

Puesta a punto y utilización de *Leishmania tarentolae* como sistema de expresión de proteínas para su posterior purificación y cristalización. Aplicación a la proteína LiEndoG.

Fernando Fernández García^{1, a}, Cristina Oliva Correia¹, Antonio Jiménez Ruiz¹

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.

a. fernandofdezgar@gmail.com

Palabras clave: *Leishmania tarentolae*; Endonucleasa G; LiEndoG; purificación de proteínas

Resumen

La leishmaniosis es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad desatendida al afectar principalmente a personas en situación de pobreza y con unas condiciones higiénico-sanitarias deficientes, ocasionando entre 20000 y 30000 muertes anuales. Los tratamientos disponibles son escasos y pueden presentar graves efectos adversos, a lo que se suma la aparición de resistencias y la ausencia de vacunas eficaces. Es por ello que el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y compuestos activos es esencial en la lucha contra la enfermedad. Nuestro laboratorio ha identificado que la endonucleasa G de *Leishmania infantum* (LiEndoG) es vital para el parásito, participando en el proceso de muerte celular programada y jugando un papel dual provida/promuerte. La cristalización de LiEndoG sería muy conveniente para conocer su estructura en detalle y diseñar inhibidores proteicos útiles en terapéutica. Anteriormente se intentó purificar LiEndoG utilizando *Escherichia coli* como sistema de expresión proteica. Sin embargo, para su obtención se requirieron condiciones desnaturalizantes y una posterior renaturalización, lo que podría ocasionar plegamientos incorrectos y pérdida de actividad enzimática. Es por esto que en este trabajo nos propusimos emplear *Leishmania tarentolae* como sistema inducible de expresión proteica eucariota por presentar características únicas como introducción de modificaciones postraduccionales o procesamiento de péptidos señal. Con este fin, se diseñaron dos construcciones capaces de integrarse en el genoma de *L. tarentolae* que, por la adición de tetraciclina al medio, dieran lugar a la expresión de una LiEndoG citoplasmática o secretada, respectivamente. Nuestros resultados demuestran que la utilización de *L. tarentolae* como sistema de expresión proteica nos permite obtener y purificar una LiEndoG recombinante en condiciones nativas que mantiene su actividad enzimática, mostrando que este método de purificación es mucho más conveniente que el empleado anteriormente en *E. coli*, si bien aún es necesario más trabajo para optimizar la purificación.

Cita: Fernández García, Fernando; Oliva Correia, Cristina; Jiménez Ruiz, Antonio (2016) Puesta a punto y utilización de *Leishmania tarentolae* como sistema de expresión de proteínas para su posterior purificación y cristalización. Aplicación a la proteína LiEndoG. *Dianas* 5 (2): e20160908. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20160908](http://www3.uah.es/dianas?e20160908) <http://www3.uah.es/dianas?e20160908>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Fernández-García F, Oliva-Correia C, Jiménez-Ruiz A. Algunos derechos reservados. 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 Organización Mundial de la Salud considera la leishmaniosis como una de las 17 enfermedades desatendidas al afectar principalmente a poblaciones en situación de pobreza y con unas condiciones higiénico-sanitarias deficientes [1]. Esta enfermedad se asocia especialmente con la pobreza, la malnutrición, las personas desplazadas de áreas en guerra o zonas de conflicto, la debilidad del sistema inmunitario y la escasez de recursos económicos [2].

La leishmaniosis es producida por más de 20 especies del género *Leishmania* y es transmitida a los humanos a través de la picadura de las hembras de flebotomos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, de los cuales se conocen más de 90 especies [2]. Además, otros mamíferos pueden ser infectados por *Leishmania* spp., frecuentemente perros y varias especies de roedores, lo que favorece la transmisión del parásito al actuar estos como reservorios (zoonosis). Sin embargo, en algunas zonas como en el Sudeste Asiático, la transmisión se mantiene entre el vector y los humanos (antroponosis) [3].

El género *Leishmania* presenta formas de amastigote (en mamíferos u hospedadores definitivos) y de promastigote (en flebotomos, hospedadores intermediarios o vectores). Los flebotomos ingieren amastigotes cuando succionan la sangre de un animal infectado. Los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos inicialmente y en promastigotes metacíclicos a los 8 días de la ingesta. Estos constituyen las formas infectantes para el humano y otros mamíferos y son inoculados cuando el vector se alimenta de nuevo. En el hospedador definitivo, las células del sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, fagocitan los promastigotes metacíclicos. Estos son capaces de sobrevivir en

el fagolisosoma, de transformarse en amastigotes y de multiplicarse hasta romper la célula. Cuando esto ocurre, los amastigotes son fagocitados por otros macrófagos, expandiéndose la infección [4].

La leishmaniosis se presenta de tres formas principales: cutánea, mucocutánea y visceral (kala-azar). La leishmaniosis cutánea se manifiesta en forma de úlcera en el lugar de la picadura y habitualmente se cura entre los 2 y los 12 meses tras su aparición. En la presentación mucocutánea también aparecen úlceras, pero éstas afectan además a las mucosas, siendo altamente desfigurantes. La leishmaniosis visceral cursa con fiebre, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, extenuación y muerte antes de 2 años sin tratamiento [4].

La leishmaniosis es endémica en 88 países, afectando a aproximadamente 12 millones de personas [4]. Se estima que cada año se producen 1,3 millones de casos nuevos, de los cuales 300000 son casos de leishmaniosis visceral y 1 millón son casos de leishmaniosis cutánea o mucocutánea [5]. Se calcula que la enfermedad ocasiona entre 20000 y 30000 muertes anuales [2]. En España, la leishmaniosis es una enfermedad parasitaria endémica causada por *Leishmania infantum* [6].

Los tratamientos disponibles para esta enfermedad son escasos (antimoniales pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, pentamidina y paromomicina), con muchos efectos adversos y frecuentemente tóxicos; lo que, sumado a la aparición de resistencias y a la falta de vacunas eficaces, hace esencial el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y compuestos activos. En este sentido, nuestro laboratorio ha realizado avances significativos al identificar una proteína vital para *Leishmania infantum*, su endonucleasa G (LiEndoG). Por otro lado, en colaboración con el laboratorio de modelado molecular, se han diseñado y ensayado moléculas capaces de interactuar e inhibir LiEndoG [7].

