3* recombinante pura), con respecto al rendimiento obtenido por cromatografía de afinidad a metales.

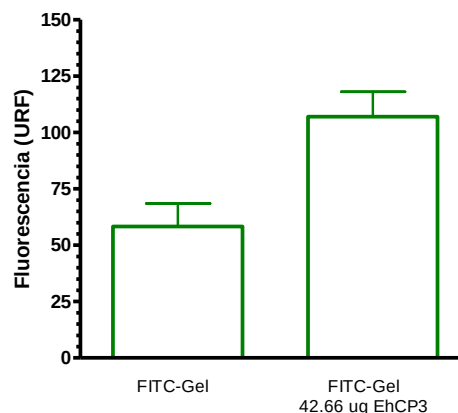


Figura 4-3. Análisis cuantitativo de la actividad proteolítica de la *EhCP3* recombinante pura.

Media $\pm$ error estándar de 2 ensayos independientes.

4.4. *EhCP3* recombinante exhibe actividad proteolítica

El ensayo de actividad proteolítica se realizó utilizando a FITC-gelatina (8 μ g/mL) como sustrato fluorogénico. La proteólisis se llevó a cabo durante 2 h en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Como se observa en la Figura 4-3, la proteína *EhCP3* recombinante (pura) hidroliza al sustrato, mostrando una diferencia significativa con respecto al fondo ($p < 0.05$), lo que comprueba la actividad proteolítica eficiente de la proteasa obtenida.

5. CONCLUSIONES

EhCP3 recombinante se induce de manera eficiente en el citosol de la bacteria *E. coli* SHuffle Express portadora de los plásmidos QEhCP3-2 y pREP4 (que expresa constitutivamente al represor LacI, como mecanismo de control de la expresión la proteína de interés). *EhCP3* recombinante se produce de manera insoluble, formando agregados citoplásmicos (cuerpos de inclusión), y se solubiliza adecuadamente en condiciones desnaturalizantes (8 M de urea). *EhCP3* recombinante pura, soluble y activa, se obtiene de manera satisfactoria mediante un procedimiento de cromatografía de afinidad a níquel acoplada a replegamiento oxidativo en columna, seguido de una cromatografía de exclusión molecular. *EhCP3* recombinante pura exhibe una eficiente actividad proteolítica sobre gelatina.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell*. 2003; 2(3): 501-9.
- Clark CG, Alsmark UC, Tazreiter M, *et al.*, Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv Parasitol*. 2007; 65: 51-190.
- Fleming R, Cooper CJ, Ramirez-Vega R, Huerta-Alardin A, Boman D, Zuckerman MJ. Clinical manifestations and endoscopic findings of amebic colitis in a United States-Mexico border city: a case series. *BMC Res Notes*. 2015; 8: 781.
- Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, *et al.* Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol*. 2001; 48(1): 1-20.
- Lara AR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2011; 10(2): 209-23.
- Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, *et al.* SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact*. 2012; 11:56.
- Que X, Brinen LS, Perkins P, *et al.* Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; 119(1): 23-32.
- Ralston KS, Petri WA Jr. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol*. 2011; 27(6): 254-63.
- Rojas L, Morán P, Valadez A, Gómez A, *et al.*, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in Mexican school children: genotyping and phylogenetic relationship. *BMC Infect Dis*. 2016; 16: 485.
- Rosenthal PJ. Proteases of protozoan parasites. *Adv Parasitol*. 1999; 43: 105-59.
- Sánchez V, Serrano-Luna J, Ramírez-Moreno E, Tsutsumi V, Shibayama M. *Entamoeba histolytica*: overexpression of the Gal/GalNAc lectin, *ehcp2* and *ehcp5* genes in an *in vivo* model of amebiasis. *Parasitol Int*. 2016;65(6 Pt A):665-7.
- Serrano-Luna J, Piña-Vázquez C, Reyes-López M, Ortiz-Estrada G, de la Garza M. Proteases from *Entamoeba spp.* and pathogenic free-living amoebae as virulence factors. *J Trop Med*. 2013; 2013: 890603.
- Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio JC. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio*. 2009; 13(2): 100-10.
- Verma S, Dixit R, Pandey KC. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 107.
- Winkelmann J, Leippe M, Bruhn H. A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Mol Biochem Parasitol*. 2006; 147(1): 85-94.