



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FACTOR ACELERADOR DEL
DECAIMIENTO DE LA CONVERTASA RECOMBINANTE DE
*Trypanosoma cruzi***

Yael Andrea Mendel Reyes

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: GALIA RAMIREZ TOLOZA

Universidad de Chile
SANTIAGO, CHILE

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FACTOR ACELERADOR DEL
DECAIMIENTO DE LA CONVERTASA RECOMBINANTE DE
*Trypanosoma cruzi***

Yael Andrea Mendel Reyes

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA: GALIA RAMIREZ

.....

PROFESOR CONSEJERO: GONZALO CABRERA

.....

PROFESOR CONSEJERO: SERGIO BUCAREY

.....

SANTIAGO, CHILE

2016

MEMORIA DE TÍTULO

“EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FACTOR ACELERADOR DEL DECAIMIENTO DE LA CONVERTASA RECOMBINANTE DE *Trypanosoma cruzi*”

“EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT *Trypanosoma cruzi* CONVERTASE DECAY-ACCELERATING FACTOR”

Yael Mendel Reyes *

*Unidad de Parasitología, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado de forma parcial por los Proyectos FONDECYT de Iniciación: N°11110251 y N°1130113.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a aquellos que fueron parte de este proceso, entregándome su apoyo, enseñanza y cariño, en especial, a mis padres, Renato y Erika, que, con sus sabios consejos y ejemplo de constancia, me animaron a nunca darme por vencida. Gracias por tanto, por todos los momentos felices y por todos los momentos de contención a lo largo de mi vida, por ustedes soy lo que soy ahora y este es un logro tanto mío como de ustedes, los quiero muchísimo.

A mis hermanas, Ariela y Sandra y cuñados Gerardo y Claudio, por siempre estar ahí para mí, por ser parte fundamental de mis logros y avances. A mi hermana Tali, por ser la mejor compañera que alguien puede tener, por no ser solo mi hermana, sino ser también mi amiga, por compartir millones de alegrías juntas.

A mi pololo, Gerardo Marquard, por sus consejos, por esas largas conversaciones donde me decías que tenía que confiar en mí, por esos ratos de ñoñez, por ser mi kavala en las otras dos presentaciones, por escuchar mis ensayos, no hubiera sido lo mismo sin ti.

A mi tío Claudio Pincus por su constante apoyo y confianza, esto no hubiera sido posible sin tu ayuda.

A los chicos del laboratorio en la Facultad de Medicina, Dra. Lucía Valenzuela, Dra. Sofía Sepúlveda, Dr. Gonzalo Cabrera, Santiago Ramírez y Christian Hidalgo, por compartir su laboratorio, sus constantes enseñanzas y cariño, en este tiempo se convirtieron en parte de mi familia y estaré eternamente agradecida de todo lo que viví con ustedes.

A la Dra. Galia Ramírez, por permitirme desarrollar este proyecto junto a ella. A los “marranos”, porque pese a que estuvimos poco tiempo juntos, agradezco el cariño y las enseñanzas, sobre todo a Pablo Galdames, que con paciencia me enseñó cómo trabajar en una campana sin morir en el intento. A Sra. Patricia Álvarez por siempre jugársela por mí, por tener una paciencia infinita y la mejor de las disposiciones.

A mis amigos Belén, Natalia, Constanza, Ignacio, Nicole, Vivian, Michael, Isaac, gracias por su cariño, compañía, apoyo y consejos, son lo más.

Y a todos aquellos que formaron parte de este proceso y que no están nombrados en esta dedicatoria, gracias por su ayuda, consejos y momentos vividos juntos.

¡¡Al fin puedo decir que soy Médico Veterinario!!

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, protozoo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, es el agente causal de la enfermedad de Chagas. El principal mecanismo de transmisión de esta enfermedad es vectorial, por medio de insectos hemípteros hematófagos de la familia *Reduviidae*.

Los tripomastigotes, formas infectantes del parásito, son capaces de resistir la acción del Sistema del Complemento (C) del hospedero, importante componente efector de la respuesta inmune innata. Se describen 3 vías de activación: clásica (VC), alterna (VA) y de las lectinas (VL), las cuales se activan en forma de cascada, por lo cual el C debe ser finamente regulado, impidiendo el daño en células del hospedero. En mamíferos, una proteínas reguladoras del C es el factor acelerador del decaimiento de la convertasa (DAF). DAF actúa inactivando las proteínas C3 y C5 convertasas de la VC y VA, acelerando su decaimiento.

Se ha reportado que *T. cruzi* expresa factores reguladores del C similares a los del hospedero mamífero, inhibiendo su activación. Entre estos, se ha identificado la expresión de una proteína con función similar a DAF humana (T-DAF), de la cual sólo se han expresado parcialmente algunos fragmentos y se desconoce gran parte de sus funciones.

En esta memoria de título se amplificó e insertó la secuencia nucleotídica codificante para la proteína de *T. cruzi* T-DAF en un vector de expresión de *Escherichia coli*. Utilizando bacterias transformadas con el plasmidio generado, se expresó y purificó en condiciones nativas la proteína recombinante T-DAF y se caracterizó su estructura tridimensional mediante un modelamiento *in silico*.

Palabras clave: *T. cruzi*, Sistema del Complemento, DAF, T-DAF.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, protozoan belonging to the Trypanosomatidae family, is the causative agent of Chagas disease. The main mechanism of transmission of this disease is through blood-sucking insects belonging to the Reduviidae family.

Trypomastigotes, infectious forms of the parasite, are able to resist the action of the complement system (C), an important effector of the innate immune response in mammals. C has 3 activation pathways: classical (CP), alternative (AP) and lectin (LP) pathways. These 3 pathways are activated sequentially. For this reason, the activation of the C should be finely regulated in order to prevent damage on the host cells. In mammals, an important C regulatory proteins is the decay accelerating factor (DAF). DAF acts by inhibiting the C3 and C5 convertase proteins activation of the CP and AP, accelerating its decay.

It has been reported that the parasite expresses C regulatory proteins similar to those present in the mammalian host, inhibiting C. One of these C regulatory proteins has a similar function of human DAF (T-DAF), however, it has only been expressed partially and most of their functions are unknown.

In the present work, the nucleotide sequence coding for the protein of *T. cruzi* T-DAF was amplified and inserted into an expression vector for *Escherichia coli*. Using bacteria transformed with this vector, the recombinant protein T-DAF was expressed and purified under native conditions, and its three dimensional structure was characterized by an *in silico* modeling.