LiEndoG participa en el proceso de muerte celular programada (MCP) del parásito, jugando un papel dual provida/promuerte. Aunque fue un tema controvertido en el pasado, se ha demostrado que organismos unicelulares como *Leishmania* spp. sufren MCP en respuesta a estímulos como choque térmico, especies reactivas de oxígeno (ERO), antiparasitarios, prostaglandinas o péptidos antimicrobianos [8]. Además, se han documentado múltiples cambios bioquímicos que, en mamíferos, se relacionan con la apoptosis, como son: generación de ERO, aumento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, alteraciones del potencial de membrana mitocondrial, exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, liberación de citocromo c, activación de proteínas con actividad similar a caspasas y activación de endonucleasas como EndoG [8]. Se ha demostrado que la MCP en protozoos parásitos es importante en el control del tamaño de la población [8] y para facilitar la infección del hospedador definitivo [9].

LiEndoG es una proteína perteneciente a la superfamilia de las $\beta\beta\alpha$ -metalonucleasas de ADN/ARN no específicas. Presenta actividad endo/exo-nucleasa dependiente de cationes divalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} ; y es inhibida por concentraciones moderadas de cationes monovalentes como K^+ o Na^+ . La actividad endonucleasa genera cortes de cadena sencilla en ADN de doble cadena, mientras que la actividad exonucleasa afecta preferentemente al extremo 5' de ADN de cadena sencilla [7]. LiEndoG está codificada en un gen nuclear del cromosoma 10 de *L. infantum* y es transportada al interior de su única mitocondria debido a la presencia de un péptido señal en su extremo N-terminal [10]. Como se dijo anteriormente, LiEndoG presenta un papel dual provida/promuerte. Por un lado, al someter a los promastigotes de *L. infantum* a estímulos de muerte (edelfosina), se produce la migración de LiEndoG desde la mitocondria al núcleo, induciendo la muerte celular mediante la degradación del ADN (promuerte). Por otro lado, la eliminación de un solo alelo del gen que codifica para LiEndoG (semi-*knockout*) da lugar a una disminución del crecimiento y de la infectividad, mientras que la eliminación de ambos alelos resulta en parásitos no viables (provida). Se ha sugerido que LiEndoG podría estar implicada en procesos de recombinación y reparación del ADN mitocondrial, lo que explicaría que inhibidores de la enzima como Lei49 reduzcan la viabilidad de promastigotes y amastigotes [7].

La purificación y la cristalización de LiEndoG son importantes para conocer su estructura en detalle y poder diseñar inhibidores proteicos útiles en terapéutica. La expresión y purificación de proteínas recombinantes se ha logrado con éxito en sistemas procariotas (*Escherichia coli*, *Bacillus*, etc.), sistemas eucariotas (levaduras como *S. cerevisiae*, células de insectos, células de mamíferos, etc.) y sistemas libres de células (*in vitro*). En nuestro laboratorio se llevó a cabo la expresión de LiEndoG en la cepa Rosetta de *E. coli*. Sin embargo, la proteína se encontró en la fracción insoluble debido a agregación proteica y formación de cuerpos de inclusión, por lo que para su purificación se requirieron condiciones desnaturizantes para solubilizar la fracción insoluble (urea 8 M) y una renaturalización posterior, lo que puede dar lugar a plegamientos incorrectos y a una pérdida de actividad enzimática [11]. Además, la utilización de *E. coli* como sistema de expresión proteica tiene serias limitaciones, entre las que se encuentran la ausencia de modificaciones postraduccionales y su incapacidad para plegar correctamente proteínas eucariotas, lo que conduce a que solamente el 15% de éstas se encuentren en su forma activa [12]. Por otro lado, *S. cerevisiae* presenta modificaciones postraduccionales muy simples, los cultivos de células de mamíferos tienen un rendimiento de expresión muy bajo y los sistemas *in vitro* son difíciles de escalar y caros [13-15]. Nuestro grupo de investigación propone como alternativa un sistema de expresión basado en *Leishmania tarentolae*, un protozoo parásito no patógeno para humanos aislado de la salamandrina *Tarentola annularis*. Dicho protozoo presenta características únicas como son: edición del

ARN, genes dispuestos en tándem, producción de ARNm policistrónico seguido de trans-*splicing* y poliadenilación, regulación postranscripcional de la expresión génica influida por regiones intergénicas y modificaciones postraduccionales similares a las de mamíferos. Entre éstas se encuentran: N-glucosilación con fucosa, N-acetil-glucosamina y galactosa; procesamiento de péptidos señal; plegamiento de proteínas; formación de puentes disulfuro; etc. Además, presenta un crecimiento rápido, requerimientos nutricionales mínimos y una manipulación genética y escalado sencillos [12, 13, 16]. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es la puesta a punto y la utilización de *Leishmania tarentolae* como sistema de expresión de LiEndoG para su posterior purificación y cristalización.

Materiales y métodos

Leishmania tarentolae T7-TR como sistema eucariótico de expresión de proteínas

Como sistema de expresión proteica se empleó la cepa *L. tarentolae* T7-TR (Jena Bioscience. Turingia, Alemania. Ref. LT-110), la cual expresa constitutivamente la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7pol) y el represor del elemento de respuesta a tetraciclina (Tet repressor o TetR). Los genes que codifican para T7pol y TetR se acompañan de genes de resistencia a los antibióticos de selección nourseotricina (*sat*) e higromicina (*hyg*), respectivamente; lo que permite seleccionar aquellos parásitos que mantengan dichas construcciones. Tanto la T7pol como el TetR están integrados en el *locus* del ARNr de la subunidad pequeña del ribosoma (*ssu*), y por lo tanto expresados bajo el control de la ARN polimerasa I. El gen que codifica para la proteína de interés, en nuestro caso LiEndoG, se inserta en un *cassette* de expresión bajo el control del promotor de la T7pol y un operador denominado elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), que se integra en *locus* de la β -tubulina (*tub*). Esta construcción se puede mantener utilizando Geneticina® (G418) como antibiótico de selección al presentar el gen de resistencia a neomicina/G418 (*neo*). En ausencia de tetraciclina, el TetR se une al TRE, impidiendo que la T7pol exprese el gen de interés. Sin embargo, cuando se añade tetraciclina al medio, ésta puede unirse al TetR e impedir su unión al TRE, lo que permite a la T7pol expresar el gen deseado [17] (ver **Anexo I**).

