



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO DEL MECANISMO AUTOPROTEOLÍTICO NATIVO DE AG43
PARA SU APLICACIÓN EN EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES
DE FÁCIL PURIFICACIÓN EN ESCHERICHIA COLI

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

FEDERICO PATRICIO HARTMANN PRIETO

PROFESOR GUÍA:
ÁLVARO MARÍA OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BARBARA ANDREWS FARROW
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE

2018

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología

POR: Federico Patricio Hartmann Prieto

FECHA: 11/10/2018

PROFESOR GUÍA: Álvaro María Olivera Nappa

ESTUDIO DEL MECANISMO AUTOPROTEOLÍTICO NATIVO DE AG43 PARA SU APLICACIÓN EN EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE FÁCIL PURIFICACIÓN EN ESCHERICHIA COLI

En búsqueda de un sistema de expresión recombinante que reduzca los requerimientos de purificación respecto a los de alternativas existentes, se optó por desarrollar la secreción inducible. Para esto fue necesario definir los componentes del sistema junto con la variable operacional de control, cuya modificación activa la liberación de las proteínas producidas desde la célula hospedera al sobrenadante del cultivo.

Las proteínas autotransportadoras poseen un sistema de secreción eficiente y constan de dos dominios distintivos en su forma madura: el dominio pasajero (DP), unidad funcional que se expone al medio extracelular, y la unidad de translocación (UT), que se inserta en la membrana externa para permitir el paso del DP desde el periplasma. Dentro de esta familia, el antígeno 43 (Ag43) de *Escherichia coli* K12 representa un candidato ideal como base para el sistema de expresión. El enlace peptídico que une al DP y la UT es clivado autoproteolíticamente y posteriormente ambos dominios permanecen asociados por interacciones no covalentes, por lo que se pueden separar fácilmente. Si en el corte o la asociación participan aminoácidos con cadenas laterales ácidas o básicas, una modificación en el pH del medio podría alterar su interacción, cambiando la tasa de liberación del DP.

Para identificar la zona dentro de la proteína que cataliza la proteólisis se diseñaron variantes de Ag43 nativa con distintos segmentos del DP y *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) como módulo reportero. Se construyeron mediante Gibson Assembly en vectores pET22 y luego se indujo su expresión. Analizando proteínas quiméricas tanto de células enteras como lisadas se comprueba que el corte ocurre incluso cuando se elimina el sitio activo propuesto en literatura, correspondiente a un motivo aspartil-proteasa dentro del DP. Utilizando la fluorescencia de EGFP se monitoreó la localización del DP en función del tiempo paralelamente en medios con pH 7, 6 y 5, observándose una disminución en la liberación hacia el sobrenadante a medida que éste se acidifica.

Se determinó que el segmento del DP necesario para la autoproteólisis son sus últimos 50 aminoácidos (extremo carboxilo), lo que refuta el supuesto de que el sitio identificado previamente es responsable del corte. Dado que el pH óptimo de cultivo para *E. coli* es de 7 y la liberación máxima en el sobrenadante se registró para el mismo pH, se descarta la acidificación del medio como método para inducir la secreción. Existe la posibilidad de mantener la secuencia nativa y estudiar el comportamiento del fenómeno frente a cambios en otras variables de operación o identificar con exactitud los aminoácidos clave para el corte y la asociación entre dominios con el fin de someterlos a Ingeniería de Proteínas.

*A todas mis mamás:
en especial a la primordial,*

Piedad

Agradecimientos

El solo hecho de estar escribiendo esto me hace infinitamente feliz, porque por un momento pensé que quizás nunca lo iba a lograr.

A Alvarito, que es modelo a seguir, guía espiritual y fuente inagotable de conocimiento (muchas veces de temas que nada tenían que ver con el trabajo). A la Mayi, que me dejó convencerla de quererme y adoptarme en el laboratorio. A (*my name is*) Anamaría, que me cayó bien desde un principio y me acogió como hermana mayor cuando estaba huerfanito. A Orilove, ¡qué elegancia!

A Diegol, que contestaba cada una de mis preguntas (y las de todo el mundo). A la Vidi, que por suerte entendió mis preguntas apenas se las hacía. A Jean, Franco y Julian, que me dieron motivación para ir al laboratorio. A Vicky y a la Maca; al grupo del Retiro Espiritual y a la gente del CeBiB en general, que fueron mi última familia universitaria.

Al Felitss, la Sév y el Lucho, que me acompañaron cuando más sufría en el laboratorio. Al matrimonio Jabibi & Juan, que filosofaron conmigo buscando respuestas.

A MaLcela, que me quiso incluso cuando le tuve miedo. A Javonci, que redescubrí en el momento preciso. Al Nico, que es mi compañero de expediciones.

A la Lore y la Tati, que (sobre)vivieron conmigo la aventura de ser *minions*. A Felipe, que me dio una oportunidad que no me esperaba.

A Juaco, que me mostró la conexión mental que se puede llegar a tener con alguien. A la Tami, que creció junto a mí desde que éramos unas pequeñas equis. A la Valuca, que gracias a ser barsa se metió en mi corazón. Al Stefan, que fue el *sex symbol* de nuestra generación. Al Pancho y la Coni; a Sebigote y Simoreno, al resto de mis compañeros y todo IQBT, que me dejaron ser yo mismo en un ambiente maravilloso.

A la Cata, que fue mi amiga a primera vista. A Rocío, que me ayudaba aunque estuviera haciendo las tareas. A Kirby, el ingeniero nivel II, que fue mi primer amigo en Beauchef. Al David y al Jano; a Mario, Nano y Francullen; a todos los amigos que en un momento u otro hicieron de mi paso por la facultad una experiencia memorable.

A la Consu, que me valora incluso cuando yo no lo hago. A la Pole, mi hermana putativa, que me entiende mejor que nadie. A su madre la Ceci, que fue madre para mí también.

A mi familia espiritual, los Tala Pfeil: Roci, Andrew, Joaco, Mami y Papi; que me hacen sentir como una naranja sin importar que sea una manzana.

A la Inés, que aguantó todas mis mañas y fue tantas veces mi cómplice. A la Tía Yola, que en el fondo fue mi madrina. A mi papá, que me entregó las herramientas del humor y la creatividad. A mis primos, que me ayudan a sobrellevar la locura. Al Seba, que me salvó de la (amorosa) sobreprotección materna.

A mi mamá, que se la ha jugado en todo sentido desde que nací para darme lo mejor. A mi mamá, que me enseñó a ser correcto e intentar hacer las cosas bien. A mi mamá, que no siempre me entiende, pero siempre me apoya. A mi mamá, que tiene soluciones “Universidad de Chile” para lo que sea. A mi mamá, que aunque sea chica es una grande.

A todos ustedes, ¡muchísimas gracias!

Tabla de Contenido

1.	Introducción	1
1.1.	Motivación	1
1.2.	Marco Teórico	4
1.3.	Objetivos	10
2.	Metodología	11
2.1.	Técnicas de Biología Molecular	11
2.1.1.	Diseño de partidores	11
2.1.2.	Extracción de ADN plasmídico	11
2.1.3.	Reacción de polimerasa en cadena (PCR)	12
2.1.4.	Digestión con enzimas de restricción y Ligación	13
2.1.5.	<i>Gibson Assembly</i>	13
2.1.6.	Transformación de células quimiocompetentes	13
2.2.	Técnicas de Proteínas	14
2.2.1.	Cultivo e inducción	14
2.2.2.	Tratamiento con tripsina	15
2.2.3.	Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	15
2.2.4.	Curvas de liberación	16
3.	Resultados	17
3.1.	Etapas I y II	18
3.2.	Etapa III	23
3.3.	Etapa IV	26
4.	Discusiones	30
4.1.	Etapas I y II	30
4.2.	Etapa III	32
4.3.	Etapa IV	36
4.4.	Discusión General	42
5.	Conclusiones	45
6.	Bibliografía	46
7.	Anexos	48
7.1.	Recetas de <i>buffer</i> isotérmico 5X y Master Mix 2X	48
7.2.	Protocolos de obtención y transformación de células quimiocompetentes	48
7.3.	Recetas de medios de cultivo y <i>buffers</i> para proteínas	49
7.3.1.	Medio M9-CAGlu	49

7.3.2. Medio TB	50
7.3.3. PBS	50
7.3.4. Fosfato-acetato 10X	50
7.4. Protocolo de tratamiento con tripsina	51
7.5. Tratamiento con <i>BugBuster</i> ®	51
7.6. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las variantes generadas.....	51
7.7. Heurística para la inclusión de significancia estadística en curvas de liberación	54

1. Introducción

1.1. Motivación

Gracias al descubrimiento de nuevos organismos y al avance de técnicas para analizar material genético y su proteómica asociada, constantemente se identifican nuevas proteínas con una amplia gama de aplicaciones. Dentro de los rubros en que éstas son utilizadas se encuentran el terapéutico, cosmético e industrial, por lo que están sujetas a una alta demanda. Sin embargo, su utilización está acotada por su principal barrera de entrada al mercado: un elevado costo de producción, debido principalmente a los rendimientos alcanzados y los niveles de purificación requeridos en sus procesos de obtención.

La extracción de estas proteínas desde su fuente de origen tiene usualmente bajos rendimientos, tanto por los niveles de expresión que se alcanzan como por la dificultad que implica el trabajo con un organismo del que no se tiene mayor información o experiencia previa. Por este motivo se desarrolló la síntesis heteróloga, donde se sobreexpresa una proteína de interés cuyo gen respectivo se introduce en un hospedero bien caracterizado. Hoy en día la mejor alternativa de producción a gran escala cuando no se requieren modificaciones postraduccionales complejas sigue siendo la bacteriana, que ha evolucionado para reducir sus costos asociados.

La purificación del producto obtenido no siempre es necesaria a nivel industrial, pero en la mayoría de los casos se lleva a cabo por una de dos razones. En primer lugar, aplicaciones como las médicas requieren un control estricto de los componentes utilizados, por lo que la proteína recombinante debe encontrarse libre de cualquier otro elemento que pueda provenir de la bacteria hospedera, denominados contaminantes. En el segundo, la presencia de estos contaminantes podría interferir con la acción deseada o incluso tener un efecto inverso, por lo que se purifica como medida de precaución. A nivel de caracterización este procesamiento es requerido para minimizar la presencia de cualquier elemento que pueda interferir con las técnicas aplicadas o distorsionar sus resultados.

Las técnicas de purificación existentes son variadas y poseen distintos grados de especificidad, basándose en diferentes principios y propiedades de las proteínas. Sin

embargo, en todos los casos existe la contraposición de dos factores: rendimiento y pureza. El primero se refiere a la cantidad de proteína recuperada después del procedimiento respecto al total inicial de la misma; el segundo indica qué fracción de las proteínas presentes en la muestra procesada corresponde a la que se busca aislar. Generalmente, a medida que se aumenta la pureza el rendimiento disminuye, puesto que inevitablemente se pierde proteína al pasar por procesos de separación que no son ideales. El costo de realizar operaciones de purificación es directamente proporcional a la complejidad de la muestra tratada y al nivel de pureza requerido, por lo que usualmente tienen una fuerte repercusión sobre el precio del producto final, considerando que además disminuyen la cantidad de proteína comercializable. A causa de esto, se busca trabajar con procesos que optimicen la aplicación de estas técnicas.

Las primeras proteínas heterólogas sintetizadas en bacterias formaban cuerpos de inclusión citoplasmáticos, requiriendo de un intenso proceso de renaturación donde se solubilizan y luego pliegan correctamente para recuperar su funcionalidad. Su separación previa a este procesamiento es relativamente sencilla dada su baja solubilidad, pero de todos modos necesita de la ruptura celular y la aplicación de al menos una técnica de purificación. A pesar de tener rendimientos elevados, el nivel de procesamiento requerido desemboca en un producto final de alto costo.

La solución inicial a este problema fue la utilización de ciertos dominios, provenientes de proteínas específicas, que permiten una expresión soluble en el citoplasma. Son añadidos a nivel de ADN en uno de los extremos de la proteína heteróloga y en gran parte de los casos se hace necesaria su remoción antes de comercializarla, implicando una primera etapa de procesamiento. Dada su localización intracelular se requiere lisar las células para recuperar la proteína de interés; además, sus propiedades generalmente no tienen una diferencia considerable respecto a las proteínas del hospedero (como ocurre con los cuerpos de inclusión), por lo que el proceso de purificación se vuelve complejo. Por estas razones el nivel de procesamiento global no alcanza una disminución drástica respecto a la alternativa anterior.

La siguiente propuesta fue la secreción constitutiva al medio extracelular de las proteínas recombinantes. Aunque existen desechos celulares en el sobrenadante de un cultivo, son mucho menores en número comparados con los del interior de una bacteria

completa, por lo que con esta modificación no sólo se evita la ruptura celular, sino que también se disminuyen considerablemente los requerimientos de purificación. Su problema principal es la dilución del producto obtenido causada por la diferencia de volumen entre células y medio de cultivo, lo que implica en este caso la inclusión de etapas de concentración. A pesar de esto, se logra una disminución considerable del procesamiento global respecto al trabajo con cuerpos de inclusión.

Actualmente se utilizan las tres metodologías mencionadas, seleccionando en cada caso la que mejor desempeño tiene respecto a la proteína de interés específica. En el afán de seguir aumentando la eficiencia del proceso e idealmente desarrollar una plataforma que sirva para todas las proteínas recombinantes por igual, este trabajo significa el primer paso hacia un sistema bacteriano de expresión heteróloga con secreción inducible. Esto quiere decir que las proteínas permanecerán asociadas a la célula hasta que se active su liberación hacia el sobrenadante mediante un cambio efectuado por el usuario sobre una variable operacional determinada. De esta manera se podría manejar la localización durante el proceso productivo si se cumple que la liberación sea inactiva mientras la variable de control corresponda al valor necesario para el crecimiento y/o la expresión.

La capacidad de controlar la localización de la proteína de interés se puede aprovechar para reducir los requerimientos de purificación y concentración posterior a la síntesis. Una vez que el nivel de producción se considere suficiente las células se pueden cambiar de medio, pasando de uno saturado de contaminantes a otro prácticamente libre de ellos. Si en este nuevo medio se activa la liberación, se generaría un sobrenadante donde el principal componente es la proteína de interés. Utilizando para esto un volumen menor al de cultivo, dicho sobrenadante sería más concentrado que el obtenido del sistema con secreción constitutiva, además de tener una mayor pureza. Esto no implica que se podrá prescindir por completo de técnicas de purificación, pero se espera que reduzca el número de etapas requeridas y/o su complejidad para disminuir así sus costos de producción asociados. Es necesario entonces definir los elementos proteicos que compondrán la plataforma de expresión y la variable que se utilizará para el control de la secreción, lo que se desarrolla en la siguiente sección.

1.2. Marco Teórico

Una alternativa atractiva como base para el sistema propuesto son las proteínas autotransportadoras (AT), provenientes de bacterias Gram-negativas y caracterizadas por contener en su secuencia toda la información necesaria para localizarse en la membrana externa. El proceso de transporte es mediado por complejos proteicos expresados constitutivamente, por lo que no requiere sintetizar proteínas adicionales para ser llevado a cabo. Las AT se traducen inicialmente como una preproteína con tres dominios característicos (de extremo amino a carboxilo): péptido señal (PS), dominio pasajero (DP) y unidad de translocación (UT)^{[1]-[3]}.

El péptido señal cumple con la función de dirigir a la preproteína hacia la membrana citoplasmática, donde activa su translocación hacia el periplasma a través de la vía Sec. Típicamente están compuestos de alrededor de 30 aminoácidos y su secuencia cumple con las características usuales para activar dicha vía: una región N-terminal con carga positiva denominada “N”, luego una región hidrofóbica “H” y finalmente una región “C” con un sitio de reconocimiento para una señal-peptidasa, la que remueve el PS una vez que la translocación ha terminado^{[1],[3]}. Algunas AT poseen una secuencia extendida en el extremo amino con una segunda región N y H, lo que se cree ralentiza el transporte hacia el periplasma para evitar una acumulación de proteína mal plegada^{[3],[4]}.

El dominio pasajero o subunidad α corresponde al extremo amino de la proteína madura. Es la región menos conservada dentro de las AT tanto en largo como en secuencia, lo que se relaciona probablemente con la variedad de funciones que puede presentar^[3]; éstas se asocian usualmente con factores de virulencia como, por ejemplo, agregación, adherencia y formación de *biofilm*^[2]. Sin embargo, su estructura terciaria corresponde generalmente a una hélice β que puede tener motivos funcionales insertos en sus *loops*, lo que se descubrió en base a cristalografía de rayos X y predicciones bioinformáticas^{[2],[3]}.

La unidad de translocación o subunidad β se encuentra en el extremo carboxilo de las AT y se inserta en la membrana externa por medio de la maquinaria de ensamble de barriles β (Bam)^{[3],[5]}; ahí forma un barril β que funciona como un poro por donde el dominio pasajero es capaz de atravesar para quedar expuesto hacia el medio extracelular. Su estructura terciaria, análoga a la de las porinas, está compuesta generalmente por 12

hojas β anfipáticas en una conformación antiparalela y fue confirmada de la misma manera que la del DP. Su secuencia es altamente conservada entre AT y posee un motivo de consenso en el extremo carboxilo necesario para su correcta localización^{[1]-[3]}.

Algunas autotransportadoras permanecen intactas como una gran proteína con dos dominios, mientras que otras son procesadas mediante el corte del enlace peptídico que une el DP con su UT respectiva, ya sea en simultáneo con la translocación o una vez que se ha completado^{[1]-[3]}. El procesamiento puede ser catalizado por proteasas de membrana externa independientes, otras AT o incluso la proteína misma en eventos de proteólisis inter o intramoleculares^[3]. Posteriormente, la subunidad α puede ser secretada instantáneamente al medio extracelular o permanecer asociada a la superficie bacteriana a través de interacciones no covalentes con la subunidad β , disociándose eventualmente en algunos casos. Una esquematización de las etapas de biogénesis de las AT se muestra en la Figura 1.