Keywords: *T. cruzi*, Complement System, DAF, T-DAF.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi, protozoo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, es el agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, patología descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Apt *et al.*, 2008). La Tripanosomiasis americana se transmite a los humanos y a más de 150 especies de mamíferos, tanto domésticos como silvestres. Estos últimos actuarían como reservorio natural del parásito. El principal mecanismo de transmisión de esta enfermedad es de tipo vectorial, por medio del depósito de deyecciones de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* infectados con *T. cruzi* sobre la piel de un mamífero susceptible. Las especies más importantes de vectores son *Triatoma infestans*, predominante en el sur de América, *Rhodnius prolixus*, predominante en el norte de Sudamérica y América Central y *Triatoma dimidiata*, predominante en el norte de Sudamérica y América Central, cuya presencia, además se extiende hasta el norte de México. Otras formas de transmisión descritas son la transfusión de sangre, el trasplante de órganos (tanto de órganos sólidos como de médula de un donante infectado), transmisión vertical transplacentaria, accidentes de laboratorio y la ingestión de comida o líquido contaminado con el protozoo (Rassi *et al.*, 2012).

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América, pero debido a migraciones de personas infectadas en la actualidad se encuentra distribuida a nivel mundial. Se estima que 8 millones de personas se encontrarían crónicamente infectadas en América, presentándose anualmente 56.000 casos nuevos y 12.000 muertes asociadas a esta patología. Además, cerca de 100 millones de personas estarían en riesgo de contraer la infección (PAHO, 2014).

Durante su ciclo de vida el parásito presenta diversas formas celulares. Dentro del tracto digestivo del vector triatomino es posible identificar dos formas celulares: los epimastigotes, forma replicativa, no infectiva y los tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva, no replicativa del parásito. Este último es eliminado junto a las deyecciones del insecto vector mientras este succiona sangre del hospedero mamífero. El parásito, al tomar contacto con heridas o mucosas, ingresa al organismo e invade diversos tipos de células nucleadas del hospedero, diferenciándose a amastigotes, forma replicativa e intracelular de

T. cruzi. Los amastigotes, luego de numerosas divisiones celulares se diferencian nuevamente a tripomastigotes, los que lisan la célula hospedera e ingresan al torrente sanguíneo y linfático, evadiendo la respuesta inmune del hospedero. Diversas indagaciones señalan que los tripomastigotes son capaces de resistir la acción del C, principal brazo efector de la respuesta inmune innata contra agentes infecciosos, lo que se ha relacionado con la sobrevivencia del parásito en el torrente sanguíneo del hospedero (Krautz *et al.*, 2000; Rassi *et al.*, 2012) y la perpetuación de la infección.

Actualmente, las drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas solo son efectivas en la fase aguda de la enfermedad y no consiguen erradicar la forma intracelular del parásito (Rassi *et al.*, 2012). Por tales motivos, es imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces e inocuas para los pacientes afectados, principalmente durante la fase crónica de la enfermedad. De esta forma, es imperativo y fundamental el estudio y entendimiento de las estrategias de evasión del sistema inmune utilizadas por el parásito, así como sus factores de virulencia.

El C de mamíferos se compone de una serie de proteínas que cumplen un importante rol inflamatorio y de defensa del hospedero mediante un rápido reconocimiento y eliminación de patógenos y/o células infectadas. Se describen 3 vías de activación de este sistema: la vía clásica (VC), la vía alterna (VA) y la vía de las lectinas (VL). Estas vías se activan en forma de cascada frente a diversas señales de peligro. La VC se activa por medio del reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo; la VL, por otro lado, posee moléculas específicas tales como la lectina de unión a manosa (MBL) o ficolinas, las cuales se asocian a los carbohidratos presentes en la membrana de patógenos. Por último, para la VA se describe una activación espontánea y continua, sin poseer una señal de peligro específica. Todas estas vías convergen en la formación del complejo de ataque a membrana (CAM) el cual promueve la ruptura de membranas y la lisis de la célula blanco (Vidya y Ward, 2011; Tapia *et al.*, 2012; Mathern y Heeger, 2015).

La activación del C debe ser regulada con el propósito de impedir el daño en células propias del hospedero. Las enzimas convertasas generadas en las diversas rutas de activación descritas previamente, pueden ser desactivadas mediante la acción de diversas moléculas, tales como el factor acelerador del decaimiento de la convertasa (DAF), el receptor 1 del C

(CR1), factor I, factor H (FH) o la proteína cofactora de membrana (MCP) (Hourcade, 2006; Tapia *et al.*, 2012; Mathern y Heeger, 2015).

DAF es una proteína de membrana de 381 aminoácidos que actúa regulando negativamente el C, inhibiendo la activación de las proteínas C3 y C5 convertasas de la VC y VA, acelerando su decaimiento y por lo tanto, evitando que los individuos sean atacados por su propio sistema inmune (Morley y Walport, 2000; Solana *et al.*, 2012; Mathern y Heeger, 2015). En humanos esta proteína fue extraída por primera vez desde el estroma de eritrocitos en el año 1982 (Nicholson-Weller *et al.*). DAF humano presenta 4 repeticiones de consenso corto (SCR) de 60 aminoácidos de longitud. Estudios realizados por Kuttner-Kondo *et al* (2001) demostró que SCR 2 y 3 son requeridas para ejercer su acción aceleradora del decaimiento de la C3 convertasa, tanto de VC como de VA, y que SCR 4 actúa sólo a nivel de la VA.

Los mecanismos por los cuales *T. cruzi* evade el C del hospedero son diversos. En la literatura se ha reportado que el parásito expresa proteínas reguladoras de C similares a los del hospedero mamífero, los cuales interferirían con las funciones de la VC, VA y VL. En el año 1993 Tambourgi *et al*, detectaron una proteína en sobrenadantes recuperados de parásitos, la cual poseía una función análoga a DAF humano. Esta proteína fue denominada T-DAF y es producida por tripomastigotes sanguíneos, de cultivo y metacíclicos. Se generaron anticuerpos policlonales y monoclonales anti-T-DAF, los que se utilizaron para el aislamiento de un clon parcial de cDNA de T-DAF desde una librería de expresión. De este clon parcial se obtuvo la secuencia nucleotídica codificante para un segmento de la proteína parasitaria, evidenciándose una alta homología de secuencia aminoacídica con algunas regiones de la proteína DAF humana (Fenton y Joiner, 1993; Tambourgi *et al.*, 1993; Tapia *et al.*, 2012).

La expresión parcial de algunos fragmentos de la proteína T-DAF, permitió catalogarla como miembro de la superfamilia *trans*-sialidasa, familia que, en conjunto con la familia de las mucinas, representa el 5% del genoma del parásito (Frasch, 2000; Krautz *et al.*, 2000).