Cultivo de *Leishmania tarentolae* T7-TR

La cepa de *L. tarentolae* LEXSY T7-TR se cultivó en frascos con filtro, en oscuridad y a 26 °C. Como medio de cultivo se utilizó infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, EEUU. Ref. 53286) a una concentración de 37 g/L, suplementado con 5 µg/ml de hemina porcina (Jena Bioscience. Ref. ML-108), 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (GIBCO® Invitrogen. Waltham, MA, EEUU. Ref. 15140-122), 100 µg/ml de nourseotricina (Jena Bioscience. Ref. AB-101S) y 100 µg/ml de higromicina (Jena Bioscience. Ref. AB-104S).

Diseño de construcciones

Por un lado se llevó a cabo el clonaje del inserto 6xHis.PrS. Δ SPEndoG en el vector pTUB_APX1.4neo (Jena Bioscience. Ref. EGE-221) (ver **Anexo II**). La secuencia codificante de LiEndoG sin el péptido señal de migración a la mitocondria (Δ SPEndoG) se amplificó mediante PCR, introduciendo en el extremo 5' la diana de la enzima de restricción NcoI y las secuencias codificantes para: una glicina, seis histidinas (His-tag) y la diana de reconocimiento de la proteasa PreScission. En el extremo 3' se introdujo la diana de la enzima de restricción NotI tras el codón de parada. Para ello se utilizó un plásmido con la secuencia codificante de LiEndoG como molde, la ADN polimerasa PWO Master (Roche. Mannheim, Alemania. Ref. 03789403001) y los cebadores sentido y antisentido del **Anexo III**. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se purificó la banda de interés (1438 pb), obteniéndose el inserto 6xHis.PrS. Δ SPEndoG. Tanto el inserto como el vector pTUB_APX1.4neo se digirieron con las enzimas de restricción NcoI y NotI (Thermo Scientific. Waltham, MA, EEUU. Ref. #FD0574 y #FD0593), se purificaron y se ligaron utilizando la ADN ligasa T4 (Thermo Scientific. Ref. #EL0014). El producto de ligación se empleó para transformar bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5 α que se seleccionaron en placas de LB con ampicilina (100 µg/ml). Se comprobó mediante PCR la incorporación de la construcción, se aislaron los plásmidos de las colonias positivas mediante el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen. Venlo, Holanda. Ref. 27104) y se secuenciaron. El vector obtenido se denominó pTUB_6xHis.PrS. Δ SPEndoG. Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1% peso/volumen teñidos con bromuro de etidio. Todas las purificaciones de ADN en este trabajo se realizaron con el kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences. Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido. Ref. 28-9034-70).

Por otro lado, también se utilizó el plásmido pTUB_Secr. Δ SPEndoG.6xHis, una construcción elaborada por nuestro grupo de investigación en la que se tiene la secuencia codificante para LiEndoG sin el péptido señal de migración a la mitocondria (Δ SPEndoG), precedida en su extremo 5' por la secuencia codificante del péptido señal de secreción de la fosfatasa ácida secretada de *Leishmania mexicana* (ver **Anexo III**) y con una secuencia que codifica para seis histidinas (His-tag) en su extremo 3'.

El vector pTUB_6xHis.PrS. Δ SPEndoG codifica para una LiEndoG citoplasmática (LiEndoG-cit) mientras que el pTUB_Secr. Δ SPEndoG.6xHis lo hace para una LiEndoG que esperamos sea secretada al medio de cultivo (LiEndoG-sec).

Electroporación y selección de *Leishmania tarentolae* T7-TR

Se linealizaron las construcciones pTUB_6xHis.PrS. Δ SPEndoG y pTUB_Secr. Δ SPEndoG.6xHis por digestión con las enzimas de restricción *PacI* y *MssI* (Thermo Scientific. Ref. #FD2204 y #FD1344). Se electroporaron 40×10^6 parásitos/ml resuspendidos en 350 μ l de medio de cultivo BHI (37 g/L) junto con aproximadamente 5 μ g de las construcciones previamente linealizadas y purificadas. Como control negativo se electroporaron 40×10^6 parásitos/ml resuspendidos en 400 μ l de medio de cultivo sin ADN. La electroporación se realizó en cubetas desechables BTX[®] de 2 mm de separación entre los electrodos (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EEUU. Ref. 58017-895) utilizando el electroporador Electro Cell Manipulator[™] ECM[®] 600 (Harvard Apparatus) bajo las siguientes condiciones: 450 V, 450 μ F y 24 Ω . Antes y después de la electroporación se incubaron las cubetas con las mezclas de electroporación en hielo durante 10 minutos. Se transfirió el contenido de las cubetas a frascos con filtro a un volumen final de 10 ml del medio cultivo BHI anteriormente descrito pero sin los antibióticos de selección nourseotricina e higromicina. A las 24 horas de la electroporación se añadió el antibiótico de selección G418 (GIBCO[®] Invitrogen. Ref. 10131035) a 50 μ g/ml. A los 5 días de la adición de G418 se realizó un pase del cultivo en una proporción 1:10 en un volumen final de 5 ml y se renovó su medio de cultivo una vez por semana hasta la selección de los parásitos, momento en el que se añadieron los antibióticos de selección nourseotricina e higromicina, ambos a una concentración final de 100 μ g/ml.

Inducción y evaluación de los niveles de expresión de LiEndoG-cit y de LiEndoG-sec

Se inocularon 22 ml del medio de cultivo descrito anteriormente sin los antibióticos de selección nourseotricina e higromicina con 28 ml de un cultivo de *L. tarentolae* con la construcción codificante para LiEndoG-cit a una concentración de $35,7 \times 10^6$ parásitos/ml, obteniéndose 50 ml con una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,53 ($\sim 20 \times 10^6$ parásitos/ml). A continuación se indujo la expresión de LiEndoG-cit adicionando tetraciclina (Sigma-Aldrich. Ref. T7660) a una concentración final de 5 μ g/ml. El cultivo se mantuvo en matraz Erlenmeyer con agitación a 140 rpm. Se tomaron alícuotas antes de la inducción (preinducción) y a las 24, 48 y 72 horas postinducción, cada una de ellas con 80×10^6 parásitos. Las muestras se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 5 minutos y se conservaron los precipitados para su posterior análisis.