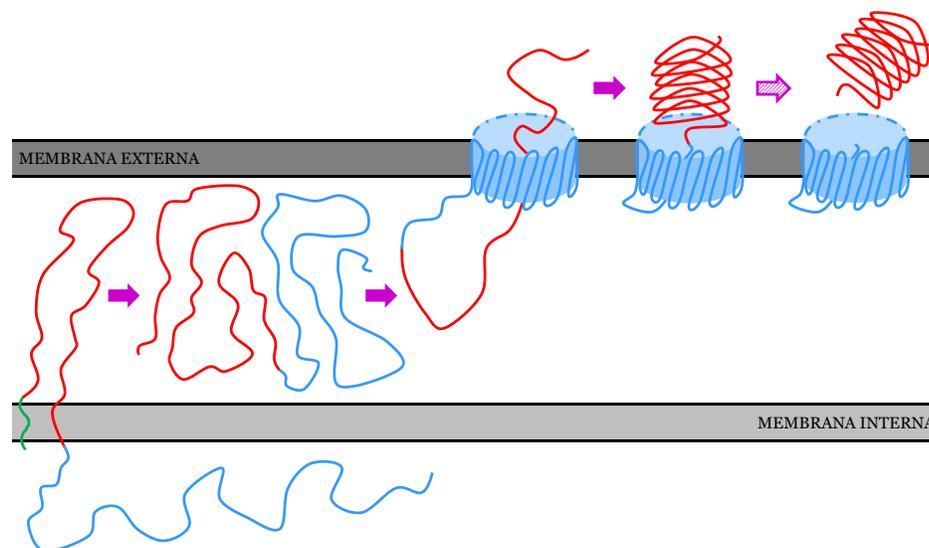


Figura 1: Esquematización sencilla de los pasos que se llevan a cabo en la biogénesis de una proteína autotransportadora. Péptido señal en verde, dominio pasajero en rojo y unidad de translocación en azul. El corte entre dominios y la liberación del DP no ocurre en todas las AT.

En este trabajo se denomina liberación al conjunto de los fenómenos de corte y disociación, que podrían ser explotados para lograr una secreción inducible. Una de las AT en que esto ocurre es el antígeno 43 (Ag43) de *Escherichia coli* K12. La especie a la que pertenece esta cepa corresponde a la bacteria mejor caracterizada en literatura y la hospedera más utilizada para expresión heteróloga, por lo que el desarrollo del sistema de síntesis a partir de elementos que provienen de *E. coli* aumenta la probabilidad de un

correcto funcionamiento. Ag43 se sintetiza como una preproteína de 1.039 aminoácidos, cuya secuencia se utiliza como referencia al indicar posición de residuos en la proteína madura. Posee los tres dominios característicos de las AT y se expresa con un alto número de copias por célula (~50.000), distribuyéndose uniformemente en toda su superficie^{[2],[6],[7]}.

El PS de Ag43 consta de 52 aminoácidos y su UT de 488, los que se organizarían tridimensionalmente en un barril de 18 hojas β antiparalelas de acuerdo con predicciones bioinformáticas^[6]. La agregación celular es la principal función del DP, que consta de 499 residuos con una conformación predicha de hélice β entre las posiciones 53 y 450^[2]. El sitio de reconocimiento para el corte se ubica entre los residuos D551 y P552, procesamiento que resulta de un evento autoproteolítico según lo indicado por la evidencia existente: al expresar la proteína en cepas de *E. coli* sin sus principales proteasas de membrana externa, OmpT y OmpP, el corte dentro de Ag43 se produjo al igual que cuando se utilizó una cepa que sí las poseía^[6]. A pesar de que no se conocen con seguridad los aminoácidos responsables de la catálisis, entre las posiciones 384 y 398 se identifica un motivo aspartil-proteasa^{[1],[2],[4],[6]–[8]} del tipo asociado con autoprosesamiento de precursores poliproteicos retrovirales^{[1],[6]}, lo que apoya la hipótesis de autoproteólisis. Este tipo de proteasas posee generalmente óptimos de actividad en medios ácidos.^{[9]–[12]}

El antígeno 43 ha sido ampliamente utilizado como sistema de secreción para proteínas recombinantes mediante la inserción de secuencias heterólogas que reemplazan total o parcialmente a los codones del DP, conservando los nativos del PS y la UT. Se han reportado una serie de ventajas relacionadas con su utilización^[7]: mantención de su plegamiento, localización y procesamiento cuando se expresan proteínas quiméricas y también en un amplio rango de hospederos Gram-negativos^[2]; capacidad de translocar proteínas plegadas^[4], incluso con puentes disulfuro^[13] y cadenas más largas que su DP nativo^[14]; capacidad de exhibir dominios proteicos funcionales completos; y expresión con alto número de copias mantenida para quimeras y en hospederos distintos a *E. coli*. Por estas razones Ag43 se selecciona como la base para el sistema de expresión propuesto.

Se pueden lograr distintos objetivos de secreción al momento de expresar la proteína quimérica generada cambiando el segmento del DP que se conserva. La Figura 2 presenta una esquematización de la secuencia primaria de Ag43 nativa junto a las proteínas

nquiméricas utilizadas en los casos descritos a continuación. En trabajos previos, al reemplazar por completo la secuencia del DP con la secuencia heteróloga se obtiene una proteína anclada covalentemente a la membrana externa (BglC^[4], EGFP^[15]), lo que prueba que existen aminoácidos en la subunidad α involucrados con el procesamiento de Ag43.

En otras investigaciones se situó la secuencia heteróloga antes del aminoácido 200, ya sea interrumpiendo al DP o eliminando su extremo amino. De esta forma se obtuvieron proteínas asociadas de manera no covalente a la UT (ENDe, Fce3, fimH), como ocurre en Ag43 nativa. Al calentar las células inducidas a 60°C por 10 minutos, la subunidad α quimérica se liberó al sobrenadante^{[7],[14],[16]}, lo que corrobora tanto el corte entre dominios como su asociación no covalente. Además, se puede concluir que el sitio catalítico no se encuentra antes de la posición 200.

En otra fuente se reporta la siguiente quimera: la secuencia heteróloga en el extremo amino de la proteína, el sitio catalítico propuesto (15 aminoácidos) a continuación y luego el extremo carboxilo del DP desde el residuo 455. Al expresarla se obtiene una proteína secretada directamente al medio extracelular (Aly)^[8]. Este resultado sugiere que el procesamiento entre dominios se mantiene y, por lo tanto, la autoproteólisis efectivamente es causada por el motivo aspartil-proteasa o bien que los aminoácidos catalíticos deben localizarse después de la posición 455.

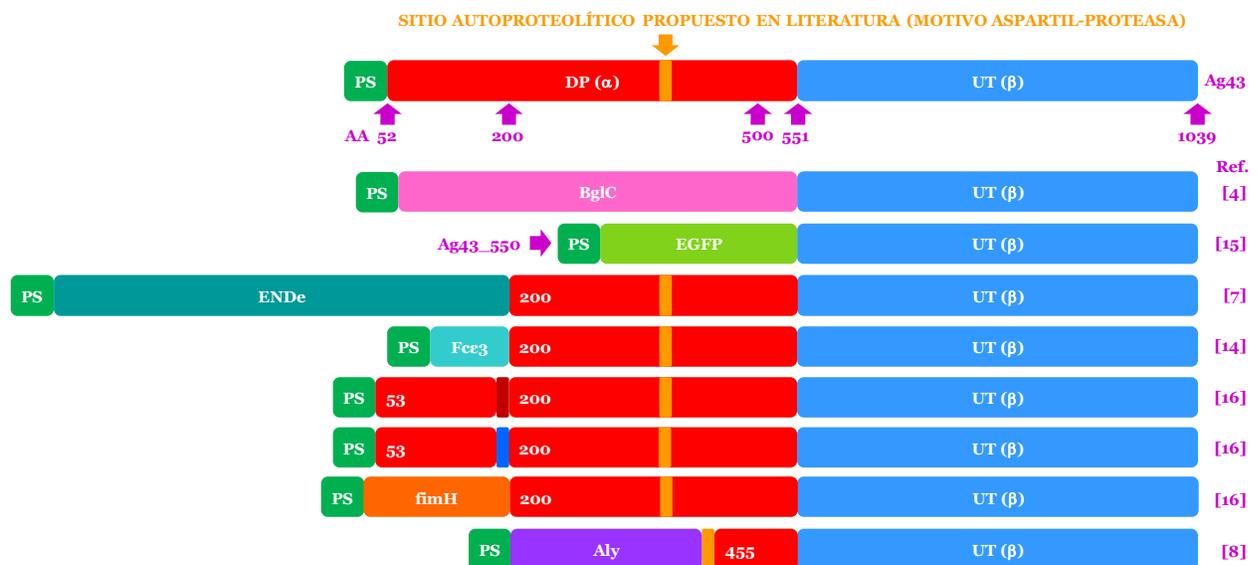


Figura 2: Esquematización a escala de la secuencia primaria de Ag43 nativa y de proteínas quiméricas basadas en Ag43 con distintos objetivos de secreción reportadas en literatura.

Los cambios en Ag43 mencionados previamente se relacionan con la alteración de su secuencia aminoacídica, pero este no es el único parámetro que se puede modificar para influir en su comportamiento. Temperatura, pH y fuerza iónica son algunas de las variables que afectan la capacidad de la proteína para establecer interacciones no covalentes tanto internamente como con otras moléculas, las que pueden incidir directamente en su funcionalidad; sus efectos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Influencia de las variables operacionales temperatura, pH y fuerza iónica sobre la estructura proteica y la actividad enzimática. ¹Disminución genera efecto contrario.

Variable	Efecto principal	Cambios conformacionales	Actividad
Temperatura (Aumento¹)	Vence interacciones no covalentes	Se puede perder la estructura tridimensional, lo que puede además disminuir la actividad si es necesaria funcionalmente	Aumenta la velocidad de reacción, pero se puede ver disminuida la interacción con el sustrato
pH (Aumento o disminución)	Cambia estado de protonación de cadenas laterales	Puede (des)favorecer las interacciones no covalentes involucradas en la estructura tridimensional	Puede (des)favorecer las interacciones no covalentes establecidas con el sustrato
Fuerza Iónica (Aumento)	Altera la hidratación e interacciones iónicas	Se puede perder la estructura tridimensional si se desplazan moléculas de H ₂ O necesarias para un plegamiento apropiado	Se puede perder la actividad si se bloquea el sitio activo o se “captura” al sustrato
Fuerza Iónica (Disminución)		Se puede perder la estructura tridimensional si faltan iones necesarios para un plegamiento apropiado	Se puede perder la actividad si faltan iones necesarios como cofactores

Respecto a Ag43 en específico, al aumentar la temperatura se podría elevar su tasa de corte a la vez que se reduce la interacción entre DP y UT, mejorando la liberación por partida doble. El efecto del pH es incierto, pero considerando el mecanismo del sitio activo propuesto un aumento de la acidez produciría también un incremento de la actividad proteolítica^[17], lo que se podría traducir en una mayor tasa de liberación. Respecto a la fuerza iónica, no se maneja información suficiente que permita predecir su efecto sobre la

proteína; sin embargo, corresponde a una variable operacional controlable, por lo que se presenta como candidata para la inducción de la secreción junto a temperatura y pH.

En la revisión de trabajos previos con Ag43 se encontró la aplicación de calor como herramienta para liberar el DP hacia el medio, pero desde el punto de vista industrial no es una opción atractiva por el alto gasto energético que implica. Dado que respecto a la disminución del pH se tiene un escenario predicho y su utilización se avala por los bajos costos asociados de los insumos que requiere, se selecciona como la variable de control a estudiar.

Con información respecto a la localización del sitio activo y el comportamiento en función del pH es posible definir el segmento mínimo del DP que se debe incluir en el sistema, sirviendo además como base para eventualmente someter a Ag43 a Ingeniería de Proteínas. Esta disciplina busca introducir mutaciones puntuales en la secuencia primaria, dirigidas o al azar, para alterar el comportamiento original con un fin específico como aumentar su estabilidad estructural, desplazar su temperatura o pH óptimos de actividad o su afinidad por sustratos o cofactores. La información respecto al pH en específico se utiliza para analizar la influencia que puedan tener en el comportamiento estudiado los residuos con cadenas laterales que cambien de estado de protonación. El objetivo de esto es evaluar el efecto de reemplazarlos y por cuál aminoácido hacerlo.

1.3. Objetivos

En base a la motivación planteada y considerando la información expuesta en el marco teórico, para este trabajo el objetivo general consiste en estudiar la actividad autoproteolítica del antígeno 43 de *Escherichia coli* K12, enfocándose en su aplicación dentro de un sistema de expresión de proteínas recombinantes con secreción inducible por pH. Para desarrollarlo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar variantes de la proteína nativa que permitan identificar la zona del dominio pasajero donde se encuentran los aminoácidos catalíticos.
2. Obtener las variantes diseñadas correctamente plegadas y localizadas en células funcionales de *E. coli*.
3. Identificar la zona del dominio pasajero donde se encuentran los aminoácidos catalíticos y corroborar si ésta coincide con la del sitio autoproteolítico propuesto en literatura.
4. Caracterizar la liberación del dominio pasajero en el tiempo a distintos valores de pH en el rango ácido, partiendo desde el óptimo de cultivo.

Además, se formuló la siguiente hipótesis: “el sitio autoproteolítico de Ag43 corresponde al propuesto en literatura y en consecuencia la liberación aumentará a medida que se acidifica el pH producto de una mayor actividad proteolítica”. Este estudio busca corroborar la participación de dicho sitio en la autoproteólisis de Ag43 y en caso de ser refutada, encontrar información acerca de la localización de aquellos aminoácidos efectivamente responsables del corte. No es objetivo de este trabajo identificarlos, dado que es una primera aproximación al tema en que no se buscan respuestas exactas, sino una idea general del comportamiento del mecanismo.

2. Metodología

Las especificaciones con que se llevaron a cabo las técnicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo se detallan a lo largo de este capítulo, dividido en secciones respectivas a cada una de ellas.

2.1. Técnicas de Biología Molecular

2.1.1. Diseño de partidores

Los partidores utilizados fueron diseñados con la ayuda del programa “*Primer design tool for Gibson Assembly*”^[18], el que toma en cuenta ciertas restricciones respecto a su T_m para asegurar un buen desempeño. Las denominaciones para cada partidador junto con su secuencia respectiva se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Partidores utilizados. Sentido indica la hebra del templado con la que el partidador alinea: F con 5'-3' (forward) y R con 3'-5' (reverse). Secuencias subrayadas corresponden a sitios de restricción. Secuencia en color es común entre partidores.

#	Denominación (Sentido)	Secuencia (De 5' a 3')
1	NdeI_Ag43 (F)	ATCACATATGAAACGACATCTGAATACC
2	Ag43_XhoI (R)	GTACCTCGAGTCAGAAGGTCACATTCAGTG
3	SP_EGFP (F)	CTCCCGGTGCTGGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
4	EGFP (R)	CTTGTAGAGCTCGTCCATGCC
5	EGFP_Ag43wt (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGGCTGACATCGTTGTGCACCCG
6	EGFP_Ag43_200 (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGGGTGATACCGGGCAGTTTGTTCCG
7	EGFP_Ag43_250 (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGACGCTGAATGGGGGATAACCAGTATG
8	EGFP_Ag43_300 (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGGGTACAGCCACGAATGTCACCCT
9	EGFP_Ag43_350 (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGGTGCTGACCGGACACACAGC
10	EGFP_Ag43_400 (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGGACGGAAAGGCATTTCAGTATCGGAG
11	EGFP_Ag43_450 (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGACCACCACGCTGAATAACGGCG
12	EGFP_Ag43_500 (F)	ATGGACGAGCTCTACAAGACTGTCAGCAACACCACACTCACC
13	SP (R)	AGCCAGCACCGGGAGTGACG

2.1.2. Extracción de ADN plasmídico

La extracción se realizó a través del kit para Miniprep con columnas de centrifugación “*GeneJET Plasmid Miniprep Kit*” marca *Thermo Fisher*. El protocolo se siguió acorde a las indicaciones del fabricante^[19] a excepción del último paso, eluyendo

con agua destilada libre de nucleasas en lugar del *buffer* de elusión provisto. El total de los plásmidos generados en el trabajo se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3: Plásmidos generados. Elementos que aparecen en la primera fila corresponden a la secuencia nucleotídica respectiva de cada dominio proteico. ¹Moléculas lineales con colas de complementariedad para EGFP. ²Moléculas lineales con colas de complementariedad entre sus extremos. ³Largo del DP asociado varía acorde al identificador (*wt* - 500).

Plásmido	PS	EGFP	DP	UT
pAg43	+	-	+	+
pAg43_wt/200(l)^{1,3}	+	-	+	+
pAg43_250 - 500(l)^{2,3}	+	+	+	+
pAg43_wt - 500(c)³	+	+	+	+

2.1.3. Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

Para las PCR se empleó una ADN polimerasa de alta fidelidad, ya sea su presentación comercial *Phusion*® marca *NEB* o una análoga de producción propia del laboratorio. Los parámetros con que se llevaron a cabo las reacciones se presentan en la Tabla 4. Una vez terminadas, el producto obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (1%) y posteriormente recuperado utilizando el kit de extracción desde gel “*GeneJET PCR Purification Kit*” marca *Thermo Fisher*. Nuevamente, el protocolo se siguió acorde a las indicaciones del fabricante^[20] a excepción del último paso, en que se eluyó el ADN con agua destilada libre de nucleasas en lugar del *buffer* de elusión provisto.

Tabla 4: Parámetros empleados para PCR. La primera fila indica el producto obtenido. Condiciones de termociclado restantes y concentración de componentes de acuerdo a lo indicado por el fabricante considerando adición de DMSO^[21]. Número de partidores según lo indicado en la Tabla 2. ¹En vez de obtener pAg43_450(l), se obtuvo pAg43_450*(l) (Anexo 7.6).

PCR	Ag43	EGFP	pAg43_wt/200(l)	pAg43_250 - 500(l) ¹
Templado	pGEM-T + Ag43	pscAAV + EGFP	pAg43	pAg43_wt
Partidor F	1	3	5/6	7-12
Partidor R	2	4	13	
Temperatura de alineamiento [°C]	55			
Tiempo de elongación [s]	60	15	150	270
Ciclos	35			

2.1.4. Digestión con enzimas de restricción y Ligación

Las digestiones realizadas se llevaron a cabo por una hora a 37°C utilizando enzimas y *buffers* marca *NEB*; las especificaciones de cada reacción se encuentran en la Tabla 5. Independiente de las unidades de enzima y de la cantidad de digestiones a realizar, en todos los casos se agregó 1 µl de enzima a la mezcla total preparada. En caso de requerir una ligación posterior, los productos de la digestión se purificaron de la misma manera que los de PCR. Para la reacción se utilizó ligasa T4 y se siguió el protocolo de clonamiento general para extremos cohesivos indicado por el fabricante, *Invitrogen*^[22].

Tabla 5: Digestiones realizadas con enzimas de restricción. ¹Variante de pAg43_450(c).

Vector/Templado	Enzimas de restricción			Ligación
	NdeI	XhoI	SacI	
Ag43 (producto de PCR)	+	+	-	+
pET22	+	+	-	
pAg43	+	+	-	-
pAg43_wt - 500(c)	+	+	-	-
	-	+	+	-
pAg43_450*(c) ¹	-	-	+	+

2.1.5. Gibson Assembly

La técnica del *Gibson Assembly* se utilizó para unir los fragmentos pAg43_wt/200(l) con EGFP y posteriormente para circularizar los fragmentos pAg43_250-500(l) (Tabla 3). Para llevarlo a cabo se emplearon las enzimas T5 Exonucleasa, *Phusion*® y Taq Ligasa; todas marca *NEB*. El protocolo seguido fue acorde a lo indicado por el fabricante de las enzimas para unir 2-3 fragmentos^[23], donde el “*Master Mix 2X*” indicado corresponde a una mezcla de las enzimas en un *buffer* específico, denominado “isotérmico”. Tanto el *Master Mix* como el *buffer* isotérmico fueron preparados a partir de sus componentes por separado de acuerdo con el protocolo incluido en el Anexo 7.1.