En la actualidad se desconoce gran parte de las funciones que desempeñaría T-DAF en la superficie del parásito. El objetivo de esta Memoria de Título fue expresar, purificar y

caracterizar la proteína T-DAF recombinante en bacterias *Escherichia coli*, con la finalidad de dilucidar, en estudios futuros, algunas de las funciones de esta proteína, así como su participación en la resistencia al sistema inmune de diferentes cepas y clones de *T. cruzi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Amplificar el gen que codifica para la proteína T-DAF e insertarlo en un vector de expresión.

1.1 Amplificación de la secuencia nucleotídica codificante para la proteína T-DAF.

Mediante análisis bioinformáticos se identificó la región nucleotídica codificante completa para la proteína T-DAF en el genoma de *T. cruzi*, cepa Dm28c (*Genebank accession* ESS60956.1). A partir de dicha secuencia de 1332 pares de bases (pb) se diseñaron oligonucleótidos partidores específicos que incluyeron sitios de restricción para las enzimas *Bam* HI (rojo) y *Hind* III (azul) en los partidores sentido y antisentido, respectivamente:

- Sentido T-DAF: 5'-GC**GGATCC**ATGGCTATCGCAGGGTGTA-3'
- Antisentido T-DAF: 5'-CCCA**AAGCTT**CTAGGGGCTGTGGCAGTACCCA-3'

Utilizando como molde DNA genómico de *T. cruzi* de la cepa Dm28c, se amplificó la secuencia nucleotídica codificante para la proteína T-DAF mediante ensayos de reacción de la polimerasa en cadena (PCR). La amplificación del fragmento fue llevada a cabo utilizando 160 ng de DNA molde, MgCl₂ 50 mM, 0,2 mM de cada DNTP, 1,5 U de DNA Taq polimerasa Platinum[®] (Invitrogen) y 8 pmol de cada partidor.

Con la finalidad de estandarizar la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos partidores al DNA molde, se realizó una PCR con gradiente de temperatura. Los ciclos termales fueron: 5 minutos de denaturación inicial a 95°C, seguido por 20 ciclos a 95°C por 30 segundos, diferentes temperaturas de alineamiento (55,5°C, 56,5°C, 57,8°C, 59,4°C, 60,6°C y 61,5°C) por 30 segundos y luego, 72°C como temperatura de elongación por 1 minuto y 30 segundos. Posteriormente, se aplicaron otros 20 ciclos termales a 95°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto y 30 segundos. Finalmente, las muestras fueron incubadas a 72°C durante 3 minutos como extensión final. La visualización de los fragmentos se efectuó mediante separación electroforética en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con Gelred[®] (Biotium). Luego de determinar la temperatura óptima de alineamiento, se realizó nuevamente el ensayo de PCR, para obtener el fragmento nucleotídico deseado.

1.2 Purificación de fragmentos nucleotídicos amplificados de T-DAF desde geles de agarosa

Los fragmentos nucleotídicos codificantes para T-DAF, amplificados previamente mediante ensayos de PCR, fueron purificados a partir de geles de agarosa al 0,8% utilizando el *kit* Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.3 Inserción de la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF en el vector de clonamiento pGEM[®]-T *Easy*

La inserción de los fragmentos nucleotídicos de T-DAF en el vector de clonamiento pGEM[®]-T *Easy* (Promega) se realizó incubando el vector con el inserto en relación 1:5 respectivamente, en buffer 1X con 0,3 U de DNA ligasa T₄ (Promega) durante toda la noche a 4°C.

La inserción previa de la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF en un vector de rápido clonamiento (pGEM[®]-T *Easy*) tuvo por objetivo verificar la correcta amplificación de la secuencia nucleotídica deseada, así como detectar las posibles variaciones alélicas y de anotación en bases de datos. El plasmidio recombinante generado (pGEMT-T-DAF) fue utilizado como DNA molde en posteriores ensayos de amplificación del gen con el propósito de insertarlo en un vector de expresión para células procariontes.

1.4 Transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* JM109

Mediante *shock* térmico se transformaron bacterias *E. coli* JM109 (Promega) con el producto de ligación obtenido en 1.3. Para tales efectos se incubó 5 µl del producto de ligación con una alícuota de 50 µl de bacterias quimiocompetentes. La transformación se realizó sometiendo a las bacterias durante 50 segundos a 42°C en un baño termorregulado. Posteriormente, las bacterias se dejaron recuperar en 750 µl de medio LB líquido a 37°C con agitación orbital durante 1 hora.

En forma paralela, se prepararon placas de medio LB agar sólido con 125 µg/ml de ampicilina, 5 µl del inductor IPTG 1mM y 16 µl de un cromógeno acoplado a galactosa (X-Gal) como sustrato de la enzima β-galactosidasa, las cuales fueron utilizadas para sembrar

las bacterias transformadas usando volúmenes de 50 μ l, 100 μ l y 200 μ l por placa. Finalmente, los cultivos fueron mantenidos en estufa de incubación durante toda la noche a 37°C.

1.5 Selección de colonias positivas

Se seleccionaron las colonias positivas (que adquirieron el plasmidio recombinante) mediante coloración. Aquellas colonias que obtuvieron el vector sin el inserto (religación del vector vacío) incorporaron el gen de la β -galactosidasa intacto y activo, y por lo tanto se observaron de color azul, debido a la degradación del cromógeno X-Gal. Contrariamente, las colonias bacterianas que adquirieron el plasmidio conteniendo el inserto (T-DAF) se observaron de color blanco. Se realizó un repique numerado de colonias blancas seleccionadas al azar en placas de medio LB agar sólido con 125 μ g/ml de ampicilina, las que fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.

Para corroborar la presencia del inserto en cada una de estas colonias, se aplicó la técnica de PCR de colonias utilizando los mismos partidores señalados en el punto 1.1. La visualización de los fragmentos nucleotídicos codificantes para T-DAF de cada clon se realizó en geles de agarosa 0,8%, teñidos con Gelred®.