Por otro lado, se inocularon 45 ml del medio de cultivo descrito anteriormente sin los antibióticos de selección nourseotricina e higromicina con 5 ml de un cultivo de *L. tarentolae* con la construcción codificante para LiEndoG-sec a una concentración de 72×10^6 parásitos/ml, obteniéndose 50 ml con una OD_{600} de 0,18 ($\sim 7,2 \times 10^6$ parásitos/ml). Se tomaron alícuotas de 8 ml de preinducción y a las 24, 48 y 72 horas postinducción. Cada alícuota se centrifugó a $3000 \times g$ durante 10 minutos. Los sobrenadantes se filtraron con filtros de PVDF con un tamaño de poro de 0,22 μ m (Millipore. Billerica, MA, EEUU. Ref. SLGV033RS). Para precipitar las proteínas del sobrenadante se utilizó ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich. Ref. T6399) previamente enfriado, quedando éste a una concentración final del 10%. La precipitación se realizó según el protocolo facilitado por el fabricante [17].

La evaluación de los niveles de expresión se realizó mediante inmunoblot. Tanto los precipitados de *L. tarentolae* con LiEndoG-cit como los precipitados con las proteínas del sobrenadante procedentes del cultivo de *L. tarentolae* con LiEndoG-sec fueron resuspendidos en tampón Laemmli (Tris 187,5 mM pH 6,8; SDS al 6%; glicerol al 30%; azul de bromofenol al 0,01%) con 2-mercaptoetanol al 10%, y hervidos a 100 °C durante 10 minutos. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS al 0,1% (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) y se realizó una transferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich. Ref. A7030) al 5% en TTBS (Tris 20 mM; NaCl 500 mM; Tween 20 al 0,1% v/v; pH 7,4) se incubaron con el anticuerpo de ratón anti-poliHistidina marcado con peroxidasa de rábano (Abcam. Cambridgeshire, Reino Unido. Ref. AB49781) diluido en una proporción 1:50000 en BSA al 5% en TTBS. Como control de carga se midió la proteína Hsp70, utilizando el anticuerpo primario de conejo anti-Hsp70 (cedido amablemente por el laboratorio del Dr. Clos, Institute Bernhard Notch for Tropical Medicine, Hamburgo, Alemania) y el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano (DAKO Agilent Technologies. Santa Clara, CA, EEUU. Ref. P0448), ambos en una proporción 1:5000 en BSA al 5% en TTBS. Para la detección de la señal de quimioluminiscencia se utilizó el kit Clarity[™] Western ECL Substrate (BioRad. Hercules, CA, EEUU. Ref. 170-5060).

Purificación de LiEndoG-cit y de LiEndoG-sec

Se inocularon 500 ml del medio de cultivo descrito anteriormente sin los antibióticos de selección nourseotricina e higromicina con 100 ml de un cultivo de *L. tarentolae* con la construcción codificante para LiEndoG-cit a una concentración de 120×10^6 parásitos/ml, obteniéndose 600 ml con una OD_{600} de

0,525 (~20x10⁶ parásitos/ml). A su vez, se inocularon 488 ml del medio de cultivo descrito anteriormente sin los antibióticos de selección nourseotricina e higromicina con 112 ml de un cultivo de *L. tarentolae* con la construcción codificante para LiEndoG-sec a una concentración de 137x10⁶ parásitos/ml, obteniéndose 600 ml con una OD₆₀₀ de 0,64 (~20x10⁶ parásitos/ml). Se indujo la expresión de las dos proteínas adicionando tetraciclina a una concentración final de 5 µg/ml. Los cultivos se mantuvieron en matraz Erlenmeyer con agitación a 140 rpm. A las 48 horas, los dos cultivos se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos. Con el fin de romper las células y obtener la fracción soluble, el precipitado del cultivo de *L. tarentolae* con LiEndoG-cit se resuspendió en un tampón de lisis fosfato (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM y 0,4 mM KCl), se sonicó en hielo durante 30 minutos con pulsos del 50% a la potencia 7 del sonicador (Branson Sonifier Cell Disruptor B15. Danbury, CT, EEUU) y se centrifugó a 8000 x g durante 1 hora. Ambas proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando el sistema ÄKTApurifier™ UPC10 (GE Healthcare Life Sciences. Ref. 28406268) y columnas de afinidad HisTrap de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences. Ref. 17-5247-01) previamente equilibradas. Para ello, se mantuvieron tanto la fracción soluble con LiEndoG-cit como el sobrenadante con LiEndoG-sec recirculando a través de dichas columnas durante 24 horas a 4 °C. Las proteínas retenidas en las columnas se lavaron con el tampón fosfato utilizado en la sonicación. En ambos casos, la elución se llevó a cabo en un tampón fosfato con imidazol (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM, 0,4 mM KCl e imidazol 500 mM). El análisis de las muestras se realizó mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y la visualización de las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie R (Sigma-Aldrich. Ref. 27816).

Ensayo de actividad de LiEndoG-cit y LiEndoG-sec

Se digirieron 500 ng del plásmido pRSETA-GR con 2 µl de cada una de las mezclas de las fracciones de purificación de LiEndoG-cit y LiEndoG-sec. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 16 horas. Como control negativo se incubaron 500 ng del plásmido sin enzima. Se analizó la actividad sometiendo los productos de la digestión a electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio.

Resultados y discusión

Obtención de la construcción pTUB_6xHis.PrS.ΔSPEndoG para la posterior expresión de LiEndoG-cit

El ADN amplificado por PCR a partir de un molde que contenía la secuencia codificante para LiEndoG carece de los primeros 153 nucleótidos del extremo 5', que se traducen en los 52 aminoácidos que constituyen el péptido señal de migración a la mitocondria del extremo N-terminal. Además, se introdujeron una glicina, un His-tag y la diana de reconocimiento de la proteasa PreScission (figura 1). La glicina es necesaria para mantener el marco de lectura en la transcripción. El His-tag presenta afinidad por cationes bivalentes como el níquel (Ni²⁺) y se utilizó posteriormente para la purificación de la proteína. La diana de reconocimiento de la proteasa PreScission se utilizará tras la purificación para eliminar la glicina y el His-tag y obtener así la proteína recombinante ΔSPEndoG.

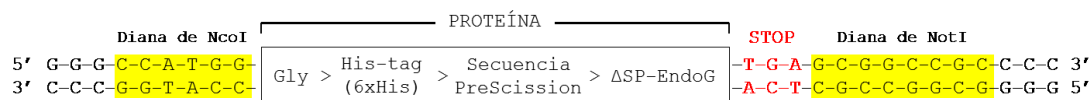


Figura 1.- Representación esquemática de 6xHis.PrS.ΔSPEndoG. Dentro del recuadro se encuentra la traducción de la secuencia codificante amplificada. ΔSP son las siglas de *deletion of signal peptide*.