2.1.6. Transformación de células quimiocompetentes

Se utilizaron dos cepas distintas de *E. coli* para ser transformadas: TOP 10 para almacenar vectores y Rosetta™ 2(DE3) para expresar las construcciones. Este paso se realiza inmediatamente después de terminar una ligación o *Gibson Assembly*. Una vez

que la transformación ha terminado, se elige un clon para inocular un cultivo líquido en medio *Luria Broth* (LB) con los antibióticos necesarios, a partir del cual se prepara un *stock* de glicerol al 16% donde se preservan las células a -80°C . Los protocolos utilizados para obtener células quimiocompetentes y posteriormente transformarlas se encuentran en el Anexo 7.2.

2.2. Técnicas de Proteínas

2.2.1. Cultivo e inducción

A partir del *stock* de glicerol correspondiente, se inicia el cultivo de células transformadas con los vectores generados con un preinóculo *overnight*, desde el cual se inocula un tubo o matraz con medio fresco. Una vez que la OD_{600} del inóculo supera un valor de 0,6, alrededor de las tres horas, se induce el cultivo añadiendo IPTG. Al finalizar el tiempo de inducción el volumen completo se centrifuga a 4°C y 5000 rpm por 7 minutos; luego se descarta el sobrenadante, se resuspende el *pellet* en *buffer* fosfato salino (PBS) y se almacena a 4°C , a menos que se utilice de inmediato en otro procedimiento. A los medios utilizados se les deben agregar los antibióticos carbenicilina (carb) y cloranfenicol (cam) a concentraciones finales de 100 y 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente. Los parámetros utilizados para el cultivo e inducción se indican en la Tabla 6 y las recetas para la preparación de los medios y *buffers* requeridos se encuentran en el Anexo 7.3.

Tabla 6: Parámetros para cultivo e inducción de las construcciones generadas.

Destino/Uso	SDS-PAGE	Curvas de liberación
Medio del preinóculo	LB	TB
Volumen del preinóculo	5 ml	
Volumen de inoculación	μl necesarios para una OD_{600} del inóculo de 0,05	5 ml (total)
Medio del inóculo	M9 suplementado con casaminoácidos y glucosa (M9-CAglu)	Terrific Broth (TB)
Volumen del inóculo	5 ml	100 ml
Incubación para crecimiento	37°C y 200 rpm	
Concentración final de IPTG en el medio	1 mM	0,1 mM
Incubación para inducción	20°C y 200 rpm	
Tiempo de inducción	23 h	20 h

Los controles de localización celular se cultivaron e indujeron con el protocolo usado regularmente para su expresión: preinóculo *overnight* de LB e inóculo de medio auto-inductivo incubado a 25°C y 200 rpm por 18 horas, ambos con ampicilina (amp) a 100 µg/ml.

2.2.2.Tratamiento con tripsina

El tratamiento con tripsina se realiza incubando a 37°C células resuspendidas en PBS por 10 minutos con una concentración final de tripsina de 125 mg/l. Al finalizar el tiempo se separa el sobrenadante de las células por centrifugación y se resuspende el pellet en un volumen igual al de la muestra. Al terminar ambos se miden con un factor de dilución de 1/10 en un fluorímetro, usando el par de filtros 485-538 para EGFP. El protocolo del tratamiento en detalle se recoge en el Anexo o.

2.2.3.Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la SDS-PAGE las muestras deben ser preparadas antes de ser cargadas. A partir de la resuspensión almacenada a 4°C, indicada en la sección 2.2.1, las proteínas quiméricas se tratan con *Bugbuster*® y los controles se diluyen con un factor de 1/2 usando *buffer* de carga denaturante. Luego todas se calientan a 100°C por 10 minutos y, junto al marcador de peso molecular “*Pierce*™ *Prestained Protein MW Marker*” de *Thermo Scientific*, se cargan 10 µl de cada una en un gel de 12,5%. A éste se le aplican 200 V por 45 minutos sumergido en *buffer* de corrida y después se tiñe con Azul de Coomassie acorde al protocolo estándar. Los detalles del tratamiento se encuentran en el Anexo 7.5.

2.2.4. Curvas de liberación

La elaboración de curvas de liberación corresponde al único protocolo diseñado específicamente para este trabajo. Su punto de partida es el cultivo de cada variante por separado, realizado acorde a lo señalado en 2.2.1. Antes de empezar, es necesario preparar un *buffer* fosfato-acetato 10X que se divide en cuatro partes iguales a las que se les ajusta el pH a 7, 6, 5 y 4. Una vez que han sido esterilizados en autoclave, los pasos a seguir son:

1. Se preparan *buffers* 1X, mezclando una parte del *buffer* 10X respectivo con nueve partes de agua desionizada sin autoclavar. Se cargan 100 μ l de cada *buffer* en una placa para fluorímetro que servirán como blanco.
2. El cultivo se divide en cuatro partes iguales, denominadas fracciones, que se centrifugan a 5000 rpm por 7 minutos. Al terminar se descarta el sobrenadante.
3. El pellet de cada fracción se resuspende con un *buffer* a distinto pH utilizando un volumen igual al de medio que fue centrifugado.
4. Se toman tres muestras de 1 ml desde cada fracción y se centrifugan a 8.000 rpm por 1 minuto.
5. Desde cada muestra se cargan 100 μ l del sobrenadante a la placa y el resto se descarta.
6. El pellet de la muestra se resuspende en 1 ml del *buffer* respectivo a cada fracción y luego se cargan 100 μ l desde la resuspensión a la placa. El resto se descarta.
7. Se mide la fluorescencia de blancos, sobrenadantes y células en el fluorímetro.
8. Se repiten los pasos 4-7 cada 20 minutos hasta completar 100 minutos. Al terminar el tiempo las fracciones se descartan.

Durante los 100 minutos las fracciones se incuban a 37°C y 100 rpm, retirándose sólo para muestrear. El tiempo cero se considera cuando las fracciones se ponen a incubar luego de la primera toma de muestras. Una vez que todos los datos han sido registrados, se hace una conversión hacia fluorescencia a pH 7 para hacerlos comparables.

La configuración utilizada en el fluorímetro para medir a EGFP es la misma que se utiliza al finalizar el tratamiento con tripsina (2.2.2); la receta para el *buffer* fosfato-acetato 10X está registrada en el Anexo 7.3.

3. Resultados

De acuerdo con el primer objetivo específico, fue necesario diseñar un conjunto de variantes de la proteína Ag43 nativa con utilidad para corroborar la hipótesis planteada respecto al sitio autoproteolítico propuesto en literatura. Se buscó incluir un dominio reportero que permitiera una cuantificación rápida y sencilla de la expresión, además de una metodología eficiente para generar las construcciones mediante herramientas de biología molecular. Considerando estos criterios, se decidió utilizar la técnica del *Gibson Assembly* para generar ocho variantes, contenidas en vectores de expresión inducible por IPTG, con los siguientes elementos:

- Dominio reportero situado en el extremo amino de la proteína quimérica madura correspondiente a *enhanced green fluorescent protein* (EGFP).
- Péptido señal y unidad de translocación nativos intactos.
- Diferentes segmentos del dominio pasajero contenidos entre EGFP y UT.

En la Figura 3 se muestra una esquematización de las variantes diseñadas. La primera, Ag43_wt, contiene al DP completo; el resto consta de una serie de segmentos cuyo inicio varía, con diferencias de 50 aminoácidos, entre los residuos 200 y 500 de la secuencia peptídica. Todos abarcan hasta la posición 551 y de acuerdo a su punto de partida se denomina Ag43_200 - 500 a las quimeras respectivas. Es importante notar que el motivo aspartil-proteasa es eliminado por completo al pasar de Ag43_350 a 400, sin verse interrumpido en ningún caso. Se espera que las variantes diseñadas permitan definir en qué zona del DP se pueden encontrar residuos que participen en la autoproteólisis, puesto que las variantes donde los aminoácidos catalíticos hayan sido eliminados no debiesen exhibir corte ni disociación.

EGFP se encuentra asociada covalentemente al DP, por lo que su fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de proteína quimérica en una razón estequiométrica de 1:1. Dado que se sitúa en el extremo amino, en caso de haber liberación del DP se espera que la fluorescencia se desplace desde la membrana externa hacia el medio extracelular. Utilizando un fluorímetro se hacen mediciones por separado del *pellet* de células inducidas y de su sobrenadante, con el fin de registrar el nivel de expresión de la quimera y la localización de su DP respectivo.

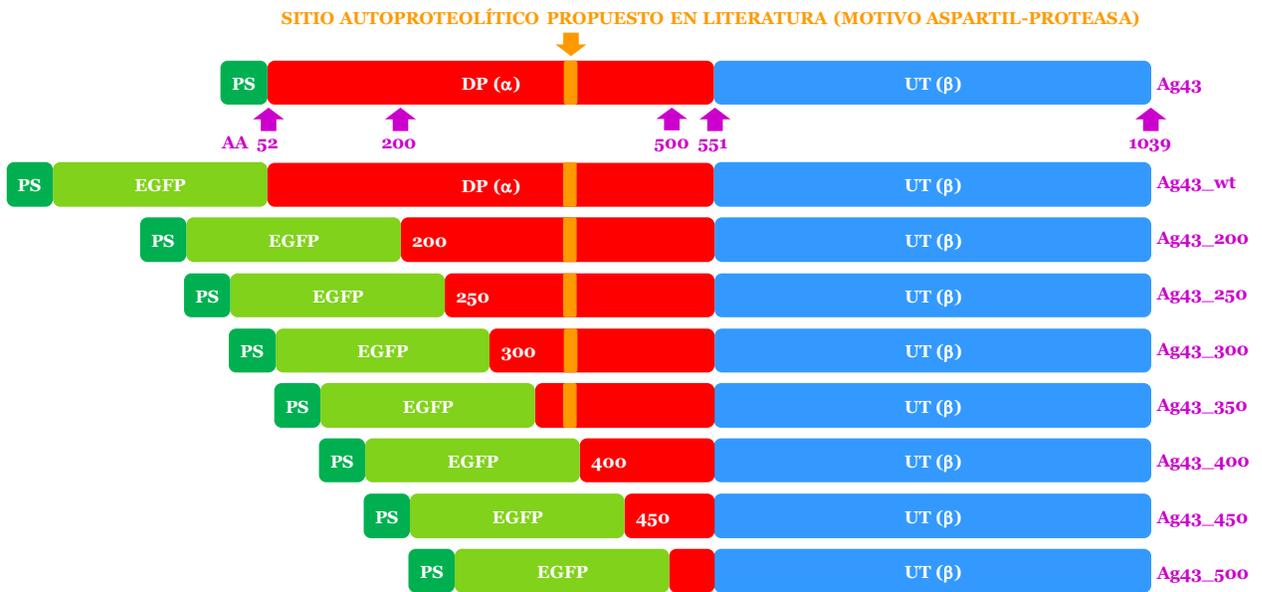


Figura 3: Esquemática a escala de las variantes diseñadas.

El trabajo práctico, resumido en la Figura 4, se divide en cuatro etapas principales:

- I) Inserción del gen nativo de Ag43 en un plásmido de expresión para su uso como templado.
- II) Generación de variantes de Ag43 con EGFP como elemento reportero y distintos segmentos del dominio pasajero.
- III) Expresión de proteínas quiméricas correctamente plegadas y localizadas para analizar el corte entre DP y UT.
- IV) Caracterización de la liberación del DP en función del tiempo a distintos valores de pH en el medio.



Figura 4: Etapas principales del trabajo experimental realizado.

3.1. Etapas I y II

Las primeras dos etapas están estrechamente relacionadas y abarcan la totalidad del trabajo en Biología Molecular. La Figura 5 representa una recopilación de todos los elementos obtenidos experimentalmente que formaron parte del proceso de construcción para generar las variantes diseñadas, mostrando las técnicas empleadas que los relacionan entre sí; la nomenclatura utilizada se plantea en la Tabla 3. A continuación, se muestran algunos resultados puntuales como ejemplo de las técnicas llevadas a cabo.

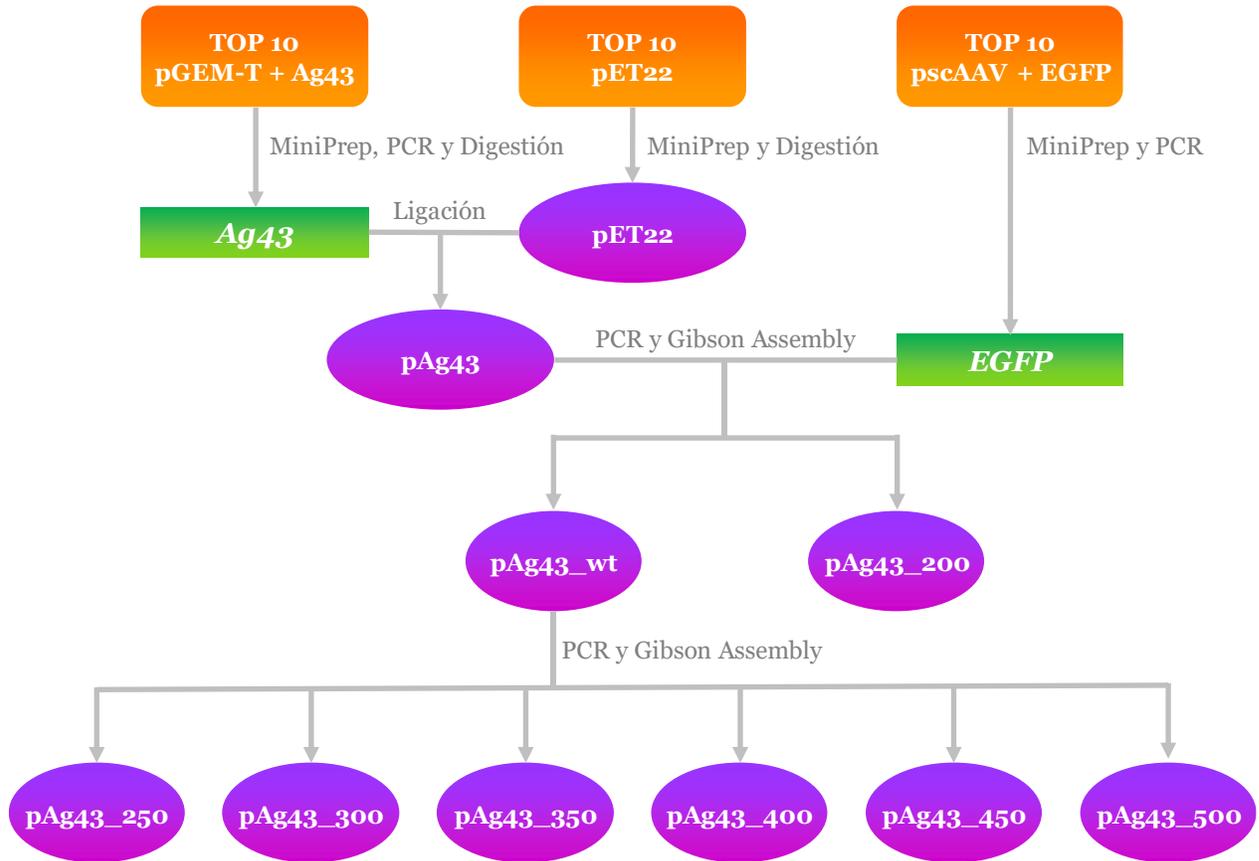


Figura 5: Hitos alcanzados en el trabajo de Biología Molecular. Cepas en naranja, genes en verde, plásmidos en morado y técnicas en gris.

Para obtener pAg43, objetivo de la etapa I, se trabajó con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. El gen de Ag43 fue amplificado con partidores que agregaron sitios de restricción para estas enzimas en los extremos del producto de PCR, los que ya se encuentran en el MCS de pET22. Una vez que se tiene el inserto en el vector, el nuevo plásmido sirve como templado para las PCR previas al *Gibson Assembly*, con las que se inicia la etapa II.

El plan original para obtener los fragmentos a ensamblar consistía en realizar, por un lado, una PCR de EGFP en que sólo al extremo 5' se le agrega una cola de complementariedad (CdeC), en este caso con el extremo 3' del péptido señal. Por otro lado, se hacen ocho PCR distintas en que el templado y el partidore *reverse* son comunes, pero el *forward* cambia para cada una, alineando en distintos puntos de la secuencia del DP y generando así los distintos segmentos necesitados. Nuevamente, sólo el extremo 5' tiene CdeC, esta vez con el extremo 3' de EGFP. La Figura 6 muestra una esquematización de la situación descrita.

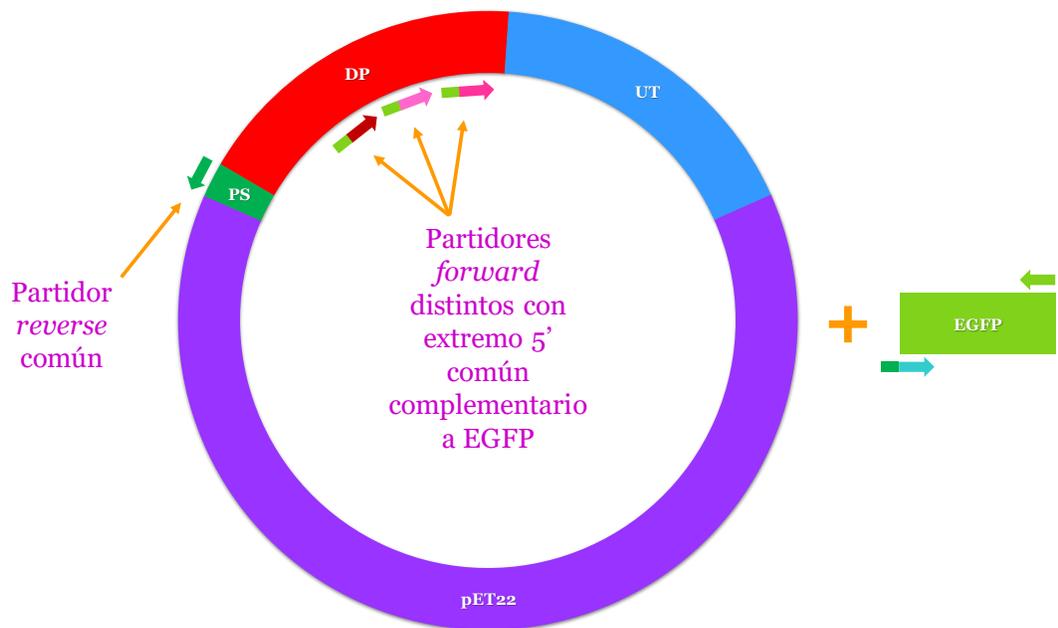


Figura 6: Esquemática del alineamiento de partidores con pAg43 como templado en la PCR del plan original para Gibson Assembly. Plásmido y gen están dibujados a escala a diferencia de los partidores, cuyo color indica su complementariedad.

