

Obtención y purificación de la cisteína sintasa de *L. infantum*

Juan Escarpa Merodio¹, Héctor de Lucio Ortega²; Antonio Jiménez Ruiz²

¹ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

² Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad tropical producida por parásitos del género *Leishmania* y que se manifiesta de diferentes formas algunas como el kala-azar con una gran mortalidad si no se administra tratamiento. El parásito, una vez ha infectado al huésped tras la picadura del insecto vector del género *Phlebotomus* o *Lutzomia*, es fagocitado por los monocitos y macrófagos dentro de los cuales produce la infección. Una línea de investigación para el desarrollo de medicamentos contra la infección parasítica consiste en buscar inhibidores de los mecanismos que permiten al protozoo mantenerse dentro de los macrófagos y que le hacen sobrevivir a las condiciones extremas de pH y estrés oxidativo que aparecen en los fagolisosomas. Uno de los mecanismos empleados por los parásitos para hacer frente al estrés oxidativo consiste en un metabolismo de tioles muy desarrollado que permite contrarrestar la oxidación. Debido a esto, resulta muy interesante estudiar las rutas de síntesis de cisteína, componente fundamental del glutatión y tripanotión, moléculas esenciales para el mantenimiento del correcto estado redox del parásito. Una de las rutas más interesantes es la que involucra a la cisteína sintasa ya que es una ruta que no aparece en humanos, lo que la pondría en una posición envidiable como diana terapéutica para el tratamiento de la infección. Se ha visto además que la sobreexpresión de esta enzima causa un aumento de la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo. Por ello se busca obtener un protocolo para la obtención de esta enzima en una forma activa, lo que permitiría proseguir con ensayos de inhibición para probar compuestos que podrían resultar útiles para combatir la enfermedad.

Palabras clave: Leishmaniosis; Cisteína sintasa; *Leishmania infantum*; cisteína; *Leishmania*.

Recibido: 26 de mayo de 2022 A incluir en la edición del artículo

Copyright: © 2022 Nombre Apellidos autor o autora et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad tropical producida por protozoos del género *Leishmania* que necesitan de un vector, generalmente del género *Phlebotomus* o *Lutzomia*, para realizar la infección. En Europa el principal causante de la leishmaniosis es *Leishmania infantum*, que es endémica de la cuenca mediterránea [1].

La leishmaniosis es una enfermedad compleja que puede presentarse con diversos síntomas generando cuadros diversos y que varían en gravedad, como puede ser la leishmaniosis cutánea que genera úlceras en la piel que derivan en cicatrices y que es la más común de las formas. La leishmaniosis visceral o kala-azar se desarrolla como episodios de fiebre irregular, anemia y hepatoesplenomegalia y sin tratamiento tiene una mortalidad del 95%; la leishmaniosis mucocutánea causa la destrucción de las mucosas infectadas [2]. Cada año se estima que se producen entre 0.4 y 0.6 millones de casos de leishmaniosis visceral y entre 0.7 y 1.2 millones de casos de leishmaniosis cutánea [3]. El parásito presenta un ciclo de vida en dos fases una en el vector, como promastigotes, y otra infectiva dentro de los macrófagos del hospedador, denominada amastigote [4].

Debido a que parte de su ciclo de vida se desarrolla dentro de los macrófagos del huésped, el parásito necesita resistir las condiciones fisiológicas de estos, particularmente importante resulta el mantenimiento

del equilibrio redox. Para ello estos protozoos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa que se basan en obtener fuentes de poder reductor que se puedan utilizar para reducir los daños que pueda inducir el estrés oxidativo al que se ven sometidos dentro de los fagolisosomas. Estos mecanismos por tanto pueden ser grandes candidatos para la elaboración de terapias. La adaptación principal a este ambiente viene dada por un metabolismo de tioles muy desarrollado en el que destaca una forma alternativa al glutatión denominada tripanotión que consiste en dos moléculas de glutatión unidas por una molécula de espermidina [5]. Para el desarrollo de este metabolismo de tioles los protozoos requieren de una gran cantidad de cisteína ya que es un componente fundamental en estos mecanismos de resistencia al estrés oxidativo. Por ese motivo el metabolismo de biosíntesis de cisteína está muy desarrollado con la aparición de dos vías de síntesis [6].

La cisteína sintasa es una enzima implicada en la producción de cisteína y forma parte de una vía alternativa junto con la enzima serina O-acetiltransferasa (SOAT), en la que se produce la síntesis de cisteína a partir de serina que, a su vez, se acetila por acción de una transferasa y a la que la cisteína sintasa añade un grupo sulfuro [6]. La cisteína sintasa es una enzima de 34.5 kDa que se organiza en homodímeros para realizar su actividad y que suele asociarse a la SOAT formando grandes complejos funcionales [7]. Además, para poder realizar su actividad, la cisteína sintasa requiere de la presencia de un cofactor, el piridoxal, que es clave en la reacción de adición del grupo sulfuro a la O-acetil serina [8]. Estavía es muy relevante ya que es una de las formas que tiene el parásito para generar la cisteína que utiliza en la formación de glutatión y tripanotión. También se ha visto la importancia fisiológica de esta vía ya que en condiciones de aumento de su actividad se ha visto un incremento de la supervivencia de los parásitos en condiciones de estrés oxidativo [9].