La eficacia de la amplificación fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio. En la figura 2 se observa una banda por debajo de los 1500 pb que se corresponde con el inserto 6xHis.PrS.ΔSPEndoG (1438 pb) y que se purificó del gel. Tanto el inserto como el vector pTUB_APX1.4neo fueron digeridos con las enzimas de restricción NcoI y NotI y purificados. El producto de la ligación entre el inserto y el vector digeridos se utilizó para transformar bacterias competentes de la cepa DH5α de *E. coli*. Las bacterias se seleccionaron en placas de LB con ampicilina ya que aquellas que incorporan el plásmido pueden expresar una β-lactamasa y ser resistentes al antibiótico. La presencia del inserto 6xHis.PrS.ΔSPEndoG se analizó en cuatro colonias mediante PCR. Se consideraron positivas aquellas colonias en las que se amplificó el inserto utilizando los cebadores del Anexo III. En la figura 3 se muestra que las colonias #1, #2 y #3 fueron positivas, mientras que la colonia #4 fue negativa. Esto puede deberse a que la digestión del vector no fuera completa y alguna bacteria incorporara el vector sin digerir, lo cual también le otorgaría resistencia a la ampicilina.

Se aislaron y secuenciaron los ADN plasmídicos de las colonias #1 y #3. Finalmente se trabajó con el plásmido de la colonia #3 tras comprobar que la secuencia clonada era la correcta.

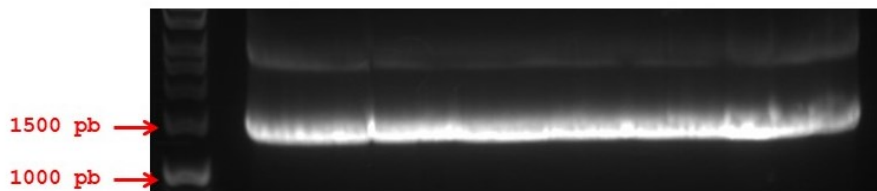


Figura 2.- Análisis del producto de PCR. La banda entre 1000 y 1500 pb se corresponde con el inserto de interés 6xHis.PrS.ΔSPEndoG (1438 pb). La banda superior es una inespecificidad probablemente debida a que la temperatura de anillamiento no fue óptima para ambos cebadores (T_m dispares).

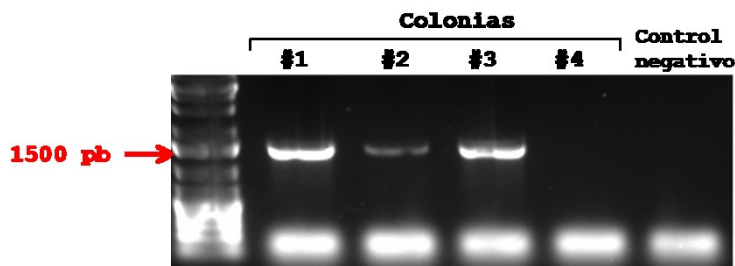


Figura 3.- Análisis de incorporación del inserto. Se observa que las colonias #1, #2 y #3 son positivas para el inserto 6xHis.PrS.ΔSPEndoG. Las bandas inferiores que aparecen en todos los carriles se corresponden con los cebadores empleados en la PCR.

Linealización de las construcciones a electroporar

La linealización de las construcciones con las enzimas de restricción *PacI* y *MssI* es necesaria para que se pueda producir la recombinación homóloga en el *locus* de la β -tubulina y, por tanto, para que se integren las construcciones en el genoma de los parásitos. Dicha recombinación homóloga es posible debido a que los insertos de interés se encuentran flanqueados por las regiones no traducidas 5' β -tub y 3' β -tub. En la figura 4 se comprueba que las digestiones del vector sin inserto, del vector que contiene la secuencia codificante para LiEndoG-cit y del que contiene la secuencia codificante para LiEndoG-sec han sido completas. A continuación se cortó y purificó la banda superior de cada una de las digestiones para transfectar posteriormente promastigotes de *L. tarentolae* con ellas.

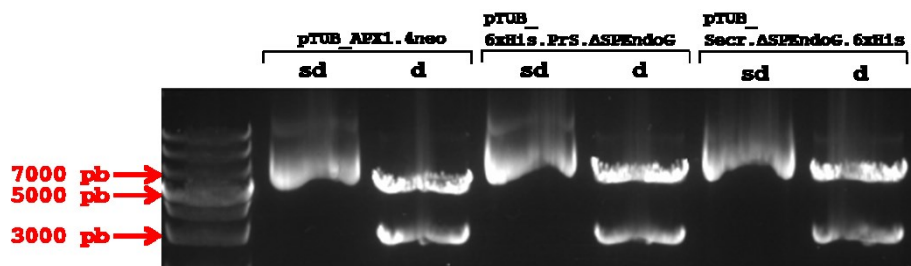


Figura 4.- Comprobación de digestión completa de pTUB_APX1.4neo, pTUB_6xHis.PrS.ΔSPEndoG y Secr.ΔSPEndoG.6xHis Las siglas "sd" y "d" significan "sin digerir" y "digerido", respectivamente.

Inducción y evaluación de los niveles de expresión de LiEndoG-cit y de LiEndoG-sec

Tras la electroporación de los parásitos se llevó a cabo la selección de los mismos con el antibiótico G418, ya que aquellos que integran las construcciones de interés en su genoma adquieren resistencia a este antibiótico. Se consideró que los parásitos estaban seleccionados cuando en el control negativo presentaban una forma esférica o irregular sin flagelo y el medio de cultivo era transparente, mientras que en los cultivos de interés eran móviles, tenían forma de promastigote y el medio de cultivo era turbio.