1.6 Purificación y secuenciación de la construcción pGEMT-T-DAF

Las colonias positivas a los ensayos de PCR fueron incubadas en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C. Posteriormente se purificó el plasmidio recombinante pGEMT-T-DAF utilizando el *kit* QIAprep® Spin Miniprep (QUIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalmente, se corroboró la presencia del inserto en la construcción mediante secuenciación automática de DNA en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA de la Facultad de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

1.7 Diseño de nuevos partidores y amplificación de secuencia nucleotídica corta de T-DAF (sT-DAF).

Al observar los resultados obtenidos de la secuenciación automática de DNA del plasmidio recombinante pGEMT-T-DAF, se detectó la presencia de un triplete nucleotídico codificante para un codón de término en la mitad de la secuencia de T-DAF, contrariamente a lo que se evidenció al analizar la secuencia anotada para el gen de dicha proteína en las bases de datos de internet (*Genebank accession* ESS60956.1). Este resultado fue evidenciado en todas las repeticiones experimentales y colonias analizadas. Por tales motivos, se diseñaron nuevos partidores considerando el siguiente triplete nucleotídico de inicio (ATG) que mantiene el correcto marco de lectura de la proteína y que se encuentra posterior al triplete de detención detectado. La nueva secuencia a amplificar presentó 936 pb. Los nuevos partidores diseñados también incluyeron sitios de restricción para las enzimas *Bam* HI (rojo) y *Hind* III (azul) en los partidores sentido y antisentido, respectivamente, como se muestra a continuación. El nuevo producto nucleotídico obtenido por PCR, utilizando estos partidores, se le denominó sT-DAF.

- Sentido sT-DAF: 5'-G**CGGATCC**ATGATAAAGAGAGTGATAATAAGC -3'
- Antisentido sT-DAF: 5'-CCCA**AAGCTT**CTAGGGGCTGTGGCAGTACCCA-3'

La amplificación de la secuencia nucleotídica para sT-DAF mediante PCR se realizó utilizando como DNA molde el plasmidio pGEMT-T-DAF obtenido en el punto 1.6. Se utilizaron 160 ng DNA molde, MgCl₂ 50 mM, 0,2 mM de cada DNTP, 1,5 U de DNA Taq polimerasa Platinum[®] (Invitrogen) y 8 pmol de cada partidor. La visualización de los fragmentos se realizó mediante separación electroforética en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con Gelred[®].

1.8 Purificación del amplificado a partir de geles de agarosa

Los amplificados nucleotídicos codificantes para sT-DAF fueron purificados a partir de geles de agarosa al 0,8% utilizando el *kit* Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.9 Digestión enzimática del fragmento nucleotídico sT-DAF

El fragmento nucleotídico purificado de sT-DAF fue sometido a corte con enzimas de restricción con el objetivo de posteriormente insertarlo en el vector de expresión pQE®-80L (QIAGEN). Para tales efectos, se agregó ~1 µg del fragmento nucleotídico purificado sT-DAF y 1 µl de las enzimas *Bam* HI y *Hind* III (10 U/µl) en tampón de reacción. Los reactantes fueron incubados a 37°C durante 16 horas.

1.10 Digestión del vector de expresión pQE®-80L

El vector de expresión pQE®-80L (QIAGEN) genera una proteína de fusión de 6 histidinas (cola de histidina) en el extremo N-terminal de la proteína de interés que se desea expresar. El vector de expresión pQE®-80L fue sometido a digestión enzimática con *Bam* HI y *Hind* III de manera similar que lo expuesto en 1.9.

1.11 Cuantificación de DNA del vector pQE®-80L y del amplificado nucleotídico codificante para sT-DAF, previamente digeridos enzimáticamente, y ligación del fragmento sT-DAF en el vector pQE®-80L

Se realizó la cuantificación del DNA (µg/ml) del inserto (sT-DAF) y del vector de expresión pQE®-80L (previamente digeridos enzimáticamente como se señala en el punto 1.9 y 1.10). Para tales efectos se utilizó el *kit* Qubit® dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific) y el fluorómetro Qubit® (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

Para el ligamiento del fragmento sT-DAF en el vector de expresión pQE®-80L, se utilizó la enzima DNA ligasa T4 (Promega) (0,3 U/µl) según las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó a 4°C durante toda la noche. Los ng de inserto necesarios para la reacción fueron calculados utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{ng de vector} \times \text{pb del inserto}]}{\text{pb del vector}} \times 3 = \text{ng de inserto}$$

1.12 Precipitación de la construcción pQE80L-sT-DAF posterior a la ligación

El producto de la ligación generado en 1.11 fue precipitado por la adición de 1 µl de glicógeno (20 ng/ml), 2 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 60 µl de etanol 100%. La

mezcla se dejó por 2 horas a -20°C , para luego ser centrifugada a 15000 RCF por 10 min a 4°C , conservando el *pellet*, el cual fue secado a 37°C en *thermoblock* y posteriormente, resuspendido en 10 μl de agua libre de nucleasas.

1.13 Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* JM109

Mediante electroporación se transformaron bacterias *E. coli* JM109 con la construcción pQE80L-sT-DAF. Para ello se mezcló una alícuota de bacterias electrocompetentes con 5 μl de DNA de la construcción en cubetas de electroporación de 0,1 mm de distancia de los electrodos (Biorad). Se aplicó un pulso de 1,8 volts a la reacción utilizando un electroporador Micropulser[®] (Biorad). Posteriormente, las bacterias fueron incubadas en 750 μl de medio LB durante 1 hora a 37°C con agitación. En forma paralela se prepararon placas de medio LB agar sólido con 120 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, las cuales fueron utilizadas para sembrar las bacterias electroporadas, usando un volumen de 100 y 200 μl por placa. Estos cultivos fueron mantenidos en estufa de incubación durante toda la noche a 37°C .

1.14 Selección de colonias positivas

Se seleccionaron colonias al azar obtenidas de los cultivos de bacterias transformadas con el inserto pQE80L-sT-DAF, con las que se realizó un repique en placas de medio LB agar sólido con 125 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, numerando las colonias. Para corroborar la presencia del inserto en cada una de las colonias seleccionadas, se aplicó la técnica PCR de colonias utilizando los mismos partidores diseñados en el punto 1.7. La visualización de los fragmentos amplificados de sT-DAF de cada clon se realizó en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con Gelred[®].