El objetivo de este trabajo es conseguir expresar y purificar la cisteína sintasa de *L. infantum* y verificar su actividad con un ensayo de actividad, de manera que se puedan obtener grandes cantidades de enzima funcional. Se realizará mediante clonación de su secuencia codificante en plásmidos de expresión en *E.coli*. Para el aislado se utilizará la cromatografía en fase líquida para purificar solamente la cisteína sintasa. Se plantea que esta enzima podría ser una gran candidata para futuras investigaciones y desarrollo de fármacos.

Materiales y métodos.

Clonaje.

Para realizar el clonaje del gen de la cisteína sintasa es necesario empezar obteniendo copias del gen, que se obtienen por PCR usando cebadores diseñados especialmente y usando DNA genómico de *Leishmania infantum*. Para verificar que la PCR ha sido exitosa se analiza con un gel de agarosa 1% con 0.5 µL/mL de bromuro de etidio para su posterior revelado.

Una vez se verifica que la PCR ha sido exitosa, se procede a la extracción del DNA del gel usando un kit de extracción de ADN de banda (QUIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen) diseñado para esta función. Debido a que el resultado de PCR tiene los extremos romos se debe usar un plásmido que tenga los extremos romos también, en este caso PJet (Thermo Fisher Scientific).

Para la ligación se añaden 3 µL de agua destilada estéril, junto a 5 µL de DNA extraído, 1 µL del vector, 10 µL de buffer de ligación 2x y 1 µL de ligasa (Kit de ligación de Thermo Scientific). Posteriormente se incuban cinco minutos a 22°C. Después el producto de esta reacción se usará para transformar bacterias, según el protocolo que se describe más adelante.

Transformación de las bacterias.

Para transformar las bacterias con los plásmidos obtenidos previamente se realiza un proceso por choque térmico. Se comienza mediante la descongelación de las bacterias competentes en hielo durante cinco minutos. Dependiendo de en qué fase de la experimentación nos encontremos se utilizan distintas cepas de *E.coli*: para generar copias de los plásmidos se utilizan bacterias Top10 o DH5-alpha; mientras que para la inducción de proteínas se utiliza la cepa Rosetta II.

El proceso, que ha de realizarse en esterilidad, consiste en añadir en un tubo eppendorf 5 µL de plásmido, si proviene de ligación, o 1 µL si ya viene de un plásmido previamente purificado. Sobre esto se añaden 50 µL de las bacterias previamente descongeladas, y se deja incubar durante media hora en hielo. Tras ese paso se procede al choque térmico mediante la incubación durante un minuto y medio en el termobloque a 42°C seguido de dos minutos en hielo.

Se añaden 850 µL de medio LB y se deja que las bacterias se recuperen durante una hora a 37°C, solo las bacterias Top10 necesitan incubarse en agitación durante este proceso.

Posteriormente, se puede comenzar con la siembra de las bacterias transformadas, 100 µL en una placa de LB más ampicilina (en caso de tener un plásmido con otros genes de resistencia se usan placas con otros antibióticos como kanamicina o cloranfenicol) y se siembra con asa. Si se prevé un bajo rendimiento de la

transformación, por ejemplo, si se parte de ligaciones, se puede centrifugar durante cinco minutos a 2000 G y retirar 550 µL de sobrenadante, resuspender y sembrar 100 µL, de esta manera se obtiene una mayor densidad de colonias. Se deja durante toda la noche para que crezcan las bacterias.

Picado de colonias.

En esterilidad se preparan tubos falcon de 50 mL con 7 mL de medio LB con antibiótico, en función de la resistencia de los plásmidos utilizados; ampicilina a 100 µg/mL kanamicina a 50µg/mL, 34µg/mL. Se pican colonias de bacterias usando puntas amarillas estériles, y cogiendo solo una se depositan en el tubo con el medio, se da un ligero vórtex y se incuban en agitación a 37°C durante toda la noche.

Boiling.

La *boiling* es un método sencillo de aislar ADN plasmídico, de manera que se pueda analizar. Para realizarla se comienza con 1400 µL del cultivo, obtenido mediante la incubación del picado de colonias, y se centrifuga durante cinco minutos a 2000G, seguidamente se descarta todo el sobrenadante y se añaden 110 µL de STET. Los siguientes pasos han de ser simultáneos para que el protocolo sea exitoso, seañaden 10 µL de lisozima a 5mg/mL y se resuspende con cuidado, se incuba durante noventa segundos enagua hirviendo, y finalmente se centrifuga cinco minutos a 16000G.

Tras estos pasos se obtiene un precipitado viscoso que consiste en las membranas y paredes bacterianas junto con el ADN cromosómico. Este precipitado se retira con la ayuda de un palillo. Se añaden 5 µL de RNAsa 10mg/mL, se resuspende para mezclar bien, y se incuba quince minutos a 37°C, para dejar de esta manera solo el ADN plasmídico.

Para precipitar el ADN plasmídico y eliminar impurezas, se añaden 110 µL de isopropanol y se mezcla por inversión suavemente, acto seguido se centrifuga diez minutos a 1600G, se descarta el sobrenadante y se añaden 100 µL de etanol. Sin resuspender se centrifuga cinco minutos a 1600G se elimina el sobrenadante y se deja que se evapore todo el líquido restante antes de añadir 40 µL de agua destilada para disolver el ADN.