Al llevar a cabo el plan original sólo se logró la amplificación de los fragmentos correspondientes a las dos primeras variantes, pAg43_wt(l) y pAg43_200(l), lo que se puede ver en la Figura 7. Se realizó el *Gibson Assembly* de estos fragmentos con EGFP, obtenida de una PCR paralela, y se seleccionó un ensamblaje correcto de cada variante mediante patrones de digestión; el procedimiento se ejemplifica en la Figura 8, donde B y C fueron seleccionados inicialmente, descartando luego al primero en base al resultado de su secuenciación.

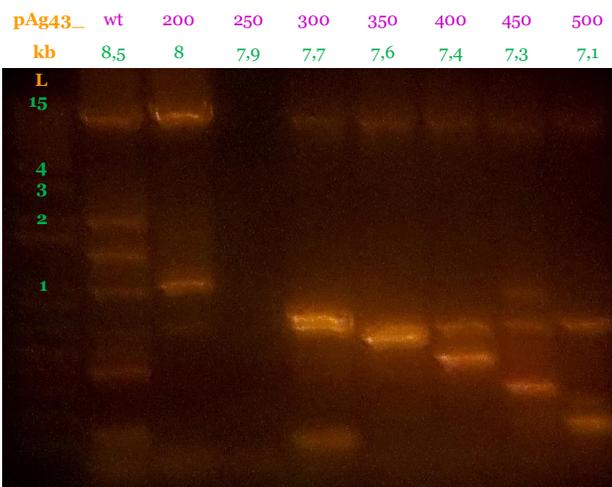


Figura 7: Electroforesis de productos de PCR realizadas de acuerdo con el plan original para Gibson Assembly, desde donde se purifican pAg43_wt(l) y pAg43_200(l).

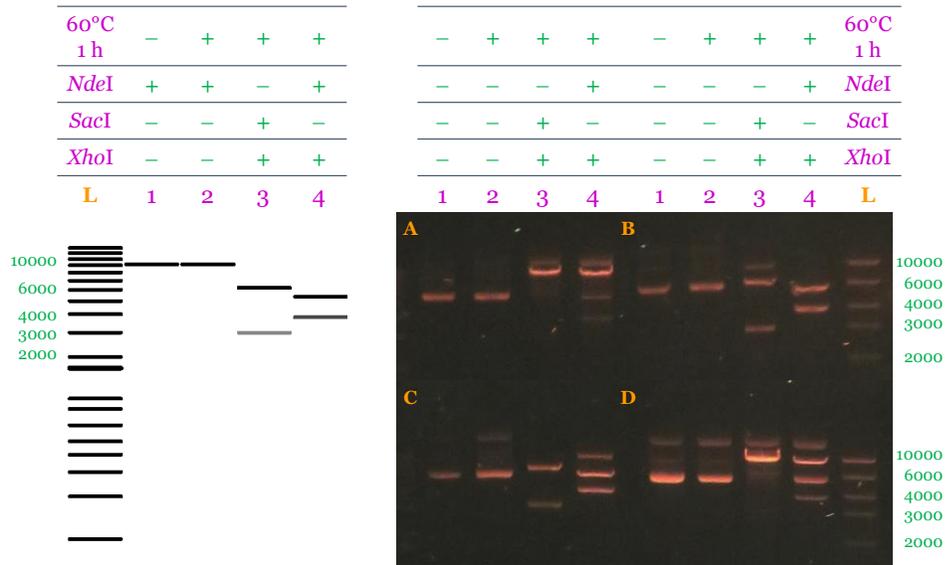


Figura 8: Patrones de digestión de pAg43_wt(c). (Izquierda) Esquema del patrón esperado con 1 Kb Plus DNA Ladder en carril L. (Derecha) Electroforesis de digestiones junto a High DNA Mass Ladder en carril L. A, B, C y D corresponden a transformantes distintas.

Con dos construcciones listas y sin el resto de los fragmentos amplificados, se decidió hacer un cambio al plan original para *Gibson Assembly*, pasando de utilizar pAg43 como templado a pAg43_wt(c); dado que este último ya contiene la secuencia de EGFP, se puede prescindir de la PCR paralela para obtenerla. La Figura 9 muestra una esquematización de la situación actualizada. Al aplicar el plan actualizado se logró obtener todas las variantes restantes, lo que se puede ver en la Figura 10.

Tanto la inserción de Ag43 en pET22 (pAg43) como las construcciones ensambladas pAg43_wt(c) y pAg43_200(c) fueron comprobadas por patrones de digestión y posterior secuenciación. El resto de los ensamblajes, pAg43_250 – 500, sólo fueron corroborados por secuenciación, con lo que se confirmó que el *Gibson Assembly* de todos los fragmentos fue exitoso. A pesar de esto, con la información obtenida se detectó un problema en la construcción 450 originado en su respectiva PCR: el partidore forward utilizado (#11 en la Tabla 2) es capaz de alinear con sí mismo, por lo que añadió una secuencia inesperada en el extremo 5' de la amplificación, registrada en el Anexo 7.6 junto a las secuencias correctas.

Para solucionar este problema se aprovechó la presencia de un sitio de corte único en el vector, reconocido por la enzima de restricción *SacI* y localizado en el extremo 3' de la secuencia de EGFP, que resultó replicado en el segmento extra ubicado entre EGFP y DP. Se hizo una digestión del vector problemático (pAg43_450*(c)) con dicha enzima y se

purificó el fragmento de mayor tamaño, que se circularizó posteriormente por medio de una ligación. El producto fue secuenciado y esta vez sí coincidió con la secuencia esperada, por lo que se logró obtener las ocho construcciones diseñadas, concluyendo así la etapa II.

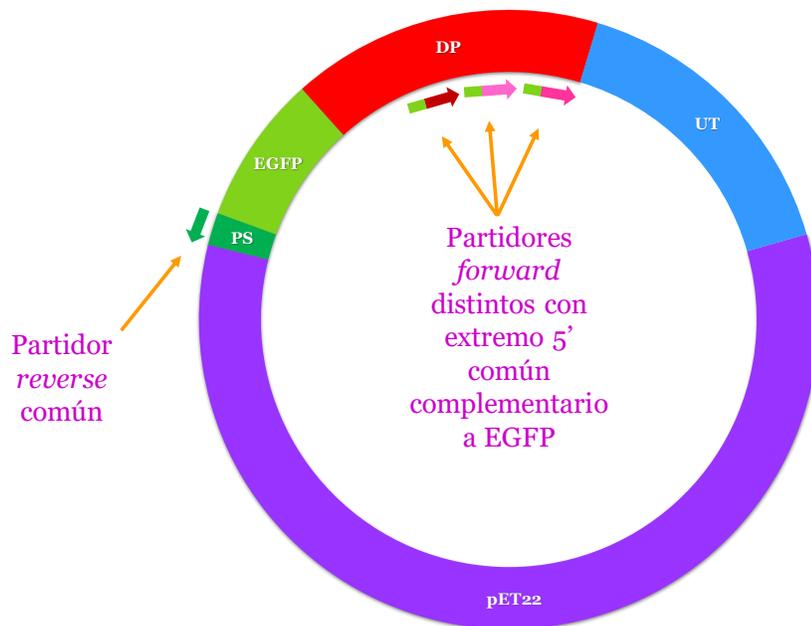


Figura 9: Esquematización del alineamiento de partidores con pAg43_wt(c) como templado en la PCR del plan actualizado para Gibson Assembly. Plásmido dibujado a escala a diferencia de los partidores, cuyo color indica su complementariedad.

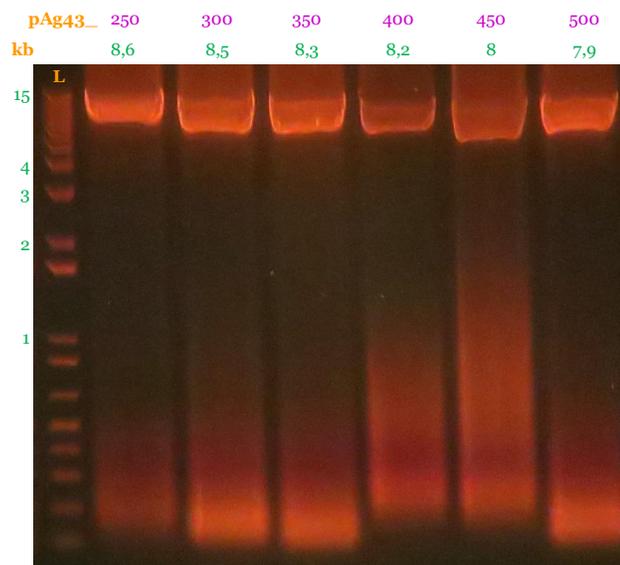


Figura 10: Electroforesis de productos de PCR realizadas de acuerdo con el plan actualizado para Gibson Assembly, desde donde se purifican pAg43_250 - 500(l).

3.2. Etapa III

Células de *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) transformadas con las variantes se cultivaron e indujeron de acuerdo con lo señalado en la Tabla 6. Según lo indicado al final de la sección 2.2.1, se utilizaron además tres transformantes distintas de BL21 con construcciones en pET22 provenientes de un trabajo previo^[15], las que al ser expresadas sirven como controles de localización celular: *Blue Fluorescent Protein* (BFP) citoplasmática, EGFP periplasmática y “Ag43_550”, situada en la membrana externa. En esta última EGFP reemplaza por completo al DP y se denomina así por ser análoga a las construcciones desarrolladas en este trabajo, con la proteína fluorescente unida de manera covalente a la UT y orientada hacia el medio extracelular.

La expresión correcta de las variantes se puede chequear de manera rápida una vez que se ha descartado el sobrenadante; en primera instancia por el color que presenta el *pellet* a simple vista y de manera más certera al observarlo en un transiluminador. Gracias a la presencia de EGFP dicho *pellet* adquiere un color verdoso, además de la capacidad de emitir fluorescencia verde al ser irradiado con luz azul (~485 nm); ejemplos de ambas características se pueden ver en la Figura 11. El pellet de BFP no tiene un color distinto al regular, pero sí emite una intensa fluorescencia azul al ser excitado con luz UV (~390 nm).

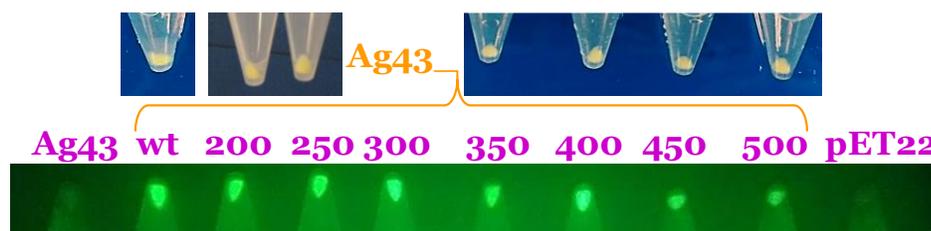


Figura 11: Características observables al realizar una revisión rápida cuando la expresión fue exitosa. Pellets de células con variantes a simple vista (arriba) y en transiluminador con luz de ~485 nm (abajo).

Una vez expresadas todas las construcciones, se utiliza un tratamiento con tripsina para comprobar su correcta localización. Se espera que esta proteasa digiera proteínas localizadas en la membrana externa y el periplasma, pero que no tenga efecto sobre las citoplasmáticas^[15]. En base a esto, se puede comparar el efecto de la enzima sobre la proteína de interés en dos muestras, una tratada y otra no, utilizando como referencia los controles de localización celular.

Dado que EGFP mantiene su capacidad de fluorescer posterior a la acción de la tripsina^[15], el análisis del tratamiento se hizo utilizando registros de células y

sobrenadantes con el fluorímetro, los que se muestran en la Figura 12. Para todas las variantes se vio un aumento considerable de la fluorescencia en el sobrenadante entre las muestras con y sin tripsina, similar a lo que ocurrió con Ag43_550. Esto sugiere que las proteínas quiméricas tienen una correcta localización en la membrana externa como se esperaba.

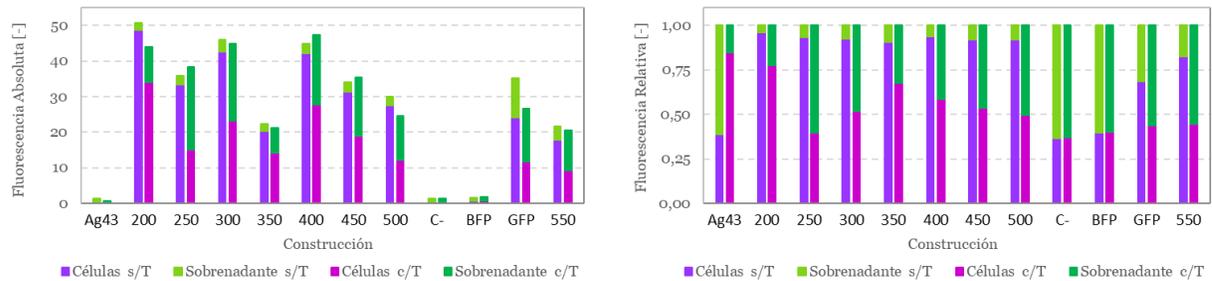


Figura 12: Localización de la fluorescencia luego del tratamiento con tripsina (T). Ag43 corresponde a la proteína nativa y no a la quimera con EGFP (Ag43_wt). C- corresponde a un control negativo con pET22 vacío. (Izquierda) Valores absolutos. (Derecha) Valores relativos respecto a la fluorescencia absoluta total propia de cada caso.

Se realizó una SDS-PAGE para corroborar el análisis del tratamiento con tripsina y además visualizar el corte entre DP y UT en caso de haber ocurrido. Sus resultados se muestran en la Figura 13 y los pesos moleculares predichos para variantes y controles aparecen en la Tabla 7. Se decidió utilizar ambos métodos con el fin de contrastar la respuesta obtenida al trabajar con células lisadas y enteras. En el gel de muestras sin tripsina se pueden ver dos patrones con forma de escalera que corresponden a las variantes con sus dominios unidos (arriba) y separados (abajo). Aparece también una banda con la UT para todas las variantes, lo que concuerda con la presencia del DP por sí solo. Esto indica que el corte autoproteolítico está ocurriendo, lo que requiere de un plegamiento apropiado de las variantes; además se puede apreciar incluso en variantes que no contienen el sitio catalítico propuesto en literatura (en Ag43_400 y 450 con seguridad, en 500 hay indicios), probando que éste no es el responsable del procesamiento. En el gel de muestras con tripsina se observa una desaparición completa de las bandas en escalera respecto del caso sin tratamiento, análogo a lo que ocurre con la banda de Ag43_550. Esto sugiere nuevamente que se localizan en la membrana externa, lo que se considera prueba suficiente. Así se finaliza la etapa III, con todas las variantes expresadas con éxito, correctamente plegadas y localizadas.

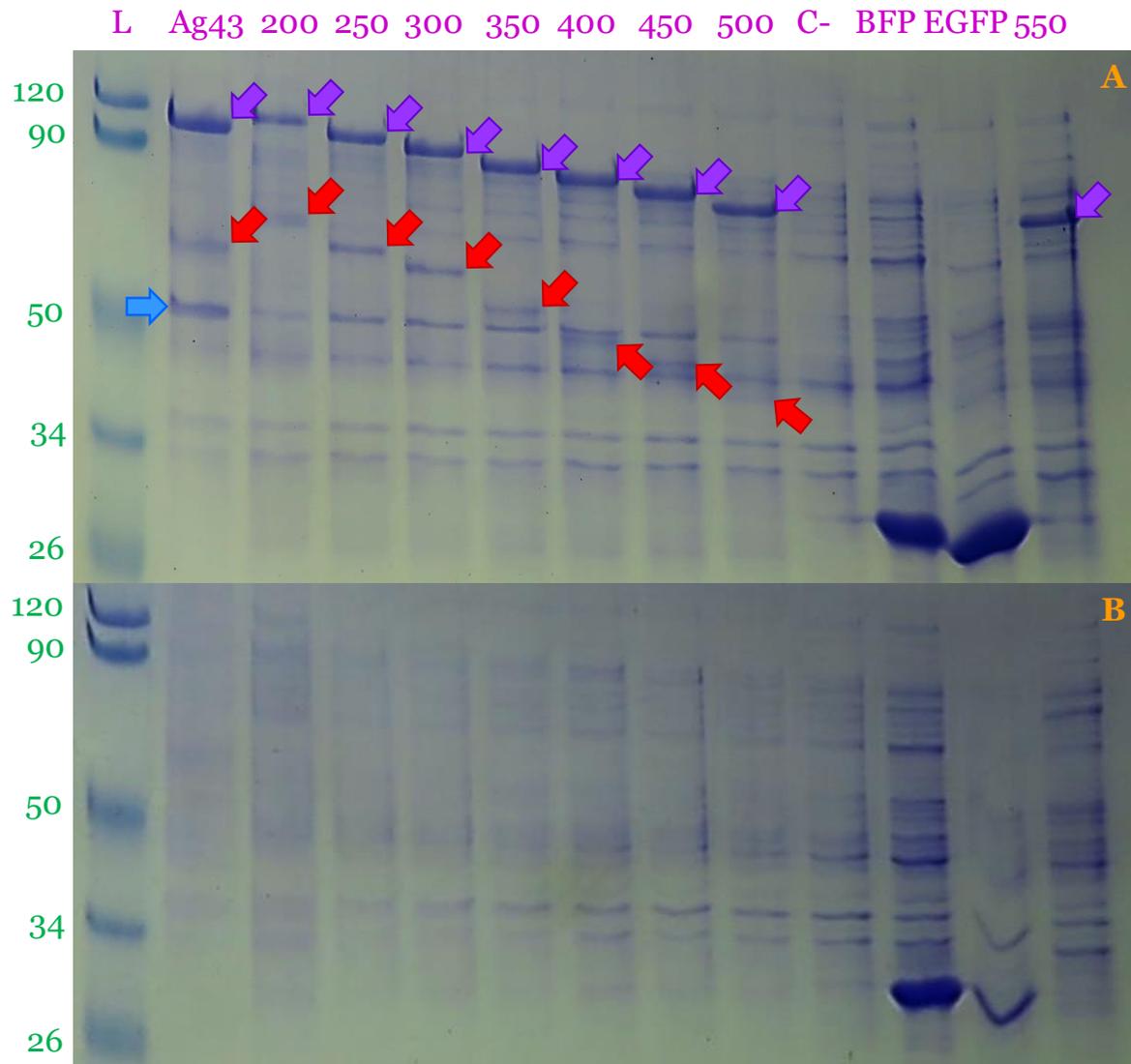


Figura 13: SDS-PAGE de variantes diseñadas y controles de localización celular. Ag43 corresponde a la proteína nativa y no a la quimera con EGFP (Ag43_wt). C- corresponde a un control negativo con pET22 vacío. A: muestras no tratadas con tripsina. B: muestras tratadas con tripsina. Flecha azul: unidad de translocación. Flechas rojas: dominio pasajero. Flechas moradas: DP + UT.