La purificación de proteínas requiere conocer cuándo se alcanza la máxima expresión para establecer las condiciones óptimas de inducción. Es por ello que se indujo la expresión de LiEndoG-cit y se tomaron alícuotas de preinducción y postinducción a las 24, 48 y 72 horas, de manera que el número de parásitos fuera constante para poder comparar la expresión proteica con el tiempo. Por otro lado, también se indujo la expresión de LiEndoG-sec, pero en este caso se tomaron alícuotas de 8 ml del medio de cultivo antes de la inducción y a las 24, 48 y 72 horas postinducción y se precipitaron las proteínas del sobrenadante. Esto permitió evaluar la cantidad de LiEndoG-sec a medida que crecía el cultivo. Los niveles de expresión proteica se evaluaron por inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-poliHistidina marcado, que reconoce el His-tag de ambas proteínas. Además, en el caso de LiEndoG-cit se llevó a cabo un control de carga utilizando un anticuerpo anti-Hsp70 para comprobar que se tiene la misma cantidad de proteína total en todas las muestras. Los niveles de expresión de LiEndoG-cit (50,9 kDa teóricos) alcanzaron la máxima expresión entre las 24 y las 48 horas postinducción y disminuyeron a las 72 horas (figura 5A).

Los niveles de expresión de LiEndoG-sec (52,6 kDa teóricos) aumentaron en el medio de cultivo a las 48 horas, y se pudo observar que la proteína se degradó entre las 48 y las 72 horas (figura 5B).

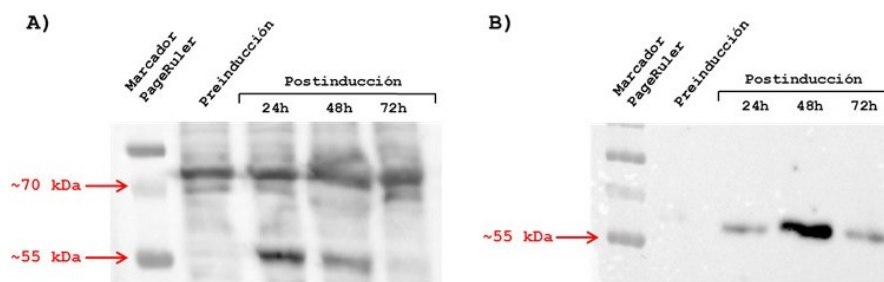


Figura 5. Ensayos de inducción de la expresión proteica. A) Inducción de la expresión de LiEndoG-cit. El control de carga se muestra a los 70 kDa, correspondientes con la proteína Hsp70 de *L. infantum*. B) Inducción de la expresión de LiEndoG-sec.

Las discrepancias entre el peso molecular teórico y el observado en geles SDS-PAGE (~55 kDa) podrían deberse a que LiEndoG sufre modificaciones postraduccionales que son introducidas por *L. tarentolae*.

Purificación de LiEndoG-cit y de LiEndoG-sec

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en los que se observó una disminución de la expresión de LiEndoG-cit y una degradación de LiEndoG-sec a las 72 horas, se mantuvo la inducción de la expresión proteica con tetraciclina durante 48 horas.

Las purificaciones de LiEndoG-cit y de LiEndoG-sec requieren que las soluciones que contienen las proteínas recirculen a través de una columna HisTrap, compuesta por una resina de níquel-sefarosa. El níquel presenta una elevada afinidad por la histidina y, por tanto, por aquellas proteínas que presentan un HisTag, como es el caso de LiEndoG-cit y LiEndoG-sec. Así, éstas son retenidas en las columnas hasta que se hace pasar por ellas imidazol, el cual compete con las histidinas por su unión al níquel, promoviendo el desplazamiento y elución de las proteínas, que son recogidas en distintas fracciones. En la figura 6 se muestran los cromatogramas correspondientes a la elución de LiEndoG-cit (figura 6A) y LiEndoG-sec (figura 6B). Se observa que la absorbancia a 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas) fue mayor en el caso de LiEndoG-cit que en el de LiEndoG-sec, lo que *a priori* indica que se purificó más cantidad de la primera que de la segunda. Sin embargo, el análisis de las fracciones obtenidas en cada una de las purificaciones mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y su posterior tinción en azul brillante de Coomassie, reveló que la purificación de LiEndoG-cit no fue óptima, pues se purificaron junto con ella muchas otras proteínas (figura 7A), lo que explica que la absorbancia en el cromatograma sea mayor. En cambio, se puede observar que la purificación de LiEndoG-sec fue más eficiente que la de LiEndoG-cit, pues no se acompaña de otras proteínas (figura 7B).

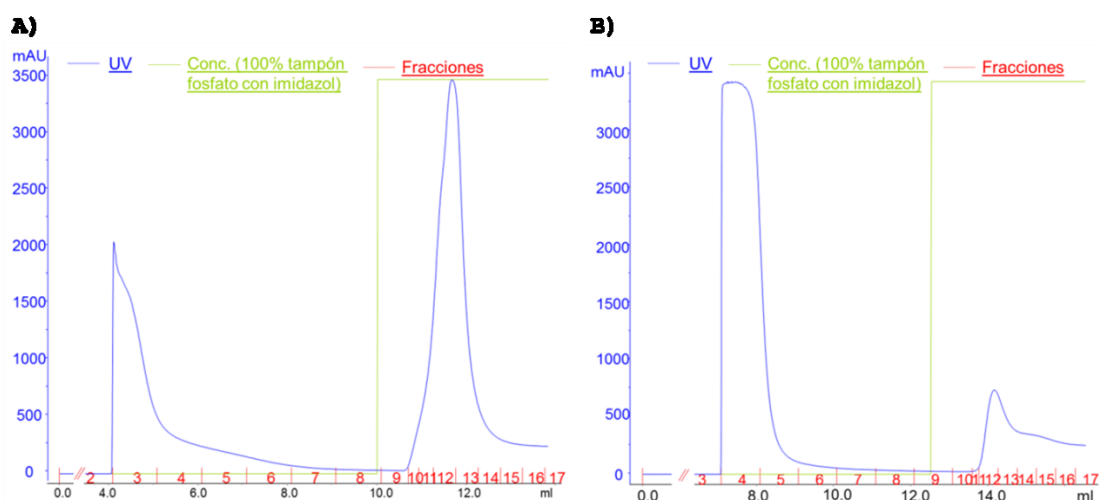


Figura 6. En azul se representa la absorbancia en el ultravioleta a 280 nm. En verde se indica el momento en que se adiciona el tampón fosfato con imidazol para eluir las proteínas. En rojo se encuentran las fracciones recogidas. A) Entre las fracciones 3 y 9 se eluye el *flow through* y se lava la columna. LiEndoG-cit se eluye entre las fracciones 10 y 15. B) Entre las fracciones 4 y 10 se eluye el *flow through* y se lava la columna. LiEndoG-sec se eluye entre las fracciones 11 y 14.