Comprobación de las transformaciones.

Para comprobar que los procesos de transformación han sido exitosos se realiza una digestión de los plásmidos que se han aislado de las *boilings*. Para ello se añaden 10 µL del ADN obtenido anteriormente junto a 6 µL de agua destilada, 2 µL de buffer 10X fastdigest, y 1 µL de cada enzima de restricción, en este caso se usan HindIII y BamHI. Se incuba cincuenta minutos a 37°C en el termobloque y se realiza una electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio. Se eligen algunas de las muestras que den resultado para aislar los plásmidos con una miniprep (se usa el kit de Nzytech). Las muestras obtenidas de la miniprep se comprueban llevándolas al servicio de secuenciación. Este paso solo se realiza en el clonaje inicial, no en los sucesivos subclonajes.

Subclonaje

El subclonaje se realiza para obtener una construcción con un plásmido que contenga la secuencia para la unión de la polimerasa T7, de esta manera se podrá inducir la producción de la proteína en las bacterias productoras Rosetta2. Además, nos permite colocar el inserto dentro de la construcción, cosa que con el anterior plásmido de extremos romos no se podía realizar. Para ello se utilizan dos plásmidos que se trataran igual, pRset y pET28a.

Para realizar el subclonaje es necesario obtener cantidades necesarias del inserto, el gen de interés, a partir de las minipreps obtenidas y verificadas por secuenciación. La cantidad de inserto se calcula

mediante la siguiente formula: $\text{ng inserto} = \frac{100 \text{ ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{Kb vector}}$. El inserto se obtendrá mediante extracción de la banda de un gel de agarosa por lo que se ha de considerar una pérdida de 2/3 del total, y además se ha de tener en cuenta que partimos de una construcción que incluye el inserto en una relación de 1kb por cada 4kb del total del plásmido. Del mismo modo se determina la cantidad de plásmido que se va a digerir.

Se procede a la digestión y a la separación del inserto y plásmidos mediante un kit de extracción de ADN de banda (QUIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen) del mismo modo que se realizó en el clonaje. Se miden al finalizar los rendimientos en el nanodrop para calcular los volúmenes de la ligación. La ligación sigue el mismo principio que en el anterior caso, pero al no ser volúmenes determinados en este caso solo se debe respetar que el volumen sea el menor posible para mejorar la reacción, que el buffer 10x de digestión se encuentre a 1x en el volumen de reacción y que la enzima se encuentre en proporción 1/10 para evitar la interferencia del glicerol. Se preparan las reacciones y se dejan una hora a 22°C.

Con lo obtenido de las ligaciones anteriores se procede a la transformación según el protocolo anterior y a la verificación de las transformaciones.

Obtención de las bacterias que expresan la proteína

Para ello se utilizan los plásmidos aislados del proceso de subclonaje y se transforman bacterias Rosetta II que tienen un mecanismo que permite que se induzca la expresión de proteínas. Todo el proceso es igual al descrito anteriormente, salvo en que las placas son LB con kanamicina y cloranfenicol.

Prueba de inducción

Se realiza una prueba de inducción en la que se pretende determinar las condiciones óptimas para realizar una inducción a gran escala.

El volumen de inducción son 500 mL de LB al que se añaden 5 mL de preinóculo. Se deja crecer en agitación a 37°C hasta que alcance una densidad óptica de entre 0'4 y 0'6, lo que aproximadamente requiere de unas dos horas.

Una vez se encuentre en el rango deseado de densidad óptica se toman muestras, 1mL en un tubo eppendorf por cada una de las condiciones de inducción que se evalúan, y que servirán de controles negativos. Los tiempos son cuatro horas y overnight, y las temperaturas 16°C, 26°C y 37°C. Tras la toma de muestras se añaden 500 µL de IPTG (se busca concentración final de 1mM). El medio con el cultivo inducido con IPTG se separa en distintos matraces, para cada una de las condiciones, dejando volúmenes similares. Se procede a incubar durante el tiempo determinado tanto el matraz como el tubo eppendorf sininducir a la temperatura establecida. Pasado el tiempo se toma otra muestra de 1mL y 50mL en un tubo falcon.

Se centrifugan tanto los tubos falcon como los eppendorf a máximas revoluciones y a 4°C durante 5 minutos. Acto seguido se retira el sobrenadante.