1.15 Purificación y secuenciación de construcciones

Las colonias positivas a la reacción de PCR de colonias, fueron incubadas en 10 ml de medio líquido LB con 12,5 μl de ampicilina toda la noche con agitación a 37°C . Posteriormente, se purificó la construcción pQE80L-sT-DAF utilizando el *kit* QIAprep[®] Spin Miniprep (Quiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, se corroboró la presencia del inserto en correcto marco de lectura mediante secuenciación automática de

DNA en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA de la Facultad de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

2. Expresar y purificar la proteína recombinante sT-DAF en bacterias *E. coli*.

2.1 Determinación de la expresión de la proteína recombinante sT-DAF en bacterias *E. coli*

La inducción de la expresión de la proteína recombinante sT-DAF en bacterias *E. coli* se realizó en una primera instancia a pequeña escala, utilizando diferentes colonias bacterianas transformadas con la construcción pQE80L-sT-DAF. Para tales propósitos, se cultivaron bacterias transformadas en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación orbital a 200 rpm toda la noche. Posteriormente, una alícuota de 1 ml de cada una de las colonias fueron adicionadas a tubos con 3 ml de medio líquido LB conteniendo 3,6 µl de ampicilina e IPTG 0,5 mM como inductor de la expresión de la proteína recombinante. Se realizó una nueva incubación en agitación orbital durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, 1 ml de las bacterias inducidas fueron centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* resultante fue resuspendido en 100 µl de PBS 1x y sonicado durante 10 segundos. Finalmente, se corroboró la expresión de la proteína recombinante sT-DAF mediante ensayos de “*Western Blot*” utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-histidina (Clontech), en una dilución 1:5000 v/v en PBS-Tween 0,05%. Posterior a esto, se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:10000 v/v en PBS-Tween 0,05%. El revelado fue realizado por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL Western blotting detection reagents and analysis system® (Amersham), según indicaciones del fabricante.

2.2 Obtención de la proteína recombinante sT-DAF en condiciones nativas

Para la obtención de la proteína recombinante sT-DAF en condiciones nativas, una colonia de bacterias *E. coli* JM109 transfectada con la construcción pQE80L-sT-DAF fue incubada en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente se adicionaron 3 ml de este preinóculo a un matraz con 250 mL de

medio LB líquido, el cual se incubó posteriormente en agitación orbital a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 0,8 medida a 595 nm. En ese momento, se agregó IPTG 0,5 mM como inductor de expresión de la proteína recombinante y se realizó una nueva incubación en agitación orbital durante toda la noche a 37°C. Transcurrido este lapso, el cultivo inducido se centrifugó por 20 min a 5000 rpm y el pellet obtenido fue diluido en 10 ml de buffer A (TRIS 50 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM pH 8,0; Tritón x-100 1%; Glicerol 10%) e incubado durante 30 min con agitación a 4°C. A continuación, se sonicó la muestra por 3 min en hielo y se centrifugo por 20 min a 8000 rpm a 4°C. El sobrenadante resultante fue aplicado sobre una columna Ni-NTA (Invitrogen), previamente equilibrada con buffer A. La resina de Ni-NTA conteniendo la proteína de interés se lavó con buffer de lavado (TRIS 50 mM pH 8,0; NaCl 200 mM; Imidazol 40mM pH 8,0; Tritón x-100 1%; Glicerol 10%) y finalmente, la proteína sT-DAF recombinante se recuperó utilizando un buffer de elución (TRIS 50 mM pH 8,0; NaCl 200 mM; Imidazol 300 mM pH 8,0; Tritón 1%; Glicerol 10%).

Las alícuotas de proteína recombinante purificada fueron separadas mediante electroforesis monodimensional en geles SDS-PAGE. Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de metanol al 50% v/v, ácido acético al 10% v/v y azul de Coomassie al 1%, a temperatura ambiente por 2 h. Al mismo tiempo, en otro gel idéntico, se separaron alícuotas de proteína recombinante purificada mediante electroforesis en geles SDS-PAGE, las que fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Trans Blot Transfer Medium® (BioRad). La identificación de la proteína recombinante se realizó mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-histidina (Clontech), en una dilución 1:5000 v/v en PBS-Tween 0,05%. Posterior a esto se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:10000 v/v en PBS-Tween 0,05%. El revelado fue realizado por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL Western blotting detection reagents and analysis system® (Amersham), según indicaciones del fabricante.

3. Caracterizar la secuencia aminoacídica la proteína sT-DAF recombinante.

3.1 Caracterización de la proteína sT-DAF recombinante purificada

La secuencia aminoacídica deducida de sT-DAF fue generada utilizando los resultados obtenidos luego de la secuenciación automática de DNA y el programa ExPASy (Bioinformatics Resource Portal). Posterior a esto, utilizando el programa Swiss-Model (Biozentrum) se identificó una proteína con un 42,08% de identidad con la secuencia de sT-DAF, perteneciente a *Trypasonoma rangeli* denominada 1wcs.1, la cual presenta actividad transialidasa. Usando esta proteína como plantilla se realizó un modelamiento 3D *in silico* para sT-DAF.

RESULTADOS

1. Amplificar el gen que codifica para la proteína T-DAF e insertarlo en un vector de expresión.

En bases de datos de internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) se detectó la secuencia aminoacídica parcial del factor acelerador del decaimiento (DAF, *decay accelerating factor*) de *T. cruzi* (*Genebank accession AAB27990*), descrita y anotada por Tambourgi *et al.* (1993). Mediante el uso del programa TBLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) se identificó la secuencia nucleotídica codificante completa para la proteína T-DAF en el genoma de *T. cruzi*, cepa Dm28c (*Genebank accession ESS60956.1*). Al analizar el marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) putativo se determinó que dicha secuencia corresponde a un fragmento de 1332 pb, codificante para 443 aminoácidos. A partir de estos datos se diseñaron oligonucleótidos partidores específicos los que fueron utilizados para amplificar dicha secuencia. En la Figura 1 se muestra un alineamiento entre la secuencia parcial descrita por Tambourgi *et al.* (1993) para T-DAF y la secuencia completa de la proteína de la cepa Dm28c identificada en bases de datos.

T-DAF completa	SGGFNGNQWKNEYFGVYAAVHGEVTTNSGGAI FKGVGAGAVWPVGTQGQNQIYYFSNTQF
T-DAF parcial	-----
T-DAF completa	TLLATVSIQEVPKEDSSPIPLMGVKMNGPNGLATLLGISYSADKKWEVTFNGVKATAEG
T-DAF parcial	-----
T-DAF completa	SEWELGREYQVALILEDGETIFVYVNGQMLGSSKTMPIGKERLLDISHFYFGGDNGEEKG
T-DAF parcial	-----EFGILEDGETIFVYVNGQMLGSSKTMPTGKERLLDISHFYFGGDNGEEKG *****
T-DAF completa	NRHVKVRNVLLYNRVLSASELQCRLEPEVVQK PQSASPTSPKKHEFGPEDDEFYTVLFP E
T-DAF parcial	NRHVKVRNVLLYNRVLSASELQCRLEPEVVQK PQSASPTYLKARI----- ***** * :
T-DAF completa	KLCLAFQCNGVAQEKCLGYCHSP
T-DAF parcial	-----

Figura Nro. 1: Alineamiento de la secuencia aminoacídica parcial y completa de la proteína T-DAF de *T. cruzi*. **T-DAF parcial:** secuencia aminoacídica parcial de T-DAF (*Genebank accession* AAB27990), anotada y descrita por Tambourgi *et al.* (1993). **T-DAF completa:** secuencia aminoacídica completa de T-DAF de la cepa Dm28c (*Genebank accession* ESS60956.1), identificada utilizando el programa TBLASTN.