Tabla 7: Pesos moleculares redondeados de polipéptidos observados en SDS-PAGE.

Proteína	Ag43	Ag43_								Dominio/ Proteína	UT	BFP	EGFP
		200	250	300	350	400	450	500	550				
DP [kDa]	50	62	57	52	47	42	37	32	-	[kDa]	52	29	27
DP + UT [kDa]	102	113	108	103	98	93	89	84	79				

3.3. Etapa IV

Dado que efectivamente se produce el corte autoproteolítico en las variantes diseñadas, es posible aprovechar el dominio reportero para caracterizar la liberación del DP en el tiempo respecto al pH del medio, de acuerdo con el último objetivo específico. Se hizo entonces un monitoreo periódico de la fluorescencia en células y sobrenadantes de una misma resuspensión para saber en qué fracción se encuentra el DP al momento de medir. Como se tienen registros consecutivos, se puede conocer cómo cambia su localización a medida que avanza el tiempo de incubación, lo que corresponde a su curva de liberación. Utilizando *buffers* con distinto pH para resuspender, se puede saber si el fenómeno es afectado por esta variable y, en caso de serlo, cómo altera su comportamiento. Llevando a cabo el mismo procedimiento para cada una de las variantes, se puede obtener información acerca de la zona del DP responsable de la interacción no covalente con la UT; todo esto con el fin de evaluar la aplicación de Ag43 en el sistema de expresión que motiva este trabajo.

Como punto de partida fue necesario inducir cultivos de mayor volumen que en la etapa anterior, para lo que el protocolo de inducción con medio M9 no dio resultado. Se cambió entonces a un protocolo distinto que utiliza medio TB, cuyos parámetros también se indican en la Tabla 6. En la Figura 14 se puede ver una prueba de su funcionamiento, donde se logró expresar todas las variantes a excepción de Ag43_300, por lo que es la única cuya liberación no fue estudiada. Las curvas fueron elaboradas de acuerdo con el protocolo registrado en 2.2.4, pero sin considerar finalmente las mediciones realizadas a los 100 minutos ni los datos respectivos a pH 4 por la alta variabilidad que ambos presentaron.

La Figura 15 reúne las curvas de liberación agrupadas por pH, donde los puntos de los gráficos A y E se presentan normalizados por la OD₆₀₀ de sus respectivos cultivos con el fin de hacerlos comparables. La fluorescencia en células da cuenta del DP quimérico que permanece asociado a la membrana externa, mientras que la de los sobrenadantes indica cuánto ha sido liberado al medio. Los valores relativos se obtienen dividiendo los valores absolutos por la fluorescencia en el tiempo cero para la variante a la que corresponden. Esto permite visualizar en una misma escala el cambio de la liberación respecto a la situación inicial, sin importar el nivel de expresión específico alcanzado con cada transformante.

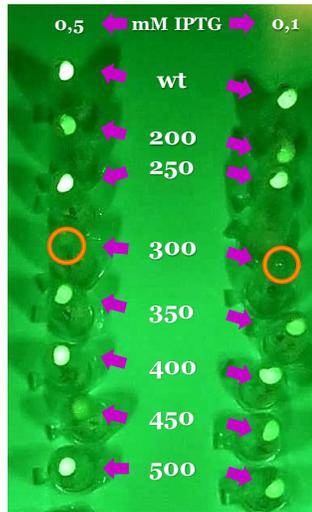


Figura 14: Prueba de inducción para todas las variantes utilizando el nuevo protocolo con medio TB.

En las curvas se puede ver que la liberación del DP aumenta a medida que pasa el tiempo, lo que se condice con la disminución gradual de DP que permanece asociado a la membrana externa. Sin embargo, respecto al cambio en el pH las dos fuentes muestran respuestas diferentes. Para el DP asociado no existe una tendencia generalizada a medida que se acidifica el medio, pero en la mayoría de las variantes la liberación aumenta. Por el contrario, el DP liberado exhibe una disminución para todas las variantes a medida que el pH baja. Dado que los registros de células y sobrenadantes no se corresponden, fue necesario escoger sólo una perspectiva para realizar el análisis. Por presentar mediciones y comportamientos menos erráticos, se decidió proseguir el trabajo con los datos de sobrenadantes.

Mediante los gráficos de barras presentados en la Figura 16 se contrasta para cada variante el DP liberado entre los valores de pH estudiados. Dado que la fluorescencia de EGFP se ve afectada por los cambios de acidez, los registros fueron llevados a su valor equivalente en pH 7 para hacerlos comparables, además de estar normalizados por su respectiva OD₆₀₀.

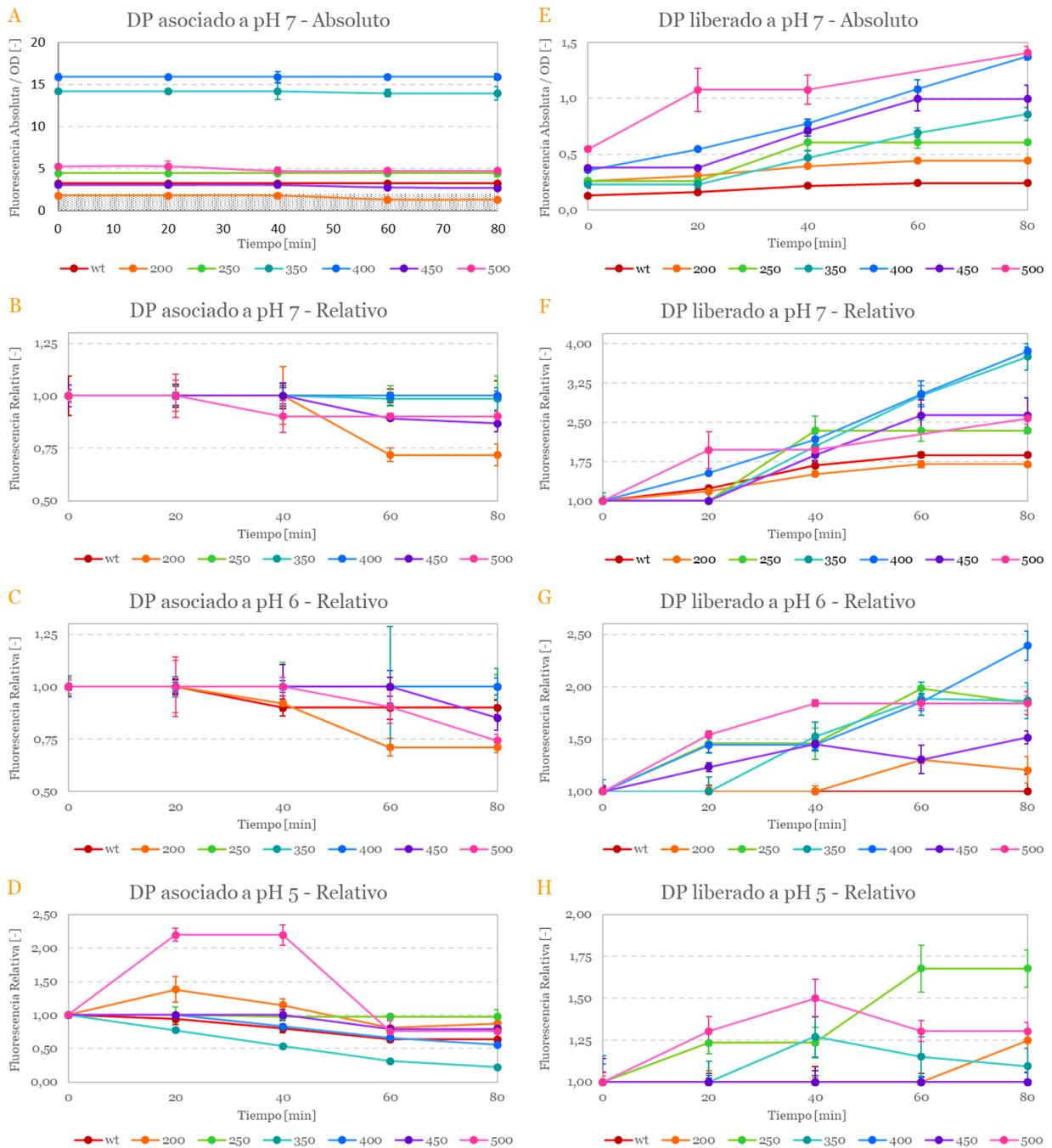


Figura 15: Curvas de liberación agrupadas por pH. “DP asociado” corresponde a mediciones de células (A-D) y “DP liberado” a las de sobrenadante (E-H). Zona achurada en gráfico A representa el rango de fluorescencia que abarca E. Dos registros en sobrenadante a los 60 minutos no fueron considerados en las curvas: Ag43_500 a pH 7 (E y F) y Ag43_wt a pH 6 (G). “Absoluto” corresponde a fluorescencias medidas y “Relativo” a puntos normalizados por el registro en el tiempo cero de su variante respectiva.

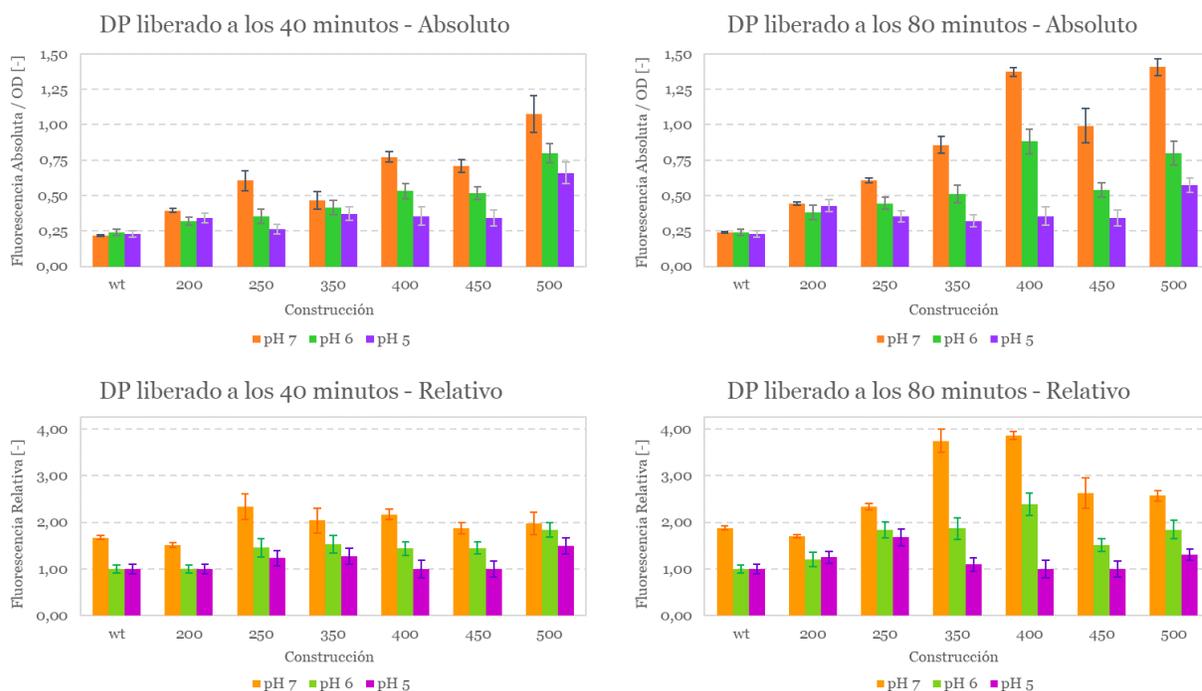


Figura 16: Contraste agrupado por variante del DP liberado en el sobrenadante para pH 7, 6 y 5 a los 40 y 80 minutos de monitoreo. “Absoluto” corresponde a fluorescencias llevadas a su equivalente en pH 7 y “Relativo” a valores normalizados por el registro en el tiempo cero de su variante respectiva.

Se puede apreciar en dos momentos del monitoreo distintos que prácticamente en todas las variantes estudiadas el nivel de liberación alcanzado disminuye a medida que el pH del medio se acidifica. Respecto a la zona del DP responsable de la interacción con la UT no se pueden hacer inferencias con seguridad por falta de un patrón claro exhibido. Dado que para Ag43_500 se registran niveles de fluorescencia en sobrenadante comparables con el resto de las variantes, se corrobora que el corte autoproteolítico ocurre efectivamente en todas las variantes diseñadas. Considerando que la máxima liberación registrada ocurre al pH óptimo para el cultivo, se descarta el uso de Ag43 nativa en el sistema de expresión planteado con adición de protones como herramienta para inducir la secreción.

4. Discusiones

En este capítulo se analizan los resultados obtenidos, considerando ya sea los alcances de la metodología utilizada, su comportamiento en relación con lo esperado o la información que se infiere a partir de ellos. Primero se revisan de manera puntual, avanzando según el orden de aparición en el capítulo anterior; luego se consideran en conjunto para generar una visión global del trabajo realizado.

4.1. Etapas I y II

La enzima de restricción *NdeI* fue seleccionada para la etapa I porque el corte que genera remueve el péptido señal incluido en pET22. Dado que Ag43 posee su propio PS, la secuencia líder de *pelB* se vuelve innecesaria e incluso podría alterar los resultados obtenidos. Las ventajas reportadas en literatura respecto al uso de Ag43 en sistemas de expresión consideran al PS nativo, por lo que no se podría asegurar que estas se mantengan al reemplazarlo, en especial por el rol que se le atribuye en el plegamiento correcto de la proteína dado su largo sobre el promedio. Además, la diferencia entre variantes y secuencia original se busca reducir al mínimo posible con el fin de limitar los factores que puedan inducir variabilidad en los resultados obtenidos respecto a la proteína nativa; por lo mismo, se optó también por no incluir una cola de polihistidina.

La clonación con enzimas de restricción no se utilizó en la etapa II en favor de un procedimiento más eficiente, tanto desde la perspectiva de requerimiento de reactivos, así como de reacciones necesarias. Para generar las construcciones con dicha técnica se hubiera tenido que sintetizar 18 partidores en lugar de los 11 utilizados, pasando de necesitar sólo 1 para el extremo 3' de EGFP a 8 diferentes que agreguen sitios de restricción al amplificar el gen, aumentando también el número de PCR de 1 a 8. La misma situación hubiera ocurrido en caso de agregar CdeC al extremo 3' de EGFP, dado que en general éstas se añaden en los dos extremos que se unirán en un *Gibson Assembly*.

Volviendo a la primera alternativa, en principio sería necesario encontrar enzimas de restricción que no cortaran en ningún punto al templado y cuya secuencia reconocida fuera compatible a la vez con el extremo 3' de EGFP y el 5' del segmento del DP respectivo. Además de ser una tarea compleja, implica un mayor consumo de enzimas que las necesarias para la metodología seleccionada, por lo que esta última representa una opción más eficiente.

Para el PCR realizado según el plan original para Gibson Assembly (Figura 7) se esperaba un patrón con forma de escalera bajando hacia la derecha entre 8,5 y 7,1 Kb, debido a las pequeñas variaciones entre las amplificaciones deseadas. Sin contar el carril de Ag43_250, donde se supone ocurrió un problema al cargar ya que no se aprecia fluorescencia alguna, el patrón esperado está presente pero conformado en su mayoría por bandas muy tenues. A pesar de que existe la posibilidad de haber tenido el producto deseado para Ag43_300 – 500, se optó por recuperar sólo las bandas correspondientes a wt y 200 en base a la intensidad que se observa respecto al resto de los fragmentos en su mismo carril: las secuencias seleccionadas poseían intensidades comparables con las otras presentes, a diferencia de las descartadas, donde existían bandas de otros pesos moleculares con una intensidad mucho mayor.

Para interpretar los patrones de digestión (Figura 8) se realizó una simulación de los resultados a partir de las secuencias esperadas y luego se comparó con lo obtenido experimentalmente. El software utilizado requiere aplicar al menos una enzima de restricción por carril al simular la digestión, por lo que en la esquematización los carriles 1 y 2 contienen vectores que serían lineales, a diferencia de la electroforesis, donde debiesen ser circulares. En este estado es posible que el ADN esté sobreenrollado y migre más allá de su peso respectivo, lo que explicaría por qué vectores enteros avanzan más que sus fragmentos (de menor tamaño), en especial para la transformante C. El hecho de que en el carril 2 no aparezcan más bandas que en el carril 1 indica que las únicas responsables del corte en 3 y 4 son efectivamente las enzimas añadidas.

Como indica el patrón teórico, en el carril 4 se deberían observar dos bandas al igual que en 3, pero con una menor separación. Esto se debe a que el sitio de corte de *SacI* se encuentra dentro de la secuencia de EGFP y el de *NdeI* está justo donde comienza el PS; al cambiar *NdeI* (carril 3) por *SacI* (carril 4), el fragmento pesado pierde la sección entre el inicio del PS y el punto de corte en EGFP (volviéndose más liviano) y la gana el fragmento liviano (volviéndose más pesado), cambiando así sus migraciones relativas. Se decidió trabajar con enzimas que entregan un patrón de sólo dos fragmentos para facilitar el análisis, puesto que al considerar más bandas se vuelve difícil discernir si corresponden a la digestión o no. Las transformantes cuyo patrón de digestión coinciden con el deseado son B y C, aun cuando la primera muestra un fragmento extra en el carril 3 y la segunda en el 4; dado que ambos son mayores que los fragmentos del patrón, se asume que

corresponden a templado no digerido. En A prácticamente no se observan fragmentos y en D más de los esperados, por lo que son descartadas.

Para el PCR realizado según el plan actualizado para Gibson Assembly (Figura 10) se esperaba nuevamente un patrón con forma de escalera bajando hacia la derecha, esta vez entre 8,6 y 7,9 kb por la inclusión de EGFP en la secuencia. En este caso vemos bandas intensas en todos los carriles localizadas en la zona de alto peso molecular, correspondiente a lo esperado; incluso están difuminadas por la gran cantidad cargada, contrastando con el resultado de la primera amplificación. El único producto de PCR que se escapó ligeramente del patrón fue 450, que migró como si fuera más liviano que 500, pero a lo que no se le dio mayor importancia dada la magnitud de la diferencia. Irónicamente, éste fue el único fragmento que resultó más largo de lo esperado, lo que fue descubierto al hacer su secuenciación.