Las muestras de los tubos falcon se preparan en hielo, para lo que es necesario un buffer de lisis A que contenga 50mM fosfato sódico, 300 mM de cloruro sódico y 25 mM piridoxal a pH 7'9. De ese buffer de lisis se añaden 30 mL junto a 15 mg de lisozima (concentración final 0'5 mg/mL) y PIC (cocktail de inhibidores de proteinasas; Merck) (1:1000). De esa mezcla se añaden 4'5 mL por tubo falcon y se resuspende con pipeta pasteur, el lisado resultante se pasa a tubos eppendorf de 5mL que se dejan incubar media hora en hielo. Tras la incubación y en el hielo se sonicán las muestras en tandas de 20 segundos de sonicación y 20 segundos de descanso hasta alcanzar un minuto de sonicación total. Después se centrifugan durante media hora a máxima velocidad a 4°C. Se recogen 150 µL del sobrenadante a los que se añaden 50 µL de buffer de carga 4x. Se retira el resto del sobrenadante y se resuspende el pellet en 4'5 mL de urea 8M. Tras una hora de reposo se recoge la misma cantidad y se procede como con el sobrenadante. De esta manera, se obtienen las muestras que se utilizarán para analizar la solubilidad de la proteína obtenida. Para ese análisis se usa un gel de poliacrilamida (4% concentrador y 10% separador)

Para preparar las muestras de los tubos eppendorf se resuspenden las bacterias en 225 µL de agua destilada a la que se añade 75 µL de buffer de carga 4x inmediatamente. Para terminar de preparar la muestra se hierven durante diez minutos y ya se pueden cargar en los geles de poliacrilamida.

Inducción.

Tras la prueba se realiza una inducción a gran escala, que sigue un procedimiento parecido a la anterior, pero con cambios significativos.

El volumen a inducir pasa a ser 5 L de LB a los que se añaden 45 mL de preinóculo y 5mL de Kanamicina (50 mg/mL). Se separa en 4 matraces de 2 L y se incuba hasta que la densidad óptica sea de entre 0'4 y 0'6. Al igual que en el caso anterior se toman muestras de 1 mL antes de proceder a la inducción, que en este caso se realiza con 1 mL de IPTG por matraz. Se deja incubando toda la noche a 16°C (tanto los matraces como las muestras preinducción).

Pasado el tiempo de incubación, se procede a la toma de muestras de 1 mL a las que se realiza el mismo protocolo que en la prueba de inducción. El resto se deja en hielo mientras se procede a la centrifugación, a 4°C, máxima velocidad, cinco minutos; de todo el cultivo restante. Tras cada centrifugación se descarta el sobrenadante y se rellenan los tubos falcon con cultivo del mismo matraz, en el tiempo en que no se esté centrifugando es muy importante mantener en hielo. Tras esto y debido a que la lisis se va a utilizar para la purificación de la proteína, el buffer que se usará ha de ser filtrado. El buffer es una mezcla en proporción 95% a 5%, del buffer de lisis A del protocolo anterior, con buffer de lisis B, consistente en 50mM fosfato sódico, 300 mM de cloruro sódico, 500 mM de imidazol y 25 mM piridoxal a pH 8. De igual manera se añade lisozima (0.5 mg/mL) y PIC (cocktail de inhibidores de proteinasas; Merck) (1:1000) a las mismas concentraciones, pero se suplementa de manera adicional con 30 µL de DNAsa (de Thermo Scientific).

Se resuspenden los pellets obtenidos en 20 mL de la mezcla de buffers, se sigue manteniendo en hielo, se da vórtex para asegurar el mezclado y se juntan los volúmenes en un vaso de precipitado. Se sónica la muestra, tras media hora de reposo en hielo, durante media hora, removiendo cada diez minutos para

asegurar un sonicado homogéneo. Tras esto se centrifuga en tubos falcon de 50 mL durante una hora a 4°C a máxima velocidad. Se vuelca el sobrenadante en el vaso y se sónica durante otros diez minutos. Se filtra con jeringa y filtro PVDF a una botella estéril. Se toman 30 µL de muestra que se mezclan con 10 µL de tampón de carga 4x.

Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad.

Se prepara la columna (HisTrap) pasándole 25mL de agua destilada seguidos de 25 mL de buffer de lisis A+B (el mismo que el anterior). Después se dejará recircular el extracto obtenido toda la noche a 4°C.

Para la separación de la proteína se procede con una elución isocrática, utilizando mezclas de los buffers A y B para separar la proteína. Las concentraciones elegidas son de 10% de buffer B, 40% de buffer B y 100% de buffer B.

La muestra obtenida a 40% de B será la seleccionada para seguir con la purificación, para lo que se procede a la retirada de las sales y el imidazol. Para ello se usa un buffer de desalting, que contiene 50mM de Tris y 25 mM de piridoxal a pH 7'9, y una columna de desalting (GSTrap). La muestra se inyecta en pequeños volúmenes y antes de poder realizar otra carga se ha de verificar que la columna se haya vaciado de las sales y otros compuestos provenientes de la muestra anterior.

Digestión de la proteína y purificación.

De las muestras obtenidas anteriormente se procede a realizar una digestión para eliminar la cola de histidinas. Para ello se utiliza la enzima PreScission, que se añadirá a parte de nuestra proteína. La proporción necesaria es un 1mg de PreScission por cada 30 mg de proteína. Se incuba a 4°C.

Se recircula la proteína por la columna HisTrap. Después se recoge el recirculado (fracción no unida a la columna) y se pasa por la columna de desalting utilizando el buffer de desalting anterior (50mM de Tris y 25 mM de piridoxal a pH 7'9). Tras este proceso se obtiene la proteína purificada y digerida.

Pero esta proteína se ha disuelto mucho durante este proceso por lo que se emplea un Amicon para su concentración. Para ello primero se prepara el Amicon con NaOH y luego se equilibra con el buffer de desalting usado anteriormente. Se procede a realizar centrifugaciones seriadas, hasta que se obtenga la concentración deseada.