Utilizando DNA genómico total de *T. cruzi* cepa Dm28c como DNA molde, se amplificó la secuencia nucleotídica codificante completa para la proteína T-DAF. Para tales propósitos se realizó un ensayo de PCR en gradiente de temperatura que permitió establecer la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos partidores al DNA molde. En la Figura 2 se muestra la separación electroforética de los amplificados de la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF en un gel de agarosa 0,8%, teñido con GelRed®. La presencia de amplificados cercanos a 1300 pb concuerdan con el tamaño esperado para el DNA codificante para T-DAF. La temperatura óptima de asociación, evidenciada por un mayor nivel de amplificación del fragmento fue 56,5°C (Figura 2, carril 4).

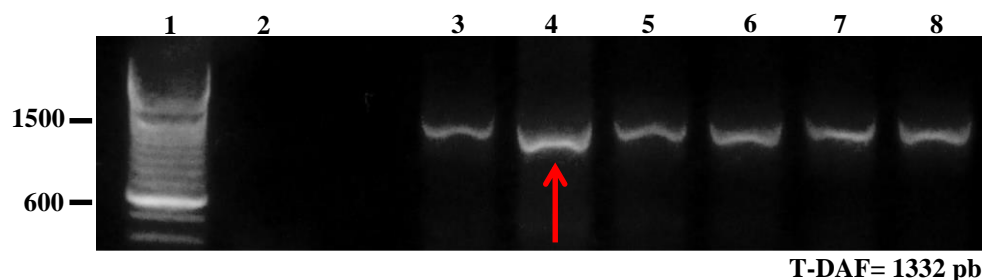


Figura Nro. 2: Determinación de la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos partidores para la amplificación de la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF. Separación electroforética en geles de agarosa al 0,8% teñidos con GelRed de fragmentos nucleotídicos de T-DAF amplificados mediante PCR, utilizando DNA genómico de *T. cruzi* cepa Dm28c como DNA molde. Carril 1: estándar de peso molecular cada 100 pb; Carril 2: Control negativo de la técnica de PCR (sin DNA molde); Carriles del 3 al 8: amplificados nucleotídicos codificantes para T-DAF, utilizando diferentes temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos partidores al DNA (carril 3: 55,5°C.; carril 4: 56,5°C.; carril 5: 57,8°C.; carril 6: 59,4°C.; carril 7: 60,6°C.; carril 8: 61,5°C). La flecha indica el carril con la temperatura óptima de alineamiento para la amplificación del fragmento.

Luego de determinada la temperatura óptima de alineamiento, se realizó nuevamente un ensayo de PCR para amplificar en condiciones óptimas la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF. Los fragmentos amplificados fueron purificados desde geles de agarosa e

insertados en el vector de clonamiento pGEM-T *easy*. Las construcciones generadas se utilizaron para transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* JM109. Se realizó la selección de colonias positivas, es decir las colonias que incorporaron al vector con el inserto, mediante colorimetría y posterior ensayo de PCR de colonias. De esta forma se obtuvo 2 colonias positivas (Figura 3).

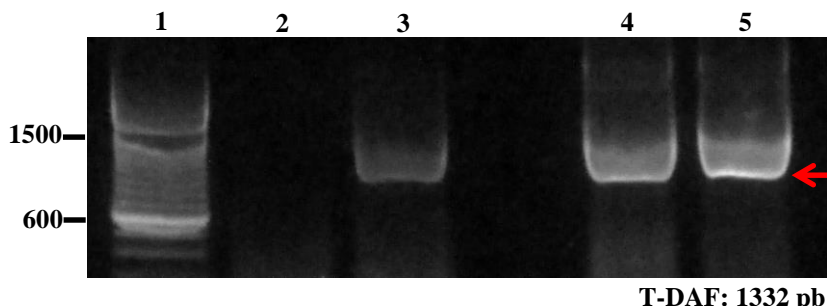


Figura Nro. 3: Comprobación de la presencia de la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF en colonias de *E. coli* transformadas con la construcción pGEMT-T-DAF. Separación electroforética en geles de agarosa al 0,8% teñidos con GelRed de fragmentos nucleotídicos de T-DAF amplificados mediante PCR. Carril 1: estándar de peso molecular cada 100 pb; Carril 2: Control negativo de la técnica de PCR (sin DNA molde); Carril 3: Control positivo de la técnica de PCR (DNA genómico de *T. cruzi* como molde); Carriles 4 y 5: amplificados nucleotídicos codificantes de T-DAF utilizando como DNA molde a lisados de las colonias 1 y 2 de *E. coli* transformadas. La flecha señala los amplificados de T-DAF.

Desde ambas colonias positivas se purificó el plasmidio recombinante y se envió a secuenciación automática de DNA con el objetivo de corroborar la correcta amplificación del fragmento. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF de la cepa Dm28c anotada en base de datos de internet (*Genebank accession* ESS60956.1). Los resultados obtenidos del alineamiento permitieron detectar la carencia de una base en el fragmento amplificado (Figura 4, marcado en amarillo), así como la presencia de bases nucleotídicas diferentes (Figura 4, marcadas en rojo).