La solución encontrada para el problema fue sencilla, pero en gran medida se debe al azar: si el sitio de restricción no hubiera estado hacia el final de la secuencia de EGFP, no hubiera sido incluido en el partidador dentro de la CdeC y, por lo tanto, no se hubiera replicado; si el sitio de restricción no hubiera sido único dentro de la secuencia original, no se hubiera podido eliminar el segmento sobrante y luego haber circularizado fácilmente el vector, pues se habría generado más de un fragmento con los mismos extremos cohesivos. Todo esto apunta finalmente a la importancia de la etapa del diseño de partidores y la minuciosa revisión que requiere, puesto que es más sencillo evitar problemas a nivel *in silico* que solucionarlos dentro del trabajo experimental.

4.2. Etapa III

El chequeo rápido de expresión (Figura 11) es un medio para inferir información sobre el estado de la proteína quimérica, pero sus resultados deben confirmarse. Cuando las células presentan la coloración y fluorescencia mencionadas, lo único seguro es que EGFP fue sintetizada y que se encuentra bien plegada; dado que forma parte de los DP, es probable que estos cumplan con lo mismo, pero no necesariamente. Por un lado, la traducción (o incluso la transcripción) podría haberse interrumpido, generando una proteína truncada donde se alcanza a tener completa a EGFP, lo que sería posible puesto que corresponde al extremo amino de la proteína madura. Por otro lado, la estructura terciaria de EGFP es especialmente estable, por lo que también se podría dar el caso de

tener la secuencia de la variante completa y sólo esa zona correctamente plegada. La posibilidad de realizar el chequeo es útil para evaluar las probabilidades que se enfrentan y decidir a partir de esto cómo proseguir. Si, como se dijo, se sabe que EGFP se encuentra bien plegada en la célula, es probable que la proteína quimérica completa también lo esté. Ahora, si no se detecta ni color en el pellet ni fluorescencia, quiere decir que EGFP no se sintetizó o al menos no está bien plegada; considerando que es una proteína pequeña y de fácil plegamiento, es poco probable que ésta presente problemas y la variante no lo haga, por lo que sugiere una falla en la inducción realizada.

La interpretación de los resultados del tratamiento con tripsina se basa en el acceso que tiene la proteasa a los distintos compartimentos celulares, comparando qué ocurre en la muestra a la que se añadió enzima respecto de la muestra a la que no: si la proteína de interés desaparece o disminuye, correspondería a la membrana externa o periplasma; si se mantiene invariable, estaría situada en el citoplasma o la membrana interna. Para apoyar el contraste se utilizan los controles de localización celular (BFP, EGFP y Ag43_550) como referencia, puesto que su ubicación es conocida. El efecto de la tripsina sobre éstos sirve como guía respecto a qué debiese ocurrir con la proteína de interés dependiendo de dónde se espera encontrarla, por lo que se deben tomar en cuenta también al hacer la comparación.

Como la fluorescencia de EGFP se detecta incluso cuando la proteína se encuentra en el citoplasma, que las células la exhiban no da ninguna indicación sobre su localización celular. Sin embargo, si dicha fluorescencia se mide después de un tratamiento con tripsina, esto sí daría luces sobre la ubicación de las variantes. Al llevar a cabo este procedimiento (Figura 12) se ve un aumento considerable de la fluorescencia en el sobrenadante de las variantes con tripsina, con una respectiva disminución en la asociada a sus células. En contraste con los controles, el comportamiento exhibido se asemeja más al de Ag43_550 que al de EGFP por la proporción del aumento, lo que apunta a una localización de las variantes en la membrana externa como es deseado.

La diferencia exhibida en fluorescencia total probablemente se debe a una distinta cantidad inicial de células, dado que los datos son de muestras paralelas y no de una misma medida en distintos tiempos. Como se esperaba, aquellas sin capacidad de fluorescer con luz azul (Ag43, pET22 y BFP) arrojaron niveles ínfimos en el fluorímetro.

Los resultados de las mediciones sin tripsina sugieren un bajo nivel de liberación, pudiendo incluso ser nula dada la similitud de los niveles en sobrenadante con los casos no fluorescentes, además de ser menores que los de Ag43_550 donde el corte no ocurre.

Para el SDS-PAGE sin tripsina (Figura 13 A) se espera ver un patrón con forma de escalera análogo a los de la etapa II, pero en este caso dividido en dos grupos: por un lado, uno correspondiente a los distintos DP de las quimeras donde sí ocurre el corte; por el otro, uno formado por la proteína completa, DP + UT, relativo a las variantes donde el corte no ocurre. Se debiese apreciar además una banda asociada a la UT, situada en los 52 kDa, en cada uno de los carriles que forman el primer grupo. En base a la hipótesis planteada, dicho grupo estaría formado por Ag43_wt – 350, por lo que el patrón se movería entre 62 y 47 kDa; a su vez, el rango para el segundo grupo correspondería a 93-84 kDa (Tabla 7). Es importante notar que el segundo carril tiene a la proteína nativa y no a la quimera con EGFP, por lo que la migración relativa de sus bandas debiese ser mayor que las de Ag43_200.

A diferencia de lo esperado, en el gel aparecen dos patrones de escalera que abarcan los carriles de todas las variantes diseñadas: uno de la proteína completa y otro del DP, además de la banda asociada a la UT también en todos los casos. En cuanto a Ag43_500, la banda que corresponde al DP no se ve con claridad, pero hay indicios de su presencia al comparar con los carriles adyacentes, además de apreciarse la UT por sí sola. La presencia del DP separado de la UT implica que el corte se genera con seguridad hasta al menos Ag43_450, lo que sugiere que el sitio propuesto en literatura no sería el responsable del fenómeno observado. Además, se estaría refutando la hipótesis planteada, basada en que el corte se produce por un mecanismo aspartil-proteasa para predecir el aumento de actividad al disminuir el pH, dado que el óptimo de estas enzimas se alcanza en medios ácidos. Considerando esto, ya no se tiene un comportamiento esperado con el que comparar al analizar los resultados de la siguiente etapa.

La migración de las proteínas quiméricas no coincide con lo esperado respecto al marcador de peso molecular, pero no se considera de mayor importancia porque la migración relativa entre ellas sí resulta de acuerdo con lo esperado; además, las dos escaleras presentan comportamientos contrapuestos: el grupo de las proteínas completas avanza más allá de lo esperado, como si fuesen más livianas, y el grupo de los DP avanza

menos de lo esperado, como si fuesen más pesados. Considerando que la banda de la UT sí se ubica donde se predice, el DP tendría que ser el responsable de esta diferencia. Si faltara parte de su secuencia, no se podría explicar que al estar separados avancen menos aún que completas; si tuvieran un segmento extra, la proteína completa no hubiera migrado más allá de lo estimado. Finalmente, se atribuye la discordancia a un artefacto del gel mismo o una migración alterada provocada por alguna característica propia de los DP.

Las muestras de células que expresaron las distintas variantes fueron tratadas con *BugBuster*® antes de ser cargadas en el gel, recuperando en el proceso sólo la fracción insoluble de cada una dado que las proteínas de membrana externa son de difícil solubilización. Sin embargo, en esta fracción podría haber también proteínas de membrana interna y cuerpos de inclusión. Por lo tanto, la presencia mayoritaria de la proteína completa se podría deber a una cinética de corte lenta o bien a que gran parte de las construcciones expresadas formaron cuerpos de inclusión. La presencia de los dominios por separado no necesariamente implica una localización correcta, pero sí al menos un plegamiento adecuado. En cuanto a sus bandas, la mayoría de los pares DP-UT respectivos presentan intensidades similares, lo que tiene sentido pues se espera que estén en una proporción 1:1. Dado que los dominios permanecen asociados después del corte, es probable que se mantengan así hasta que son sometidos a la electroforesis, donde los agentes denaturantes fuertes causen su separación. En los casos donde esto no ocurre, la intensidad de la UT es mayor que la del DP, lo que se puede explicar por una liberación previa al muestreo.

Considerando ahora el SDS-PAGE con tripsina (Figura 13 B) se puede observar la desaparición de una gran cantidad de bandas respecto al gel sin tripsina. En cuanto a los controles de localización, se puede apreciar que la banda correspondiente a BFP citoplasmática se mantuvo prácticamente invariable mientras que los otros dos disminuyeron, lo que es coherente con el alcance de la tripsina. La banda de Ag43_550 desapareció por completo, mientras que la de EGFP periplasmática presenta un remanente, aunque esto es difícil de evaluar por la distorsión presentada, debida probablemente a un problema al cargar la muestra. Dado que las bandas de las variantes también desaparecen por completo, nuevamente resulta más probable que estén

localizadas en la membrana externa que en el periplasma y se descarta la posibilidad de que sean cuerpos de inclusión.

4.3. Etapa IV

En principio se decidió trabajar con medio M9 porque no presenta fluorescencia al ser irradiado con luz azul, con el fin de minimizar los factores que pudieran distorsionar las mediciones para cuantificar EGFP. Dado que dichas mediciones se realizan con las células resuspendidas en PBS el aporte del medio es despreciable, por lo que se cambió sin problemas al medio fluorescente TB cuando la inducción dejó de funcionar con el protocolo anterior. Este nuevo medio es rico en nutrientes y se usa regularmente para inducir proteínas, a diferencia del anterior, que corresponde a un medio mínimo. Esto último supone condiciones de estrés para el crecimiento celular, pudiendo haber generado la pérdida o disminución de ciertas facultades en las bacterias que finalmente forman parte de los stocks almacenados para su perpetuación; de los que además se hizo un mal manejo, pues se sometieron regularmente a cambios drásticos entre -80°C y temperatura ambiente. Ambas razones en conjunto podrían explicar tanto la incapacidad de las células para crecer o ser inducidas nuevamente en M9, después de pasar un tiempo almacenadas, como la recuperación de su funcionamiento normal frente a una situación como la que presenta el medio TB. La falta de expresión detectada para Ag43_300 (Figura 14) se podría atribuir a un stock especialmente deficiente, incapaz de recuperarse incluso en TB, o a una mutación espontánea que podría impedir su correcta síntesis o meramente interferir con su capacidad de fluorescer.

La fluorescencia de EGFP es sensible al pH puesto que el estado de protonación de su cromóforo determina la longitud de onda de máxima excitación, pasando de ~ 485 nm en el estado no protonado a ~ 390 nm en el protonado; su longitud de onda de emisión no se ve afectada. Este cambio no es binario dado que para cada valor de pH se formarán distintas proporciones entre ambos estados, por lo que la excitación máxima tampoco lo es^{[24],[25]}. Por este motivo, es necesario realizar una conversión de los valores medidos para hacerlos comparables. En este caso, se optó por llevar todas las mediciones a una fluorescencia equivalente en pH 7, puesto que es la acidez dentro del rango utilizado que tiene la máxima excitación a 485 nm, longitud de onda utilizada en el fluorímetro. Sería ideal trabajar con un reportero cuya fluorescencia fuera comparable independiente del pH

utilizado, ya que el ajuste de los datos les aporta una mayor incertidumbre puesto que los parámetros estimados con que se realiza tienen también un error asociado.

Para convertir los valores de fluorescencia en el sobrenadante se parte del supuesto que en el tiempo cero la cantidad de DP liberado en cada fracción con distinto pH es la misma, puesto que la influencia de este parámetro no tendría un efecto instantáneo en el corte y liberación, pero sí en la fluorescencia. Por lo tanto, los datos registrados indicarían la fluorescencia que emite una cantidad fija de EGFP en el medio frente a distintos valores de pH. Tomando los pares de registros a pH 7 y pH X para cada variante, se realiza una regresión lineal que entrega una relación matemática entre ambas situaciones, forzando a la recta a pasar por 0 para que tenga sentido físico (cuando en pH X la medición es cero, en pH 7 también lo es). Se prefiere esta alternativa por sobre una conversión proporcional para cada variante por separado pues es una forma de reducir la influencia de variaciones puntuales que desviarían los resultados. Por ejemplo, si por algún motivo para una variante se registrara un valor más alto en el tiempo cero para pH 6 que para 7, todos los puntos de su curva asociada al pH 6 tendrían un mayor valor equivalente del que les corresponde. El supuesto tomado podría no ser correcto, con el pH afectando la liberación apenas las células entran en contacto con el medio, pero en ese caso no sería posible establecer una equivalencia para la comparación, por lo que se prefiere asumir este error asociado.

Otro aspecto a considerar en cuanto a la elaboración de las curvas fue la eliminación de ciertos puntos, realizada en dos instancias diferentes y siempre para cada variante por separado, además de un procesamiento para incluir la significancia estadística. En primer lugar, los datos crudos registrados para cada pH fueron graficados en función del tiempo, separando entre células y sobrenadante. Luego se analizó cada curva generada para determinar qué mediciones se escapan de la tendencia exhibida o la esperada, constituyendo *outliers* que no se consideran al calcular promedio y desviación estándar (DE) de cada triplicado. Una vez que estos datos han sido eliminados, se calculan parámetros estadísticos entre distintos tiempos de muestreo y se utilizan para aplicar una heurística con el fin de simplificar la forma de las curvas, pero manteniendo su comportamiento general; las reglas seguidas se muestran en el Anexo 7.6. La transformación se basa en la diferencia significativa entre puntos y se justifica como una primera aproximación a la caracterización del fenómeno.

Para terminar, se grafican las curvas tal como se muestra en la Figura 15 y se procede a la segunda revisión. En este caso se observa la tendencia de los promedios y se remueven aquellos que divergen más allá del rango de sus errores, indicando comportamientos sin sentido biológico. Los puntos eliminados en ambas revisiones se atribuyen a errores experimentales.

Una eliminación más drástica se realizó con los datos correspondientes a los 100 minutos y las curvas a pH 4. En cuanto a los primeros, estas mediciones resultaron ser considerablemente más erráticas que el resto, presentando una alta dispersión y tendencias sin sentido biológico. Dado que la duración del muestreo no fue escogida por alguna razón específica, se prefirió simplemente dejar estos registros de lado y considerar hasta el minuto 80, rango en que se observa un comportamiento mayoritariamente dentro de lo esperado. Respecto al último pH, sus datos presentaron en gran parte de los casos un error porcentual mayor al doble del asociado a otras curvas de la misma variante. Además, es el pH de los utilizados que emite menos fluorescencia con ~485 nm, por lo que se pierde resolución en sus mediciones. En vista de que ambos aspectos combinados generarían un error aún mayor, las curvas obtenidas no se consideran confiables, por lo que se descartan.

Las curvas presentadas se seleccionaron por ser las de mayor utilidad para analizar los factores estudiados: tiempo de incubación, pH del medio y segmento del DP incluido en la proteína quimérica (variante). Cada curva relativa se construyó tomando todos los puntos de su curva absoluta respectiva y normalizándolos por la medición del tiempo cero. La fluorescencia relativa se prefiere para analizar el comportamiento de los DP dado que permite comparar entre variantes en una misma escala, sin las diferencias propias de los niveles de expresión de cada transformante en específico. A pesar de que las mediciones son normalizadas por la OD₆₀₀ para remover la variación por el número de células alcanzado, aún puede existir una diferencia respecto a cuántas copias de la proteína expresan. Esta diferencia se ve influida tanto por parámetros de la bacteria misma como por los efectos que pueda tener cada variante en la fisiología celular, además de los factores que puedan diferir entre inducciones, por lo que no debiera estar involucrada con el mecanismo de liberación. Se decidió presentar sólo un set de curvas absolutas y tres de relativas (Figura 16): el primero muestra los niveles de producción en la condición

estándar (pH 7), cuyo valor inicial aplica para los tres casos; el resto permite comparar la liberación a los distintos valores de pH estudiados.

Las curvas muestran que en general la liberación del DP aumenta con el tiempo a la vez que disminuye la cantidad asociada a la célula, comportamientos que se corresponden. En el gráfico A se pueden notar dos variantes, Ag43_350 y 400, que triplican el valor del resto, mostrando diferencias drásticas en el nivel de expresión. Sin embargo, en E no se aprecian diferencias de tal magnitud, con 350 y 400 situadas dentro del mismo rango que las demás y sin ser siquiera las mayores. La diferencia entre la fluorescencia medida en células y sobrenadantes es considerable, donde incluso la menor curva del primer grupo supera a la mayor del segundo. Esto podría implicar un bajo nivel de corte en la proteína respecto al total presente, sugerido anteriormente por la SDS-PAGE, y/o un cambio en la capacidad de fluorescer entre los dos estados. En vista de que asociada a la célula la proteína tendría menos libertad por impedimentos estéricos, es posible que al encontrarse disociada disipe energía a través de otros mecanismos como los vibratorios, alcanzando niveles de fluorescencia menores.

Las curvas relativas para DP asociado (B, C y D) son en su mayor parte decrecientes, con un conjunto constante que implicaría liberación nula de subunidad α hacia el sobrenadante. Se pueden ver dos casos para pH 5, Ag43_200 y 500, donde la fluorescencia sobrepasa su valor inicial antes de empezar a disminuir. Puesto que estos registros corresponden a más de un tiempo sus puntos no pueden ser eliminados de la curva graficada por no seguir la tendencia esperada, pero no se encuentra un sentido biológico al comportamiento: dado el pequeño lapso transcurrido y las condiciones poco favorables (*buffer* sin IPTG en vez de medio de cultivo), es poco probable que dicho aumento corresponda a síntesis o exportación de la proteína, que sería la respuesta más lógica.

Al comparar la situación entre distintos valores de pH, se puede notar una disminución más pronunciada del DP asociado a medida que se acidifica el medio, pasando de una liberación máxima ligeramente sobre 25% en pH 7 a una de alrededor del 75% en pH 5. Además, la cantidad de variantes con liberación al medio aumenta: partiendo con tres, se suma una en pH 6 y ya en 5 prácticamente todas tienen algún grado de disociación. Considerando que Ag43_350 se mantiene virtualmente intacta a pH 7 y 6

sumado con que presenta la mayor liberación a pH 5, se posiciona como la mejor alternativa para inducir secreción por un aumento de acidez.

Las curvas relativas para DP liberado (F, G y H) son en su mayoría crecientes acorde a lo esperado; dado que la liberación al tiempo cero se utiliza como referencia para su elaboración, todas parten desde 1 y deberían aumentar a partir de ese punto. Las curvas para Ag43_wt a pH 6 y Ag43_wt, 400 y 450 a pH 5 se mantienen constantes en el valor inicial, lo que quiere decir que en el lapso monitoreado no se detectó más EGFP en el sobrenadante que la registrada al minuto cero. En ningún caso se observa un valor menor a 1 y en las instancias donde la liberación decrece, el error de las mediciones respectivas indica que dicho comportamiento podría ser atribuible a un tema experimental y no al fenómeno mismo.