Ensayo de actividad

Para medir la actividad de la enzima se utilizan 3 concentraciones de cisteína sintasa (15 ng/µL, 7'5 ng/µL y 3'75 ng/µL). La reacción enzimática se realiza en un tampón que contiene 15 mM de O-Acetil Serina, 0'2 mM de piridoxal, 3 mM de sulfuro de sodio, 1 mM de EDTA, 1 mM de BSA y 200 mM de fosfato sódico.

La reacción se desarrolla en tubos eppendorf, uno por cada una de las concentraciones de enzima. Se disponen todos los compuestos en el eppendorf menos la cisteína sintasa, que será lo que disparará la reacción. Una vez añadido se incuba 37°C.

Según se cumplen los tiempos, se sacan 75 µL de la muestra y se pasan a tubos con 15 µL de TCA al 20%. Para revelar el ensayo se añaden 10 µL de una mezcla de DTT (100 mM) y NaOH (17 mM) y se incuba a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se añaden 100 µL de ácido acético a cada tubo y 100 µL del reactivo de ninhidrina (250 mg de ninhidrina, 4 mL de ácido clorhídrico y 6 mL de ácido acético) que tiene que ser elaborado justo antes de utilizarse.

Se incuba durante diez minutos a 90°C e inmediatamente se pasa a hielo durante dos minutos. En una placa p96 se disponen 105 µL de etanol al 95% y 90 µL de la muestra. Para leer los resultados se mide la absorbancia a 560 nm, longitud de onda a la que se detecta el compuesto formado por la ninhidrina y la cisteína

Resultados y discusión.

Clonaje

El resultado del primer clonaje, en el que se insertan los productos de PCR en PJet, resultó exitoso como se puede observar en la Figura 1. Se puede observar que todos los insertos se encuentran en el rango adecuado, de alrededor de los 1000 pares de bases (el gen tiene 1002 pb) salvo el que se observa en el segundo carril, lo que se debe a algún problema durante el proceso de ligación o transformación por lo que esa colonia se descarta y no se prosigue con ella. Se observa además que todos los vectores tienen el mismo tamaño en todas las muestras. Se seleccionaron dos colonias (la primera y la tercera) para proseguir con la extracción de plásmidos con la miniprep y al medir se obtienen 317 ng/ µL en la extracción realizada a partir de la colonia 1 y en la tercera 257 ng/ µL en la extracción realizada a partir

de la colonia 3. Posteriormente se secuenciaron las muestras para verificar que el inserto se había clonado bien y no se presentaban problemas en la secuencia de ADN. Los resultados indicaban que la muestra 3 presentaba una anomalía mientras que la muestra 1 presentaba una secuencia que se corresponde al constructo que se deseaba clonar. Todo el resto de la experimentación se desarrollará utilizando el inserto de la muestra 1.

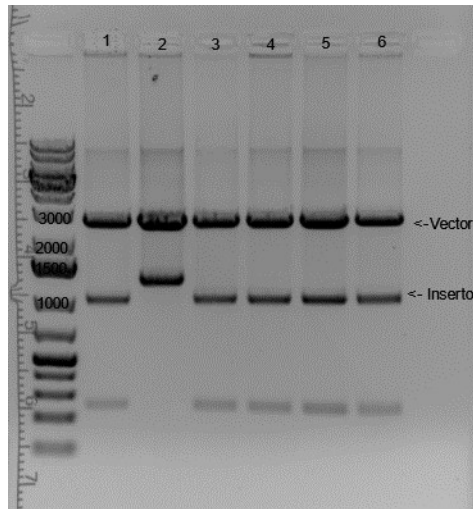


Figura 1.- Digestiones de los plásmidos obtenidos por el método *Boiling* en un gel de agarosa con bromuro de etidio. El primer pocillo contiene marcador y cada pocillo representa una colonia diferente a las que se hace referencia de izquierda a derecha con un número empezando con el 1.

Subclonaje.

Tras el proceso de extracción del inserto y de la ligación con los dos plásmidos diferentes, pRSET (3Kb) y pET28a (5Kb), este paso se realiza para generar un plásmido que en Rosetta2 permita inducir la síntesis de la proteína. Se procede al análisis del ADN plasmídico obtenido mediante la transformación y cultivo de las bacterias. El análisis de la digestión con BamHI y HindIII de los plásmidos obtenidos por *Boiling* nos determina tres candidatos que muestran el inserto con un tamaño correcto. En un análisis posterior (Figura 2) de las muestras obtenidas por miniprep vemos como el inserto se corresponde en tamaño al inserto utilizado y no se ve ningún indicativo de errores o problemas en la ligación. Cabe destacar que, como se observa en la imagen, los plásmidos utilizados son diferentes y la banda correspondiente por tanto aparece más arriba en el caso de pET28a debido a su mayor tamaño.