T-DAF Dm28c	ATGGCTATCGCAGGGTGTACGAATCCAGTGACAACGGGGAATCTTGGACGGAGGCTCTCG	60
pGEMT-T-DAF	ATGGCTATCGCAGGGTGTACGAATCCAGTGACAACGGGGAATCTTGGACGGAGGCTCTCG *****	60
T-DAF Dm28c	GGGACACTCTCGTGCCTGTGGGGCAACTCGCATAATCGAACAGGGAAAGGTGTGCAGAGT	120
pGEMT-T-DAF	GGGACACTCTCGTGCCTGTGGGGCAACTCGCATAATCGAACAGGGAAAGGTGTGCAGAGT *****	119
T-DAF Dm28c	GGGTTTATTTCTGCGACGATTGAAGGAAAGAAGGTTCTGCTCGTTTCTTGCCAGTGTAT	180
pGEMT-T-DAF	GGGTTTATTTCTGCGACGATTGAAGGAAAGAAGGTTCTGCTCGTTTCTTGCCAGTGTAT *****	179
T-DAF Dm28c	TCTACGGATAACGAAAGGGTGCAGTCAATCTTTGGCTAAGTGACGGACGACGCATTGCT	240
pGEMT-T-DAF	TCTACGGATAACGAAAGGGTGCAGTCAATCTTTGGCTAAGTGACGGACGACGCATTGCT *****	239
T-DAF Dm28c	GATATTGGACCGATATCCTCCACCGACGAAGATATCACTGAAAGCGCTCTTTGTACAGA	300
pGEMT-T-DAF	GATATTGGACCGATATCCTCCACCGACGAAGATATCACTGAAAGCGCTCTTTGTACAGA *****	299
T-DAF Dm28c	GATACTTTGGGTGAGGAGTTGATTTCCGTGTACGGGAGTAGGGATGCAACTGGCAAACCTC	360
pGEMT-T-DAF	GATACTTTGGGTGAGGAGTTGATTTCCGTGTACGGGAGTAGGGATGCAACTGGCAAACCTC *****	359
T-DAF Dm28c	AGCATTTCTTCTGTGCGCTTGACTGGGCAGCTGGAGATGATAAAGAGAGTGATAATAAGC	420
pGEMT-T-DAF	AGCATTTCTTCTGTGCGCTTGACTGGGCAGCTGGAGATGATAAAGAGAGTGATAATAAGC *****	419
T-DAF Dm28c	TGGGGAGAGATGGACAAGCGTGTTTTACAGCTGTACCGTTTTTTCGATTGCCGAGGACAGT	480
pGEMT-T-DAF	TGGGGAGAGATGGACAAGCGTGTTTTACAGCTGTACCGTTTTTTCGATTGCCGAGGACAGT *****	479
T-DAF Dm28c	TTGTCTTCTGTGCGGGCCTGCAGCACCCGATGCTCATGAATGGATTGGTTGGTTTTTTTG	540
pGEMT-T-DAF	TTGTCTTCTGTGCGGGCCTGCAGCACCCGATGCTCATGAATGGATTGGTTGGTTTTTTTG *****	539
T-DAF Dm28c	TCCGGTGGTTTTAATGGAATCAATGGAAGAATGAGTACTTTGGGGTATACGCAGCTGTT	600
pGEMT-T-DAF	TCCGGTGGTTTTAATGGAATCAATGGAAGAATGAGTACTTTGGGGTATACGCAGCTGTT *****	599
T-DAF Dm28c	CATGGGGAGGTGACAACCAATTCGGGTGGTGCATCTTCAAGGGCGTTGGTGCAGGGGCG	660
pGEMT-T-DAF	CATGGGGAGGTGACAACCAATTCGGGTGGTGCATCTTCAAGGGCGTTGGTGCAGGGGCG *****	659
T-DAF Dm28c	GTGTGGCCTGTGGGAACACAGGGGCAGAAATCAAATATACTACTTTCAAACACCCAGTTC	720
pGEMT-T-DAF	GTGTGGCCTGTGGGAACACAGGGGCAGAAATCAAATATACTACTTTCAAACACCCAGTTC *****	719
T-DAF Dm28c	ACTCTTCTGGCGACGGTGTCTATACAGGAAGTGCCGAAAGAGGACAGCAGCCCCATTCTT	780
pGEMT-T-DAF	ACTCTTCTGGCGACGGTGTCTATACAGGAAGTGCCGAAAGAGGACAGCAGCCCCATTCTT *****	779

Figura Nro. 4: Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF de *T. cruzi* cepa Dm28c anotada en bases de datos con el producto de la secuenciación automática de la construcción pGEMT-T-DAF. Alineamiento realizado utilizando el programa *Clustal W2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **T-DAF Dm28c:** Secuencia nucleotídica codificante para T-DAF anotada (*Genebank accession* ESS60956.1). **pGEMT-T-DAF:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA de la construcción pGEMT-T-DAF purificada

de la colonia bacteriana número 1. Se aprecia una delección nucleotídica marcada en amarillo y modificación de bases marcadas en rojo.

Debido a las importantes diferencias de bases encontradas entre la secuencia nucleotídica de T-DAF anotada y la amplificada por PCR, se realizó la traducción aminoacídica desde la secuencia obtenida por secuenciación automática, utilizando el programa ExPASy (Figura 5). De esta forma se detectó la formación de un codón de término (Figura 5, destacado en rojo) producto de la carencia de un nucleótido observado al realizar el alineamiento nucleotídico (Figura 4, destacado en amarillo). La carencia de este nucleótido genera una modificación del marco de lectura de la proteína T-DAF. Lamentablemente, este resultado fue evidenciado en todas las repeticiones experimentales y colonias analizadas (resultados no mostrados), y sugiere fuertemente la presencia de un error de anotación de la secuencia nucleotídica codificante para la proteína T-DAF en bases de datos de internet.

```
atggctatcgcaggggtgtacgaatccagtgacaacggggaatcctggacggaggtctctcg
M A I A G C T N P V T T G N L G R R L S
ggacactctcgtgctgtggggcaactcgcataatcgaacagggaaaggtgtgcagagtg
G H S R A C G A T R I I E Q G K V C R V
ggtttatctctgacgattgaaggaagaaggttctgctcgtttctctgccagtgatt
G L F L R R L K E R R F C S F L C Q C I
ctacggataacgaaaggggtcgactcaatccttggcctaaagtgacggacgacgcattgctg
L R I T K G V D S I F G T V T D D A L L
atattggaccgatatcctccaccgacgaagatatcactgaaagcgctcttttgtagagag
I L D R Y P P P T K I S L K A L F C T E
atactttgggtgaggagttgatttccgtgtacgggagtagggatgcaactggcaaactca
I L W V R S - F P C T G V G M Q L A N S
gcatttcttctgtgctgactgggagctggagatgataaagagagtataataagct
A F L L C A - L G S W R - - R E - - - A
ggggagagatggacaagcgtgttttacagctgtaccgtttttcgattgccgaggacagtt
G E R W T S V F Y S C T V F R L P R T V
tgtcttctgtcggggcctgcagcaccgcatgctcatgaatggattgggtgggtttttgt
C L L S G P A A P V C S - M D W L V F C
ccggtggttttaatggaaatcaatggaagaatgagtactttgggtatcacgcagctgttc
P V V L M E I N G R M S T L G Y T Q L F
atggggaggtgacaaccaattcgggtggtgcatcttcaagggcgttgggtgcagggggcgg
M G R - Q P I R V V R S S R A L V Q G R
tgtggcctgtgggaacacaggggcagaatcaaatatactactttgcaaacacccagttca
C G L W E H R G R I K Y T T L Q T P S S
```

Figura Nro. 5: Secuencia aminoacídica deducida de T-DAF de la cepa Dm28c a partir de la secuenciación nucleotídica de la construcción pGEMT-T-DAF. En rojo el codón de término que se genera.