Como se mencionó, la cantidad de curvas constantes aumenta a medida que el pH baja, pasando desde 0 a 3. Además, el rango de liberación observado disminuye con la acidificación del medio, con valores finales que casi cuadruplican la fluorescencia inicial para pH 7 y ninguna variante que alcance a duplicar para 5. Este comportamiento se contrapone al exhibido por las células, ejemplificado con Ag43_350: mientras que al considerarlo respecto al DP asociado se posicionaba como la mejor opción para su uso en el sistema de expresión, la perspectiva opuesta muestra altos niveles de liberación en pH 7 y una baja drástica con sólo cambiar a 6, lo que lo descartaría como candidato.

Puesto que lo inferido desde los sobrenadantes no corrobora lo inferido a partir de las células e incluso lo contradice, se hace necesario escoger uno de los dos como base para concluir. Al contrastar ambos sets de curvas, se observa que los errores porcentuales para DP asociado son mayores que para DP liberado, además de haber diferencias de mayor magnitud en los casos donde las curvas no se comportan de acuerdo con lo esperado. Si además se toma en cuenta que al trabajar con células hay más factores que podrían ser fuente de error, se opta por continuar sólo con la perspectiva de los sobrenadantes.

En el contraste entre liberación a distintos valores de pH para todas las variantes (Figura 16) se escogen dos tiempos para corroborar que la respuesta obtenida sea la misma: 40 minutos por ser el último momento en que todas las curvas son crecientes y 80 minutos por ser la última medición confiable registrada. Se confirma que efectivamente la liberación disminuye en función del pH, dado que se aprecia una variación lineal para

casi todas las variantes entre los tres valores estudiados, tanto para valores absolutos como relativos. Los casos donde esto no se observa presentan una diferencia de baja magnitud entre mediciones, por lo que se podría atribuir a razones experimentales y no fenomenológicas. Se confirma también que el corte ocurre en todas las variantes incluyendo a Ag43_500, de la que no se tenía seguridad en base al SDS-PAGE.

Salvo para Ag43_450, la fluorescencia absoluta aumenta a medida que disminuye el largo del DP. Si todas las transformantes destinan el mismo total de recursos celulares a la expresión inducida, es razonable pensar que la proteína más pequeña se produzca en mayor cantidad, puesto que requiere de un menor número de aminoácidos. La fluorescencia relativa a los 80 minutos exhibe un comportamiento distinto, alcanzando un máximo en Ag43_400 desde donde vuelve a disminuir, lo que se podría relacionar con la interacción no covalente entre DP y UT. Si hubiera residuos en ambos extremos del DP que interactúan con distintas partes de la UT se podría proponer una explicación: al estar completo se ancla en dos puntos; luego pierde uno de los dos al reducirse en tamaño, con lo que el anclaje no es suficiente para el largo respectivo y se libera con mayor facilidad; finalmente, al acortarse aún más basta con un punto de anclaje para mantener la interacción y, por lo tanto, la liberación vuelve a bajar. Otra explicación podría relacionarse con la tasa de corte de cada DP, donde el largo influya en la facilidad con que el sitio catalítico interactúa con el sitio de corte. Dado que hay un número de factores sobre los que no se tiene claridad que pueden influir en este comportamiento, no es posible hacer una aseveración con seguridad, pero sí plantear posibles aspectos en los que enfocar el estudio a futuro.

4.4. Discusión General

Se comprobó que el corte entre DP y UT ocurre, tanto a nivel de proteína (SDS-PAGE) como de célula (curvas de liberación), incluso en aquellas variantes que no contienen el sitio catalítico propuesto, lo que se considera suficiente para indicar que dicha secuencia no es la responsable de la autoproteólisis en Ag43. Esto no implica que dicho sitio no participe de ninguna manera en el procesamiento, pudiendo actuar como un mecanismo auxiliar de corte alternativo^{[1],[3]}, pero sí quiere decir que no es una secuencia esencial para que la autoproteólisis. En base a los resultados obtenidos lo más probable es que el extremo carboxilo del DP, correspondiente a los aminoácidos entre las posiciones 500 y 551, contenga residuos catalíticos que forman el sitio activo ya sea total o parcialmente, pudiendo haber una acción conjunta con cadenas laterales de la UT^{[2],[3]}.

Este descubrimiento concuerda con la información inferida a partir del comportamiento de los distintos sistemas de expresión basados en Ag43 que fueron revisados en el Marco Teórico (Figura 2). Se corrobora la existencia de aminoácidos en el DP que están involucrados en su procesamiento, a la vez que se refuta el supuesto tradicional de que dichos residuos eran los correspondientes al motivo aspartil-proteasa. Los resultados coinciden con el descarte de los primeros 150 aminoácidos de la subunidad α como zona de localización del sitio activo, planteamiento previo al diseño por el cual los segmentos del DP considerados en las variantes desarrolladas inician desde Ag43_200, omitiendo a “Ag43_100” y “Ag43_150”; Ag43_wt se incluye como referencia de la proteína nativa. Finalmente, que los residuos responsables del corte se encuentren ya sea en el sitio propuesto en literatura o a partir de la posición 455 también se cumple, puesto que el segmento aquí propuesto se encuentra dentro de ese rango.

Dado que al hablar de liberación se engloban dos fenómenos que no se pueden distinguir con las herramientas utilizadas, el aumento de la fluorescencia en el sobrenadante se puede deber a cada uno por separado o ambos a la vez. Se podría dar el caso de sólo explicarse por el corte, con DP que son secretados apenas se produce la proteólisis, sin asociarse nunca a la UT. Podría ser también que el corte ocurra sólo en un momento dado y a partir de él todo el aumento sea producto de disociación gradual. Es también posible (y lo más probable) que ambos mecanismos actúen en conjunto y con distintas velocidades, generando así la curva de liberación propia de cada variante. Lo

único que se tiene por seguro es que, para haber liberación, tiene que haber ocurrido el corte entre dominios.

La realización de los análisis en base al concepto amplio que es la liberación se fundamenta en el enfoque utilizado para desarrollar este estudio que, si bien fue a nivel de laboratorio, se llevó a cabo privilegiando el aspecto ingenieril por sobre el científico. Esto quiere decir que se busca una comprensión global y menos detallada, orientada a la aplicación del objeto de estudio, por sobre una comprensión profunda y exacta del fenómeno en cuestión. Por esta razón se buscó encontrar la zona responsable de la autoproteólisis más que los aminoácidos puntuales y también por qué se usaron las curvas directamente como medio de comparación y no se calcularon parámetros para el contraste a partir de ellas. Por lo mismo se justifica también el uso de la fluorescencia como la unidad para cuantificar el DP más que buscar su conversión a una unidad de concentración de proteínas.

La ventaja principal de EGFP es la sencillez de su medición, sin requerir procesamiento antes de cuantificar, lo que se vuelve especialmente útil al trabajar con varias muestras en paralelo como se hizo para la elaboración de las curvas. Una limitación en su utilización es el supuesto que se hace de que todas las moléculas fluorescerán con la misma intensidad, manteniéndose efectivamente la relación 1:1 entre el valor registrado y el número de moléculas de DP. Si es que existe un efecto de apantallamiento entre ellas, esta relación se alteraría, pudiendo llevar a interpretaciones erradas de los resultados. Se comprobó que la fluorescencia es lineal con la densidad celular hasta $OD_{600}=4$ y, por lo tanto, no existe un efecto de apantallamiento en este rango (datos no se muestran), pero no hay certeza de si se mantiene a una mayor densidad celular. Principalmente por la variación respecto al pH se podría haber hecho una mejor selección del reportero utilizado, pudiendo incluso seleccionar una variante de EGFP diseñada para mantener su nivel de fluorescencia en el rango utilizado^[25].

Dado que este estudio corresponde a la etapa inicial de un proyecto, es lógico que existan bastantes proyecciones a partir de él. Respecto a las más inmediatas, se hace necesario encontrar una alternativa para la activación de la secreción. Existen distintas opciones para seguir: una consiste en profundizar el análisis realizado para encontrar los aminoácidos puntuales que participan de la catálisis, con el fin de evaluar la aplicación de

Ingeniería de Proteínas buscando invertir la influencia del pH sobre su actividad, en caso de ser la proteólisis el principal mecanismo responsable de la tasa de liberación. De no serlo, los esfuerzos se podrían centrar en los residuos de los que depende la interacción no covalente buscando el mismo objetivo. Está también la posibilidad de estudiar la respuesta de la liberación a valores de pH básicos, para lo que se podrían utilizar las mismas proteínas quiméricas pues la fluorescencia de EGFP es estable en dicho rango^{[24],[25]}. Alejándose más de la propuesta actual, se podría buscar otra variable de control para inducir la secreción que siga en la línea de la propuesta, como la fuerza iónica. Incluso antes de todas ellas, se encuentra la revisión del diseño experimental utilizado, con el fin de encontrar la razón de las respuestas contrapuestas obtenidas desde células y sobrenadantes, y así asegurar que el efecto sobre el comportamiento aquí descrito es correcto. Lo único que no se sugiere cambiar es la proteína autotransportadora elegida como base del sistema de expresión, ya que de acuerdo con la literatura es la mejor alternativa existente.

5. Conclusiones

En el estudio de la actividad autoproteolítica del antígeno 43 se generaron ocho variantes basadas en la proteína nativa que sirvieron para definir el segmento del dominio pasajero donde se encuentran sus aminoácidos catalíticos. Las proteínas quiméricas diseñadas se expresaron con un correcto plegamiento y localización para todos los casos, de los que siete fueron reproducibles a largo plazo.

El sitio activo propuesto en literatura, situado entre los aminoácidos 384 y 395 respecto a la secuencia de la preproteína, resultó no ser el responsable de la autoproteólisis, refutando la hipótesis planteada.

La zona necesaria para producir el corte entre el DP y la UT se encuentra entre los residuos 500 y 552, correspondiente al extremo carboxilo del dominio pasajero, lo que se determinó en base a la evidencia propia de este trabajo y se corroboró con lo reportado previamente por distintos autores.

La inclusión de EGFP como reportero en las variantes permitió elaborar curvas de liberación de manera rápida y sencilla a través de la medición de su fluorescencia. Sin embargo, su selección no fue ideal para el rango de pH entre 7 y 4 por la sensibilidad del cromóforo a la concentración de protones, obligando al descarte de los datos registrados en el medio más ácido.

La liberación del dominio pasajero desde la membrana externa hacia el medio extracelular es efectivamente afectada por el pH de este último, disminuyendo a medida que aumenta la acidez. Esto implica que el control de la secreción en el sistema de expresión planteado no puede realizarse mediante adición de protones utilizando la secuencia nativa de la proteína estudiada.

Las ventajas que presenta el antígeno 43 respecto a otras autotransportadoras la hacen difícil de reemplazar, por lo que para el desarrollo de la plataforma convendría buscar otra alternativa para inducir la liberación. Dentro de éstas se encuentran la modificación de la secuencia nativa mediante ingeniería de proteínas para invertir su respuesta a la disminución del pH, el estudio del comportamiento de la liberación en medios básicos o la utilización de una variable de control diferente.

6. Bibliografía

- [1] Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **6**, 370–378 (1998).
- [2] Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C. & Schembri, M. A. Autotransporter proteins: Novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**, 163–172 (2007).
- [3] Leyton, D. L., Rossiter, A. E. & Henderson, I. R. From self sufficiency to dependence: Mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 213–225 (2012).
- [4] Muñoz-Gutiérrez, I., Moss-Acosta, C., Trujillo-Martinez, B., Gosset, G. & Martinez, A. Ag43-mediated display of a thermostable b-glucosidase in Escherichia coli and its use for simultaneous saccharification and fermentation at high temperatures. *Microb. Cell Fact.* **13**, 106 (2014).
- [5] Rossiter, A. E. *et al.* The essential β -barrel assembly machinery complex components bamd and bama are required for autotransporter biogenesis. *J. Bacteriol.* **193**, 4250–4253 (2011).
- [6] Henderson, I. R. & Owen, P. The major phase-variable outer membrane protein of Escherichia coli structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving dam and OxyR. *J. Bacteriol.* **181**, 2132–2141 (1999).
- [7] Kjærgaard, K., Hasman, H., Schembri, M. A. & Klemm, P. Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J. Bacteriol.* **184**, 4197–4204 (2002).
- [8] Wargacki, A. J. *et al.* An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae. *Science (80-.).* **335**, 308–313 (2012).
- [9] Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Mehta, D. P. & Freeze, H. H. *Handbook of Proteolytic Enzymes. Handbook of Proteolytic Enzymes* **1**, (2013).
- [10] Pardesi, S. R., Dandekar, S. P., Jamdar, S. N. & Harikumar, P. Identification and purification of an aspartic proteinase from human semen. *Indian J. Clin. Biochem.* **19**, 84–90 (2004).
- [11] Hsiao, N. W. *et al.* Purification and characterization of an aspartic protease from the Rhizopus Oryzae protease extract, peptidase R. *Electron. J. Biotechnol.* **17**, 89–94 (2014).

- [12] Rocha, G. F. *et al.* Isolation and characterization of an Aspartic Protease from *Salpichroa organifolia* Fruits. *Protein Pept Lett* **22**, 379–390 (2015).
- [13] Ramesh, B., Sendra, V. G., Cirino, P. C. & Varadarajan, N. Single-cell characterization of autotransporter-mediated *Escherichia coli* surface display of disulfide bond-containing proteins. *J. Biol. Chem.* **287**, 38580–38589 (2012).
- [14] Huang, F. Y. *et al.* Bacterial surface display of endoglin by antigen 43 induces antitumor effectiveness via bypassing immunotolerance and inhibition of angiogenesis. *Int. J. Cancer* **134**, 1981–1990 (2014).
- [15] Lagos-Susaeta, D. Producción De Ácido Pirúvico Y Gliceraldehído a Partir De Alginato Mediante Inmovilización Enzimática En Superficie Celular. (Universidad de Chile, 2016).
- [16] Huang, F. Y. *et al.* Antigen 43/Fcε3 chimeric protein expressed by a novel bacterial surface expression system as an effective asthma vaccine. *Immunology* **143**, 230–240 (2014).
- [17] Polgar, L. the Mechanism of Action of Aspartic Proteases Involves Push-Pull Catalysis. *Febs Lett.* **219**, 1–4 (1987).
- [18] Lagos-Susaeta, D. Primer design tool for Gibson Assembly. Disponible en: <http://pdtga.cofla.cl>.
- [19] Thermo Scientific. Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit. *Manual* 1–9 (2014). doi:K0502
- [20] Thermo Scientific. Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit. 1–11 (2015). doi:K0692
- [21] New England Biolabs. Phusion Polymerase Protocol. 1–2 (2013).
- [22] Invitrogen Detection Technologies. T4 DNA Ligase. *Product Catalogue* 1–4 (2014).
- [23] NEB. DNA Modifying Enzymes Gibson Assembly Master Mix. 20 (2013).
- [24] Campbell, T. N. & Choy, F. Y. M. The effect of pH on Green Fluorescent Protein: a brief review. *Mol. Biol. Today* **2**, 1–4 (2001).
- [25] Roberts, T. M. *et al.* Identification and Characterisation of a pH-stable GFP. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).

7. Anexos

7.1. Recetas de *buffer* isotérmico 5X y Master Mix 2X

Tabla 8: Concentración de componentes de *buffer* isotérmico 5X. Reactivos deben ser estériles y se disuelven en agua destilada autoclavada libre de nucleasas.

Reactivo	Concentración final
PEG 8000	21% (p/v)
Tris-HCl pH 7.5	500 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	50 mM
dATP	1 mM
dTTP	1 mM
dCTP	1 mM
dGTP	1 mM
NAD ⁺	5 mM

Tabla 9: Concentración de componentes de Master Mix 2X. Reactivos se disuelven en agua destilada autoclavada libre de nucleasas.

Reactivo	Concentración final
Buffer isotérmico 5X	26,67% (v/v)
T ₅ Exonucleasa	0,005 U/ μ l
Phusion®	0,033 U/ μ l
Taq Ligasa	5,333 U/ μ l

7.2. Protocolos de obtención y transformación de células quimiocompetentes

- Células quimiocompetentes de *E. coli*:
 1. Preinóculo de 5 ml de LB a 37°C O/N.
 2. Al día siguiente, inocular 500 ml de LB. Incubar a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.2 y 0.3 (alrededor de 90 minutos).
 3. Incubar en hielo por 10 minutos.
 4. Centrifugar a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
 5. Resuspender pellet en 125 ml de MgCl₂ 0.1 M. Incubar en hielo por 5 minutos.
 6. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
 7. Resuspender *pellet* en 25 ml de CaCl₂ 0.1 M. Incubar en hielo por 20 minutos.
 8. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

9. Resuspender *pellet* en 10 ml de 85% (v/v) CaCl₂ 0.1 M; 15% glicerol.
 10. Alicuotar en 100 µl. Guardar a -80°C.
- Transformación de células quimiocompetentes:
 1. Descongelar células en hielo.
 2. Agregar ADN e incubar unos minutos más en hielo.
 3. Shock térmico a 42°C por 1 minuto.
 4. Agregar 900 µl de LB e incubar con agitación de 200 rpm por 1 hora a 37°C.
 6. Sembrar en placa de LB con antibióticos correspondientes.

7.3. Recetas de medios de cultivo y buffers para proteínas

7.3.1. Medio M9-CAGlu

Tabla 10: Concentración de componentes de medio M9-CAGlu. Todos los reactivos se preparan como soluciones estériles por separado que se disuelven en agua destilada estéril siguiendo el orden en que aparecen. Todos se autoclavan, excepto por solución de glucosa que debe ser autoclavada.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final
Casaminoácidos	10% (p/v)	1% (p/v)
Glucosa	20% (p/v)	2% (p/v)
Sales M9 10X	10X	1X
MgSO ₄	1 M	2 mM
CaCl ₂	1 M	0,1 mM

Tabla 11: Concentración de componentes de sales M9 10X. Reactivos se disuelven en agua destilada y luego se autoclava.

Reactivo	Concentración final
Na ₂ HPO ₄	0,48 M
KH ₂ PO ₄	0,22 M
NaCl	0,09 M
NH ₄ Cl	0,19 M

7.3.2. Medio TB

Tabla 12: Concentración de componentes de medio TB. Reactivos se disuelven en agua destilada y luego se autoclava. Buffer se añade después, por lo que mezcla se afora con el 90% del volumen final.

Reactivo	Concentración final
Extracto de levadura	24 g/l
Triptona	20 g/l
Glicerol	4 ml/l
Buffer fosfato 10X	1X

Tabla 13: Concentración de componentes de buffer fosfato 10X. Reactivos se disuelven en agua destilada y luego se autoclava.

Reactivo	Concentración final
KH_2PO_4	0,17 M
K_2HPO_4	0,72 M

7.3.3. PBS

Tabla 14: Concentración de componentes de PBS. Reactivos se disuelven en agua destilada, pH se ajusta a 7,4 con HCl y luego se autoclava.