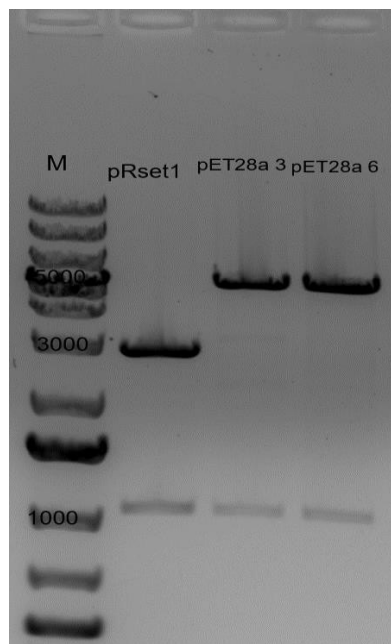


Figura 2.- Resultado de las digestiones de los plásmidos que se han obtenido del subclonaje, esta imagen no está obtenida de la digestión de ADN plasmídico obtenido mediante una *Boiling* sino al obtenido mediante miniprep.: Marcador, pReset 1, pET28a 3 y pET28a 6.

El rendimiento de este proceso es de 60'5 ng/ μ L en pReset 1, de 69'2 ng/ μ L en pET28a3 y de 52 ng/ μ L en pET28a6. Las diferentes concentraciones se obtuvieron eluyendo en 50 μ L.

Prueba de inducción.

Se realizan dos pruebas fundamentales, una prueba de solubilidad para determinar en qué fase se encuentra la proteína, y una prueba de inducción para determinar las condiciones en que se obtiene una mayor cantidad de proteína.

El análisis de la inducción (Figura 3) señala que la producción de proteína se ve favorecida cuando se ha incubado toda la noche (ON) en todas las temperaturas. También se observa un aumento en la producción a mayores temperaturas.

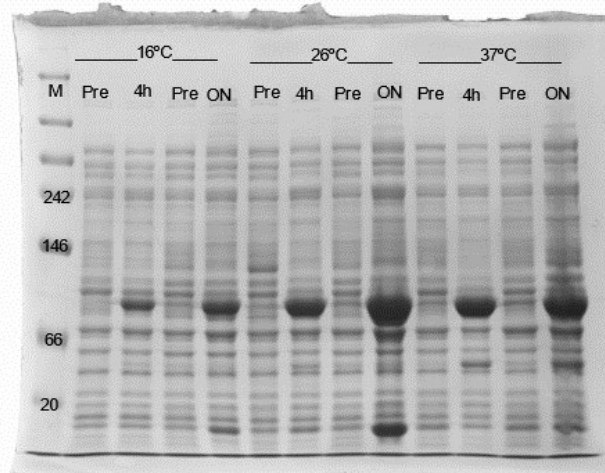


Figura 3.- Gel de poliacrilamida, revelado con azul de Coomassie, con la prueba de inducción. Se indican las diferentes temperaturas y los diferentes tiempos de incubación: 4h equivale a cuatro horas de incubación, ON a toda la noche y pre hace referencia a que no se ha inducido la muestra,.

Sin embargo, antes de llegar a la conclusión de cuáles son las condiciones idóneas de incubación para obtener la mayor cantidad de proteína, se han de estudiar los efectos de las condiciones en la solubilidad de la proteína, ya que si la proteína aparece en el precipitado nos puede plantear problemas en la purificación, así como en su funcionalidad, ya que puede estar desnaturalizada y formando parte de los cuerpos de inclusión. Para ello nos hemos de fijar en las figuras 4 y 5 que muestran análisis de la solubilidad de la proteína aislada en cada una de las condiciones.

Se observa como la condición con menos cantidad de proteína insoluble se corresponde a los 16°C y que la cantidad de proteína insoluble aumenta con la temperatura.

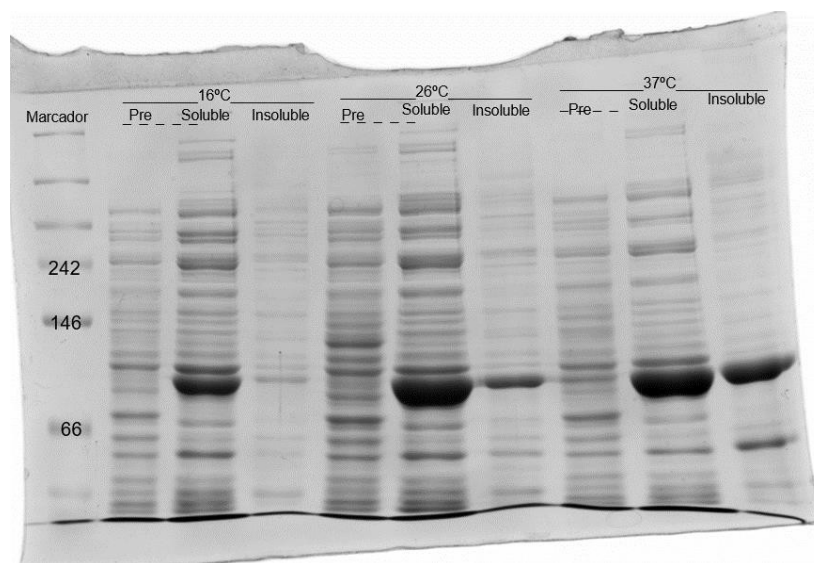


Figura 4.- Gel de agarosa que muestra la solubilidad a las diferentes temperaturas a las 4 horas de inducción. Aparecen en orden preinducción, soluble e insoluble.