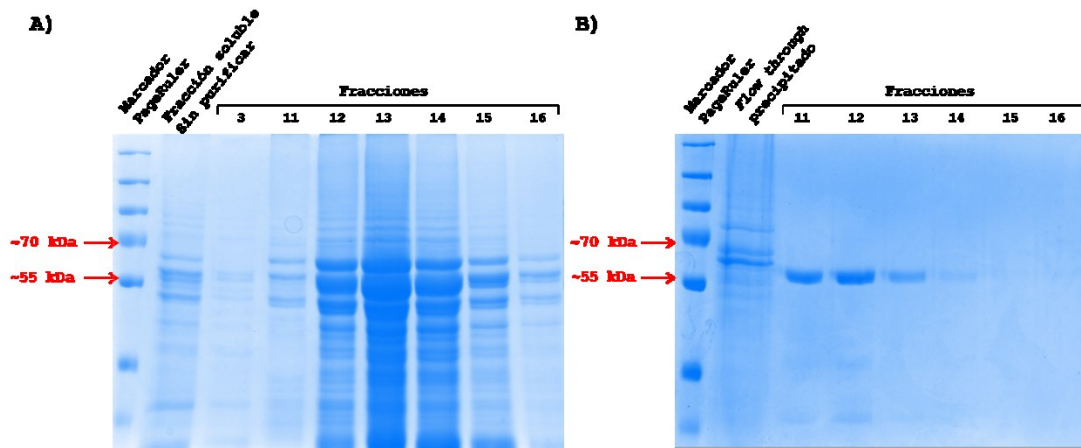


Figura 7. Tinción de geles SDS-PAGE al 10% en azul brillante de Coomassie. 6A) Análisis de la purificación de LiEndoG-cit. En el segundo carril se encuentra una muestra de la fracción soluble sin purificar. En el tercer carril se encuentra el *flow through*. En los carriles siguientes se encuentran las fracciones purificadas en las que se eluyó la proteína LiEndoG-cit junto con otras proteínas no identificadas. 6B) Análisis de la purificación de LiEndoG-sec. En el segundo carril se encuentra una muestra de las proteínas precipitadas con ácido tricloroacético a partir de 8 ml del medio de cultivo tras usar la columna, lo que equivale al *flow through*. En los carriles siguientes se encuentran las fracciones purificadas y se observa la banda correspondiente a LiEndoG-sec.

El proceso de purificación de LiEndoG-cit puede ser optimizado utilizando un gradiente de imidazol con el fin de eluir en distintas fracciones aquellas proteínas que, por contener histidinas en su estructura, hubieran quedado retenidas inespecíficamente en la columna HisTrap. Por otro lado, sería interesante conocer qué proteínas son las que se han eluido junto con LiEndoG-cit, ya que podrían ser aquellas que interactúan intracelularmente con la misma.

Ensayos de actividad enzimática

Una vez obtenidas las proteínas LiEndoG-cit y LiEndoG-sec se realizó un ensayo enzimático para comprobar que mantenían su actividad endonucleasa tras la purificación. Para ello se digirieron 500 ng del plásmido pRSETA-GR (~3500 pb) con cada una de las enzimas. En la figura 8 se muestra cómo en el carril con el plásmido sin digerir aparecen dos bandas, que se corresponden con las formas circular superenrollada (cse) y circular relajada (cr). En cambio, la forma circular superenrollada no se encuentra en el plásmido digerido con LiEndoG-sec ni con LiEndoG-cit, indicando que las enzimas realizan cortes de cadena sencilla en el ADN de doble cadena, presentando actividad endonucleasa. Esto hace que el plásmido se encuentre en su forma circular relajada o lineal (lin). Sin embargo, en el caso de la digestión con LiEndoG-cit no se puede asegurar que la actividad endonucleasa se deba a ésta, pues la purificación no fue óptima y podría deberse a otras proteínas presentes en la mezcla de elución.

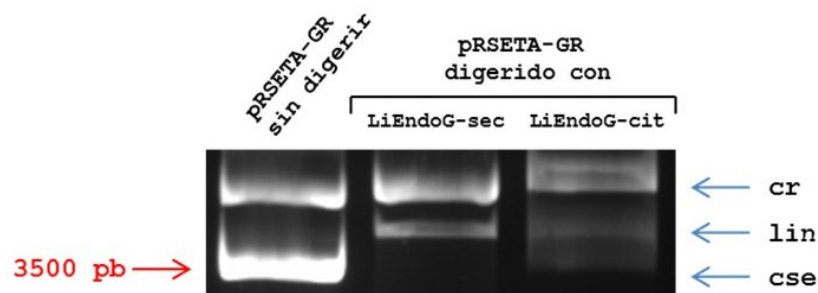


Figura 8. Análisis de la actividad enzimática de LiEndoG-sec y LiEndoG-cit.

Conclusiones

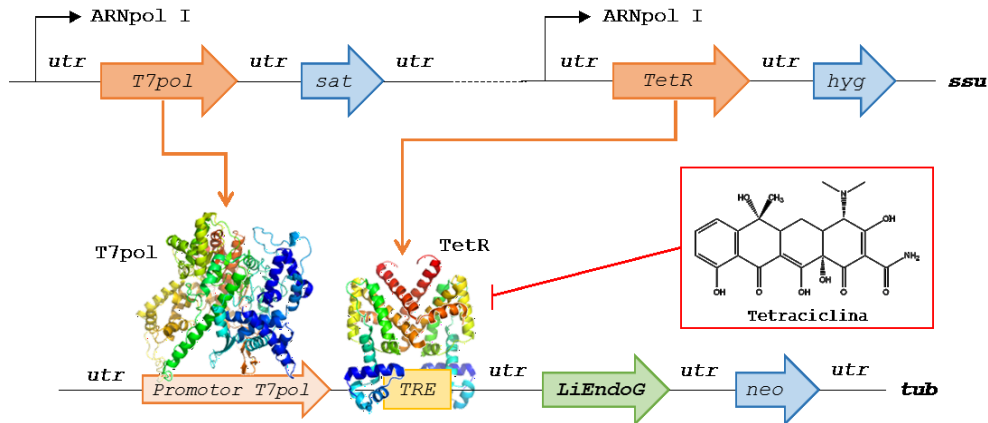
En el presente trabajo queda demostrado que *L. tarentolae* puede utilizarse como un sistema inducible de expresión proteica para la obtención de la proteína LiEndoG en condiciones nativas y con un alto grado de pureza cuando es secretada al medio de cultivo, mientras que cuando se encuentra citoplasmática la purificación es deficiente en las condiciones estudiadas pero fácilmente mejorable. Además, las enzimas recombinantes purificadas mantienen su actividad endonucleasa, demostrándose que conservan una conformación adecuada. Esto supone un avance en el método de purificación de LiEndoG empleado hasta la fecha pues se evita la utilización de condiciones desnaturizantes y su posterior renaturalización.