Reactivo	Concentración final
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
NaH_2PO_4	10 mM
K_2HPO_4	1,8 mM

7.3.4. Fosfato-acetato 10X

Tabla 15: Concentración de componentes de buffer fosfato-acetato 10X. Reactivos se disuelven en agua destilada y luego se autoclava.

Reactivo	Concentración final
KH_2PO_4	0,17 M
K_2HPO_4	0,72 M
CH_3COONa	0,89 M

7.4. Protocolo de tratamiento con tripsina

1. Centrifugar 2 ml de cultivo a 7.000 rpm por 1 minuto.
2. Resuspender *pellet* en 2 ml de PBS.
3. Centrifugar a 7.000 rpm por 1 minuto.
4. Resuspender *pellet* en 2 ml de PBS.
5. Tomar dos alícuotas de 400 μ l y a una de ellas agregarle 5 μ l de una solución de PBS con tripsina 10 mg/ml.
6. Incubar ambas alícuotas por 10 minutos a 37°C.
7. Centrifugar ambas alícuotas a 7.000 rpm por 1 minuto.
8. Separar sobrenadantes y pellets para ambas alícuotas.
9. Centrifugar sobrenadantes de ambas alícuotas a velocidad máxima por 2 minutos.
10. Resuspender pellets de ambas alícuotas en 400 μ l de PBS.
11. Centrifugar a 7.000 rpm por 1 minuto.
12. Resuspender pellets de ambas alícuotas en 400 μ l de PBS.

7.5. Tratamiento con BugBuster®

1. Centrifugar a 7.000 rpm por 1 minuto 2 ml de cultivo con OD₆₀₀ = 1 (o un volumen equivalente).
2. Resuspender *pellet* en 50 μ l de BugBuster 1X (10X diluido con Tris 50 mM pH 8).
3. Agregar 0,25 μ l de lisonasa e incubar a temperatura ambiente por 10 a 20 minutos.
4. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C y descartar sobrenadante.
5. Resuspender *pellet* en 15 μ l de *buffer* de carga 5X.

7.6. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las variantes generadas

- Ag43_wt – 500: En la secuencia nucleotídica a continuación se indican los distintos dominios de las construcciones a través del color de letra, correspondiente al mismo que se usa en esquematizaciones para cada uno: PS en verde oscuro, EGFP en verde claro, DP en rojo y TU en azul. Las primeras 150 bases del extremo 5' del segmento del DP de cada construcción se indica con el color del fondo, correspondiente al mismo que se usa en las curvas de liberación para cada uno: Ag43_200 en naranja, 250 en verde, 300 en amarillo (no tiene curvas), 350 en turquesa, 400 en azul, 450 en morado y 500 en rosado. Motivo aspartil-proteasa en letra amarilla; sitio de reconocimiento de *SacI* subrayado.

ATGAAACGACATCTGAATACCTGCTACAGGCTGGTATGGAATCACATGACGGGCGCTTTCGTGGTTGCCTCCGAACTGGCCCGGCACGGGGTAAAC
GTGGCGGTGTGGCGGTTGCACTGTCTCTTGCCGAGTCACGTCACTCCCGGTGCTGGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGT
GCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTG
AAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACC
ACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTG
GAGTACAACCTACAACAGCCACAAGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG
GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTCTGCCCCGACAACCCTACCTGAGCACCAGTCCGC
CCTGAGCAAGAGCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTCTACAAG
GCTGACATCGTGTGCACCCGGGAGAAACCGTGAACGGCGGAACACTGGCAAATCATGACAACAGATGTCTTCGGTACGACCAACGGAATGACCA
TCAGTACCGGGCTGGAGTATGGGCCGATAACGAGGCCAATACCGGCGGGCAATGGGTACAGGATGGCGGAACAGCCAACAAAACGACTGTACCAG
TGGTGGTCTCAGAGAGTGAACCCCGTGAAGTGTCTCAGACCGGTTATCAGTCCCGGAGGCGGACAGACCTTCAGGGACGGGCTGTGAACACC
ACGCTGAATGGTGGCGAACAGTGGATGCATGAGGGGGCGATAGCCACAGGAACCGTATTAATGATAAGGGCTGGCAGGTCGTCAAGCCCGGTACAG
TGGCAACGGATACCGTGTTAATACCGGGGCGAAGGGGGACCGGATGCGAAAAACGGTGATACCGGGCAGTTTGTTCGCGGGGATGCCGTACGCAC
AACCATCAATAAAAAACGGTCGCCAGATTGTGAGAGCTGAAGGAACGGCAAATACCACCTGTGGTTTATGCGGGCGGCGACAGACTGTACATGGTCAC
GCACCTGGATACCACGCTGAATGGGGATACCAGTATGTGCACAACGGCGGTACAGCGTCTGACACTGTTGTGAACAGTGACGGCTGGCAGATTGTCA
AAAAACGGGGTGTGGCCGGGAATACCACCGTAAATCAGAAGGGCAGACTGCAGGTGGACGCCGGTGGTACAGCCACGAATGTCAACCTGAAGCAGGG
CGGCGCACGTGGTTACCAGTACGGCTGCAACCGTTACCGGCATAAACCGCCTGGGAGCATTCTCTGTTGTGGAGGGTAAAGCTGATAATGTCGTACTG
GAAAATGGCGGACGCTGGATGTGCTGACCGGACACACAGCCACTAATACCCCGTGGATGATGGCGGAACGCTGGATGTCCGCAACGGTGGCACCG
CCACCACCGTATCCATGGGAAATGGCGGTGACTGCTGGCCGATCCCGGTGCCGCTGTGAGTGGTACCAGGAGCGACGGAAAGGCATTGAGTATCGG
AGGCGGTACGGCGGATGCCCTGATGCTGAAAAAGGCAGTTTATTACCGCTGAACGCCGGTGTACGGCCACGGATACCACCGTAAATGGCGGACTG
TTCACCGCCAGGGCGGCGACACTGGCCGGCACCCACCGCTGAATAACGGCGCCATACTTACCCTTTCGGGAAGACGGTGAACAACGATAACCTGA
CCATCCGTGAAGGGGATGCACTCCTGCAGGGAGGCTCTCTCACCGGTAACGGCAGCGTGGAAAAATCAGGAAGTGGCACACTCACTGTGACGAAAC
CACACTCACCCAGAAAGCCGTCACCTGAATGAAGGCAGCTGACGCTGAACGACAGTACCGTACCACGGATGTCATTGCTCAGCGCGGTACAGCC
CTGAAGCTGACCGGCAGCACTGTGCTGAACGGTGCCATTGACCCACGAATGTCACTCTCGCCTCCGGTGCCACCTGGAATATCCCGGATAACGCCA
CGGTGCAGTCCGTTGGTGGATGACCTCAGCCATGCCGGACAGATTTCATTTACCTCCACCCGCACAGGGAAGTTCGTACCGGCAACCCTGAAAGTGAA
AACCTGAACGGACAGAATGGCACCATCAGCTGCGGTGTACGCCCGGATATGGCACAGAACAATGCTGACAGACTGGTCAATTGACGGCGGCAGGGCA
ACCGGAAAAACATCCTGAACCTGGTGAACGCCGGCAACAGTGCCTCGGGGCTGGCGACCAGCGGTAAGGGTATTCAGGTGGTGAAGCCATTAAAG
GTGCCACCACGGAGGAAGGGGCCTTTGTCCAGGGGAACAGGCTGCAGGCCGGTGCCTTAACTACTCCCTCAACCGGGACAGTGTGAGAGCTGGTA
TCTGCGCAGTGAAAATGCTTATCGTGCAGAAGTCCCCCTGTATGCCTCCATGTGACACAGGCAATGGACTATGACCGGATGTTGGCAGGCTCCCGC
AGCCATCAGACCGGTGTAATGGTGAACAACAGCGTCCGCTCAGCATTACAGGGCGGTCACTCTCGGTACAGATAACAATGGCGGTATTGCCCGTG
GGGCCACGCCGAAAGCAGCGGCAGCTATGGATTGCTCCGCTGAGAGGGTACCTGATGAGAACAGAGGTTGCCGGTATGCTGTGACCGCGGGGGT
ATATGGTGTGCTGGCCATTCTTCGGTTGATGTTAAGGATGATGACGGCTCCCGTGCCGGCACGGTCCGGGATGATGCCGGCACGCTGGGCGGATAC
CTGAATCTGGTACACAGTCTCCGGCCTGTGGGCTGACATTGTGGCACAGGGAACCCGCCACAGCATGAAAGCGTCACTGGACAATAACGACTTCC
GCGCCCGGGGCTGGGCTGGCTGGGCTCACTGGAAACCGGCTGCCCTCAGTATCACTGACAACCTGATGCTGGAGCCACAACCTGCAGTATACCTG
GCAGGGACTTTCCCTGGATGACGGTAAGGACAACGCCGGTATGTGAAGTTCGGGCATGGCAGTGCACAACATGTGCGTGCAGGTTTCCGCTCTGGC
AGCCACAACGATATGACCTTTGGCGAAGGCACCTCATCCCGTGCCCCCTGCGTGACAGTGCAAAACACAGTGTGAGTGAATTACCGGTGAACCTGGT
GGGTACAGCCTTCTGTTATCCGCACCTCAGCTCCCGGGAGATATGCGTGTGGGACTTCCACTGCAGGCAGCGGGATGACGTTCTCTCCCTACA
GAATGGCACATCACTGGACCTGCAGGCCGACTGGAAGCCCGTGTCCGGGAAAATATCACCTGGGCGTTCAGGCCGGTTATGCCACAGCGTCAGC
GGCAGCAGCGCTGAAGGGTATAACGGTACGGCCACACTGAATGTGACCTTCTGA

- Ag43_450*: Se utilizan los mismos códigos que para la secuencia anterior, a excepción de la letra negra, que indica la secuencia extra.

ATGAAACGACATCTGAATACCTGCTACAGGCTGGTATGGAATCACATGACGGGCGCTTTCGTGGTTGCCTCCGAACTGGCCCGCGCACGGGGTAAAC
 GTGGCGGTGTGGCGGTTGCACTGTCTCTGCGCCAGTCCAGTCACTCCCGGTGCTGGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGTTGGT
 GCCATCTCGGTGAGCTGGACGGCGAGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTG
 AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACC
 ACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
 CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGACAAGCTG
 GAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG
 GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGC
 CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTCTACAAG
 ACCACCACGCTGAATAACGATGGACGAGCTCTACAAGACCACCACGCTGAATGGACGAGCTCTACAAGACCACCACGCTGAATATGGACGAGCTCTA
 CAAGACCACCACGCTGAATATGGACGAGCTCTACAAGACCACCACCCTGAATGGACGAGCTCTACAAGACCACCACGCTGAATATGGACGAGCTCTA
 TACCCCTTTCGGGGAAGACGGTGAACAACGATACCCTGACCATCCGTGAAGGCGATGCACTCTGCAGGGAGGCTCTCTCACCGGTAACGGCAGCGTG
 GAAAAATCAGGAAGTGGCACACTCACTGTGAGCAACACCACACTCACCCGAAAGCCGTCAACCTGAATGAAGGCAGCTGACGCTGACGACAGTA
 CCGTCAACCAGGATGTCAATTGCTCAGCGCGGTACAGCCCTGAAGCTGACCGGCAGCACTGTGCTGAACGGTGCATTTGACCCACGAATGTCACTCT
 CGCTCCGGTGCACCTGGAATATCCCCGATAACGCCACGGTGCAGTCCGGTGGTGGATGACCTCAGCCATGCCGGACAGATTCATTTACCTCCACC
 CGCACAGGGAAGTTCGTACCGGCAACCCTGAAAGTGAAAAACCTGAACGGACAGAATGGCACCATCAGCTGCGTGTACGCCCGGATATGGCAGACA
 ACAATGCTGACAGACTGGTCAATTGACGGCGGCAGGGCAACCGGAAAAACCATCTGAACCTGGTGAACGCCGGCAACAGTGCCTCGGGGCTGGCGAC
 CAGCGGTAAGGGTATTAGGTGGTGAAGCCATTAACGGTGCCACCACGGAGGAAGGGCCCTTTGTCCAGGGGAACAGGCTGCAGGCCGTTGCCTTT
 AACTACTCCCTCAACCGGACAGTGTGAGAGCTGGTATCTGCGCAGTGAAAATGCTTATCGTGCAGAAGTCCCCCTGTATGCCTCCATGTGCTGACAC
 AGGCAATGGACTATGACCGGATTGTGGCAGGCTCCCGCAGCCATCAGACCAGGTGTAATGGTGAACAACAGCGTCCGTCTCAGCATTACGGGCGG
 TCATCTCGGTACGATAACAATGGCGGTATTGCCCGTGGGGCCACGCCGAAAGCAGCGGCAGCTATGGATTGCTCCGCTGGAGGGTACCTGATG
 AGAACAGAGGTTGCCGATGTCTGTGACCGCGGGGTATATGGTGTCTGCTGGCCATTCTTCCGTTGATGTTAAGGATGATGACGGCTCCCGTGCCG
 GCACGGTCCGGATGATGCCGGCAGCTGGGCGGATACCTGAATCTGGTACACACGCTCCTCCGGCCTGTGGGCTGACATTGTGGCACAGGGAACCCG
 CCACAGCATGAAAGCGTCACTCGGACAATAACGACTTCCCGCCCGGGGCTGGGGCTGGCTGGGCTCACTGGAACCCGCTGCCCCCTCAGTATCACT
 GACAACCTGATGCTGGAGCCACAACCTGCAGTATACCTGGCAGGACTTTCCCTGGATGACGGTAAGGACAACGCCGGTATTGTGAAGTTCGGGCATG
 GCAGTGCACAACATGTGCGTGGCGGTTTCCGTCTGGGCGCCACAACGATATGACCTTTGGCGAAGGCACCTCATCCCGTCCCCCTGCGTGACAG
 TGCAAAACACAGTGTGAGTGAATTACCGGTGAACCTGGTGGGTACAGCCTTCTGTTATCCGCACCTTCAGCTCCCGGGGAGATATGCGTGTGGGGACT
 TCCACTGCAGGCAGCGGGATGACGTTCTCTCCCTCACAGAATGGCACATCACTGGACCTGCAGGCCGGACTGGAAGCCCGTGTCCGGGAAAAATATCA
 CCCTGGGCGTTCAGGCCGTTATGCCACAGCGTCAGCGGCAGCAGCGCTGAAGGGTATAACGGTCAGGCCACACTGAATGTGACCTTCTGA

- Ag43_wt – 500: En la secuencia aminoacídica a continuación se indican los distintos dominios de las variantes a través de distinto color de letra, correspondiente al mismo que se usa en esquematizaciones para cada uno: PS en verde oscuro, EGFP en verde claro, DP en rojo y TU en azul. Los primeros 50 residuos del extremo amino del segmento del DP de cada variante se indican con el color del fondo, correspondiente al mismo que se usa en las curvas de liberación para cada uno: Ag43_200 en naranja, 250 en verde, 300 en amarillo (no tiene curvas), 350 en turquesa, 400 en azul, 450 en morado y 500 en rosado. Motivo aspartil-proteasa en letra amarilla.

MKRHLNTCYRLVWNHMTGAFVVASELARARGKRGVAVALSAAVTSIPVLAMKRHLNTCYRLVWNHMTGAFVVASELARARGKRGVAVALSAAVTSIPVLAMVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFVSSEGEEDATYKGLTLKFICTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDITLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQVLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKADIVVHPGETVNGGTLANHDNQIVFGTTNGMTISTGLEYPDNEANTGGQWVQDGGTANKT'VT'SGGLQ'RVNPGGSVSDTVISAGGGQSLQG RAVN'T'LNGGEQWHEGAIATGTVINDKGWQVVKPGTVATD'TVNT'GAEGGPAEN'GDT'GQFVRGDAVRTTINKNGRQIVRAEGTAN TTVVYAGGDQTVHGHALD'T'LNGGYQYVHNGGTASD'TVNSD'GWQ'IVKNGGVAGN'T'FVNQ'KGR'LVQ'DAG'GTATN'VTLKQGGALV'TST AATV'TGINRLGAFSVVEGKADNVVLENGGR'LDVLTGHTATNTRVDDGGTLDVRRNGGTATTVSMGN'GGVLLADSGAAVSGT'RS'DGKAF SIGGGQADALMLEKSSFTLNAGDTATD'TTVNGGLFTARGGTLAGT'T'LNNGAILT'LSGKT'VNND'TLPIREGDALLQGGSLTGN'GSV EKS'GS'GTLTVSNTT'LQKAVNLNEGTLT'LNDSTV'TTDVIA'QRGTAL'KLTGSTV'LNGAID'PTNVTLASGATWNI'PDNATVQSVVDDLS HAGQIHFTSTRTGK'FVPATLKVKNLNGQNGTISLVRV'PDMAQNNADRLVIDGGRATGKTILNLVNAGNSASGLATSGKGIQVVEAIN GATTEGAFVQGNRLQAGAFNYSLNRDSESWYLRSEAYRAEVPLYASMLTQAMDYDRIVAGSRSHQ'TGVNGENNSVRLSIQGGHL GHDNNGGIARGATPESGSYGFVRLEGLMRTEVAGMSV'TAGVYGAAGHSSVDVKDDGSRAGTVRDDAGSLGGYLN'LVHTSSGLWA DIVAQ'TRHSMKASSDNDFRARGWGLGSLETGLPFSITDNLMLPQLQYTWQGLSLDDGKDNAGYVKFGHGSQAQHVRAFRLGSH NDMTFEGE'TSSRAPLRDSAKHSVSEL'PVN'WWWQPSVIRTFSSR'GDMRVGTSTAGSGMT'FSPSQNGTSLDLQAGLEARVRENITLGVQ AGYAHSVSGSSAEGYNGQATLNVTF

7.7. Heurística para la inclusión de significancia estadística en curvas de liberación

Para incorporar la significancia estadística al confeccionar las curvas se siguió la heurística planteada en la tabla a continuación, a partir de la cual se decide si cada punto conserva su valor medido o se le asigna el correspondiente a puntos anteriores. En este caso $n = 1$ corresponde a la medición hecha al minuto 0 y se tiene hasta $n = 5$ para el minuto 80.

Medición (f_n)	Diferencia con significancia estadística entre:			Valor asignado
	f_n y f_{n-1}	f_{n-1} y f_{n-2}	f_n y f_{n-2}	
$n = 1$	-	-	-	f_1
$n = 2$	Sí	-	-	f_2
	No	-	-	f_1
$n \geq 3$	Sí	Sí	Sí	f_n
			No	f_{n-2}
		No	Sí	f_n
			No	
	No	Sí	Sí	f_{n-1}
			No	f_n
		No	Sí	
			No	$f_{n-1} - f_{n-2}$