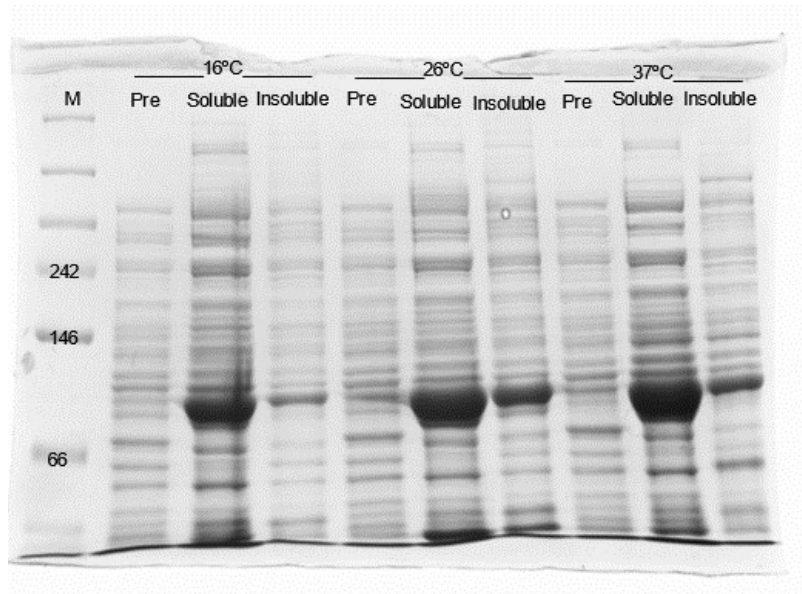


Figura 5.- Gel de agarosa que muestra la solubilidad a las diferentes temperaturas tras una inducción de toda la noche. Aparecen en orden preinducción, soluble e insoluble.

Analizando esos datos se llega a la conclusión de que la mejor opción para realizar la inducción a gran escala es a 16°C overnight.

Inducción y purificación de la proteína.

Tras la inducción en las condiciones seleccionadas, se obtienen grandes cantidades de proteína con una concentración tras el desalting de 7.5 mg/mL. Se observa además que el proceso es exitoso ya que como se puede observar en la figura 6, la mayor cantidad de proteína se encuentra en la elución a 40% de buffer B como se esperaba, ya que es en esta fase donde se espera la elución de la proteína sin las posibles contaminaciones. Sin embargo, se observa una anómala migración de la proteína debido a la enorme cantidad de proteína que impide que se forme una banda definida. En el resto de las condiciones esto no ocurre. También aquí se observa como la cantidad de proteína extraída de la fracción insoluble (rotulada como pellet) no es muy grande.

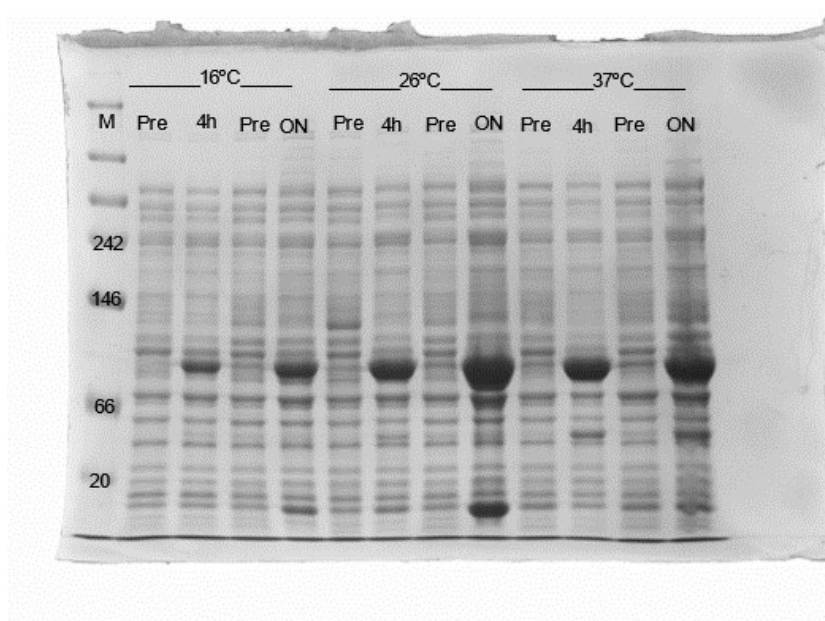


Figura 6.- Resultados de todo el proceso de purificación. Pellet hace referencia a la fase insoluble del lisado celular. FT se refiere al flowthrough tras pasarse por una HisTrap. Los porcentajes se refieren a la cantidad de buffer B. Predigest significa predigestión y digest digestión. SR hace referencia a que la muestra no se ha recirculado por la columna.

En cuanto a la digestión con PreScission, en la que se retira la cola de histidinas dejando solo la proteína, podemos ver cómo tanto en la figura 6, como en la 7 que durante el proceso de digestión y como consecuencia de la pérdida de la cola de histidinas se produce una disminución del tamaño de la proteína con respecto a la proteína sin digerir.