Referencias

1. Neglected tropical diseases. 2016 (22 may). In World Health Organization. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
2. Leishmaniasis. 2016 (22 may). In World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
3. Parasites - Leishmaniasis. 2016 (22 may). In Center for Disease Control and Prevention (CDC). http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/
4. Schmidt, G.D. and Roberts, L.R. 2009. Kinetoplast: Trypanosomes and Their Kin. In: Roberts, L.R. and Janovy, J. Jr., editors. *Foundations of Parasitology*. Eight Edition. New York: McGraw-Hill. p 77-88.
5. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases. 2016 (22 mayo). In World Health Organization. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1
6. Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España - Octubre 2012. 2016 (24 mayo). Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). En Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España. <http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>
7. Rico, E., Oliva, C., *et al.* 2014. *Leishmania infantum* EndoG Is an Endo/Exo-Nuclease Essential for Parasite Survival. *PLOS ONE*. 9(2): 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0089526
8. Gannavaram, S. and Debrabant, A. 2012. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2(95): 1-9. doi:10.3389/fcimb.2012.00095
9. van Zandbergen, G., Bollinger, A., *et al.* 2006. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *PNAS*. 103(37): 13837-42. doi:10.1073/pnas0600843103
10. Rico, E., *et al.* 2008. *Leishmania infantum* expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the nucleus in response to an apoptotic stimulus. *Molecular & Biochemical Parasitology*. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.09.007
11. García, L. 2013. Optimización del proceso de purificación de la proteína LiEndoG de *Leishmania infantum* (Trabajo de Fin de Grado). Madrid:España. Universidad de Alcalá.
12. Basile, G. and Peticca, M. 2009. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology*. 43:273-8. doi:10.1007/s12033-009-9213-5
13. Niimi, T. 2012. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review. *Methods in Molecular Biology*. 824:307-15. doi: 10.1007/978-1-61779-433-9_15
14. Kushnir, S., *et al.* 2005. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expression and Purification*. 42(2005): 37-46
15. Sodoyer, R. 2004. Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceuticals. *BioDrugs*. 18(1): 51-62.
16. Hresko, S., *et al.* 2012. Rapid protein production pipeline in advanced inducible *Leishmania tarentolae* expression system. *Farm animal proteomics*. pp 75-79.
17. *Leishmania tarentolae*. Gene Expression Starter Kit for inducible protein expression: User's guide. 2016 (24 mayo). Jena Bioscience. En: http://ubio.bioinfo.cnio.es/data/crystal/local_info/vectors/pTUBAPX%20manual.pdf

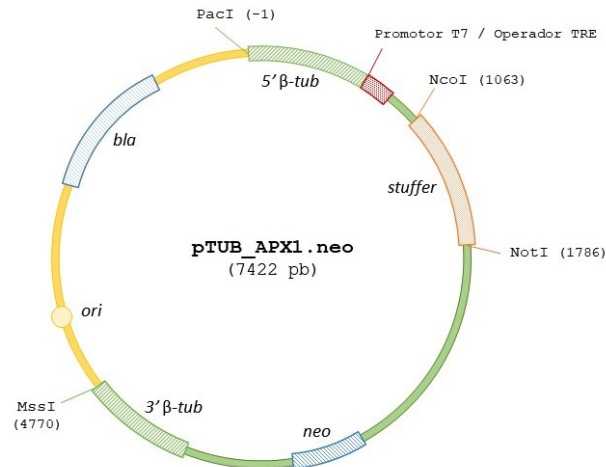
Material Suplementario

Anexo I - Sistema inducible de expresión proteica en la cepa *Leishmania tarentolae* T7-TR



La cepa *L. tarentolae* T7-TR expresa constitutivamente la T7pol y el TetR bajo el control de la ARN polimerasa I. El gen que codifica para LiEndoG se integra en el locus de la β -tubulina (*tub*) y se expresa bajo el control del promotor de la T7pol y el operador TRE. En ausencia de tetraciclina, el TetR se une al TRE, impidiendo que la T7pol exprese el gen codificante para LiEndoG. La tetraciclina es capaz de unirse al TetR e impedir su unión al TRE, lo que permite a la T7pol expresar el gen de interés.

Anexo II - Mapa del vector



El plásmido pTUB_APX1.4neo es un vector de expresión inducible con el promotor de la T7pol y el operador TRE. El gen de interés reemplaza a un fragmento de ADN denominado *stuffer*, para lo que se requiere la digestión del vector y del inserto con las enzimas de restricción NcoI y NotI y la posterior ligación de ambos. Presenta las regiones 5'β-tub y 3'β-tub necesarias para la recombinación homóloga en el locus de la β -tubulina del parásito tras la linealización del plásmido con las enzimas de restricción PacI y MssI. Contiene un origen de replicación bacteriano (*ori*) y el gen de resistencia a antibióticos β -lactámicos como la ampicilina (*bla* – β -lactamasa) para su replicación y selección en bacterias, y el gen de resistencia a G418 (*neo*) para la selección de los parásitos.

Anexo III - Secuencias

Secuencia del cebador sentido FwNcoI6xHisPrSΔSPEndoG. Se subrayan los nucleótidos del cebador que hibridan con la secuencia de LiEndoG.

5'- GGGCCATGGGACACCACCACCACCACCACCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTCAATCGGGAGCGCAGGCAGCGACAGC -3'

Secuencia del cebador antisentido RvNotIΔSPEndoG. Se subrayan los nucleótidos del cebador que hibridan con la secuencia de LiEndoG.

5'- GGGGCGGCCGCTCAGCGTCGCTCTGCCTGGTCG -3'

Secuencia codificante del péptido señal de secreción de la fosfatasa ácida secretada de *Leishmania mexicana*

5'- ATGGCCTCGAGGCTCGTCCGTGTGCTGGCCCGCCATGCTGGTTGCAGCGCCGTGTCGGTGCAGCTGGCGCC -3'