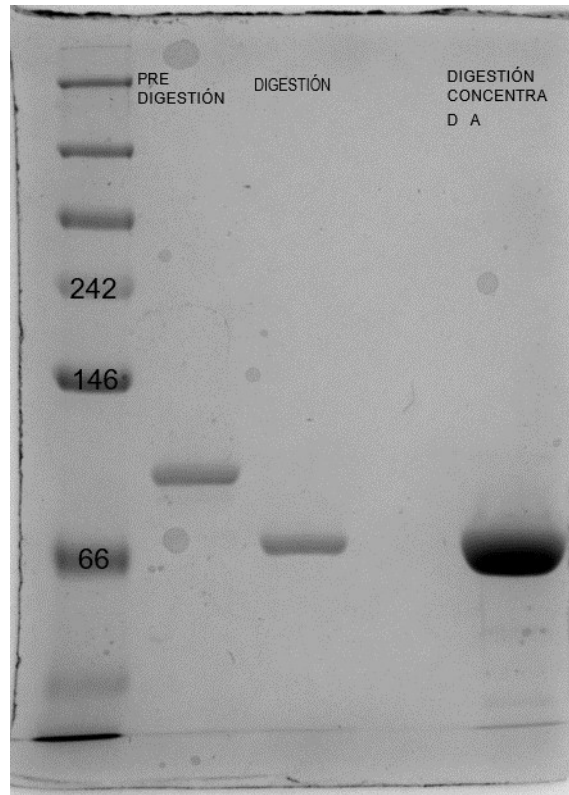


Figura 7.- Análisis más detallado del proceso de digestión y concentración de la proteína digerida.

Ensayo de actividad.

El ensayo de actividad consiste en la detección de la cisteína que se genera durante la actividad de la enzima, y que se revela con la ninhidrina.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de actividad permiten confirmar la purificación de una enzima funcional. Cabe destacar que, como se ve en la figura 8, en el caso de 15 ng de enzima el sustrato se consume muy rápido y que se alcanza muy rápidamente una zona de plateau, con una subida muy rápida en el primer tiempo, mientras que en las otras dos concentraciones de enzima la reacción discurre a menor velocidad.

Además, estos resultados permiten validar el método utilizado, que aun así podría tratar de mejorarse mediante una reducción de volúmenes que pudiera permitir realizar las reacciones más fácilmente, al poder utilizarse p96 para realizar las reacciones.

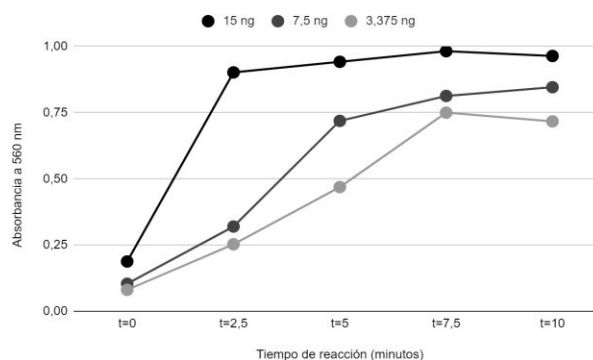


Figura 8.- Ensayo de actividad, en el eje de abscisas se representan los diferentes tiempos de reacción (en minutos), en el de ordenadas se encuentra representada la absorbancia a 560 nm.

Conclusiones

Durante este trabajo se ha conseguido obtener grandes cantidades de cisteína sintasa funcional. De este modo, se podrían plantear trabajos mucho más exhaustivos en los que se pueda utilizar esta enzima, como puede ser la búsqueda de inhibidores. Esos inhibidores podrían tener un potencial como tratamiento.

Bibliografía

1. Humanes-Navarro, A. M.; Z. Herrador; L. Redondo; I. Cruz and B. Fernández-Martínez. 2021. Estimating human leishmaniasis burden in Spain using the capture-recapture method, 2016-2017. on PloS one, 16(10): e0259225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259225>
2. Leishmaniasis. 2022(22 may). In WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
3. Alvar, J.; I. D. Vélez; C. Bern; M. Herrero; P. Desjeux; J. Cano; J. Jannin; M. den Boer and WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one 7(5): e35671.
4. Leishmaniasis. 2022 (22 may). In CDC. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
5. Krauth-Siegel, R. L. and M. A. Comini. 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. on Biochimica et Biophysica Acta, 1780(2008): 1236-48.
6. Williams, R. A. M., G.D Westrop. and G. H. Coombs. 2009. Twopathways for cysteine biosynthesis *Leishmania major*. On Biochemical journal 420:451-62.
7. Singh, K.; K. P. Singh; A. Equbal; S. S, Suman; A. Zaidi; G. Garg; K. Pandey; P. Das and V. Ali. 2016. Interaction between cysteine synthase and serine O-acetyltransferase proteins and their stage specific expression in *Leishmania donovani*. On Biochimie 131(2016):29-44.
8. Fyfe, P. K.; G. D. Westrop; T. Ramos; S. Müller; G. H. Coombs and W.N. Hunter. 2012. Structure of *Leishmania major* cysteine synthase. On Structural Biology and Crystallization Communications 68(pt 7): 738-43.
9. Romero, I.; J. Téllez; A. J. Romanha; M. Steindel and E. C. Grisard. 2015. Upregulation of cysteine synthase and cystathionine β -synthase contributes to *Leishmania braziliensis* survival under oxidative stress. On Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59:4770-81.