Por los motivos señalados, se diseñaron nuevos oligonucleótidos partidores considerando el siguiente triplete nucleotídico de inicio (ATG) que mantiene el correcto marco de lectura de la proteína y que se encuentra posterior (rio abajo) al triplete de detención detectado. La nueva secuencia a amplificar presentó 936 pb y se le denominó sT-DAF.

Utilizando como DNA molde el plasmidio pGEMT-T-DAF obtenido con anterioridad, se amplificó la secuencia nucleotídica codificante para sT-DAF mediante ensayos de PCR. En la Figura 6 se muestra la separación electroforética de los amplificadores de la secuencia nucleotídica codificante para sT-DAF en un gel de agarosa 0,8%, teñido con GelRed®. La presencia de amplificadores cercanos a 900 pb (Figura 6, carriles del 4 al 9) concuerdan con el tamaño esperado para el fragmento codificante para sT-DAF (936 pb).

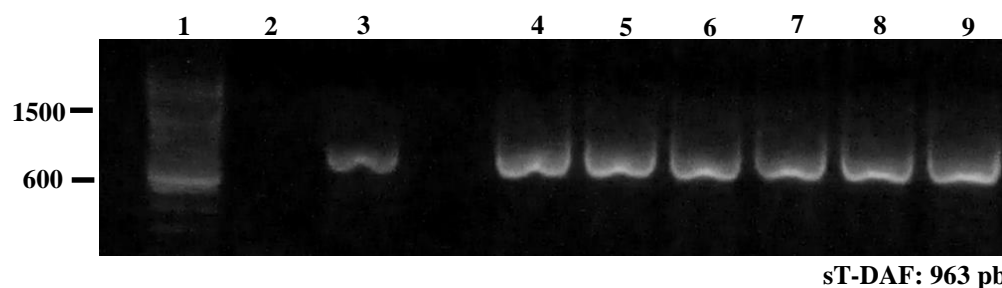


Figura Nro. 6: Separación electroforética de amplificadores de DNA de secuencias nucleotídicas codificantes para sT-DAF. Separación electroforética en geles de agarosa al 0,8% teñidos con GelRed. Carril 1: estándar de peso molecular cada 100 pb; Carril 2: Control negativo de la técnica de PCR (sin DNA molde); Carril 3: Control positivo de la técnica de PCR (DNA genómico de *T. cruzi* como molde); Carriles 4 a 9: amplificadores nucleotídicos codificantes de T-DAF utilizando el plasmidio pGEMT-T-DAF como DNA molde.

Los fragmentos nucleotídicos amplificados por PCR de las secuencias codificantes para sT-DAF fueron purificados desde geles de agarosa y sometidos al corte con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III. Esta digestión enzimática también se realizó sobre el vector de expresión pQE-80L. Posteriormente, el fragmento nucleotídico digerido de sT-DAF fue insertado el vector de expresión, generando la construcción pQE80L-sT-DAF. Las construcciones se utilizaron para transformar bacterias electrocompetentes *E. coli* JM109 y se realizó la selección de colonias positivas mediante ensayos de PCR de colonias, obteniéndose 3 colonias positivas como muestra la Figura 7.

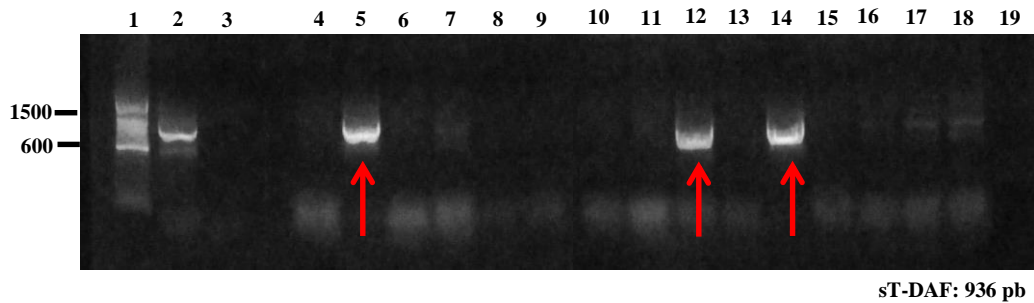


Figura Nro. 7: Comprobación de la presencia de la secuencia nucleotídica codificante para sT-DAF en colonias de *E. coli* transformadas con la construcción pQE80L-sT-DAF. Separación electroforética en geles de agarosa al 0,8% teñidos con GelRed de fragmentos nucleotídicos de sT-DAF amplificados mediante PCR. Carril 1: estándar de peso molecular cada 100 pb; Carril 2: Control positivo de la técnica de PCR (DNA genómico de *T. cruzi* como molde); Carril 3: Control negativo de la técnica de PCR (sin DNA molde); Carriles 4 al 19: amplificados nucleotídicos codificantes de sT-DAF utilizando como DNA molde a lisados de las colonias 1 a 15 de *E. coli* transformadas. La flecha señala los amplificados de sT-DAF, proveniente de las colonias 2 (carril 5), 9 (carril 12) y 11 (carril 14).

De las colonias positivas obtenidas se purificó la construcción pQE80L-sT-DAF. Los plasmidios fueron sometidos a secuenciación automática de DNA para comprobar la presencia de la secuencia nucleotídica codificante para sT-DAF en correcto marco de lectura. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con la secuencia nucleotídica codificante para la secuencia acortada de T-DAF de la cepa Dm28c anotada en bases de datos (Figura 8). La presencia de bases diferentes en el DNA de clones, comparados entre ellos y con la secuencia anotada para T-DAF (Figura 8, destacadas en rojo) podría deberse tanto a variaciones alélicas como a problemas de anotación y/o secuenciación.

sT-DAF	Dm28c	ATGATAAAGAGAGTGATAATAAGCTGGGGAGAGATGGACAAGCGTGTTTTACAGCTGTAC	60
sT-DAF	Clon2	ATGATAAAGAGAGTGATAATAAGCTGGGGAGAGATGGACAAGCGTGTTTTACAGCTGTAC	60
sT-DAF	Clon9	ATGATAAAGAGAGTGATAATAAGCTGGGGAGAGATGGACAAGCGTGTTTTACAGCTGTAC	60
sT-DAF	Clon11	ATGATAAAGAGAGTGATAATAAGCTGGGGAGAGATGGACAAGCGTGTTTTACAGCTGTAC *****	60
sT-DAF	Dm28c	CGTTTTTCGATTGCCGAGGACAGTTTGTCTTCTGTCTCGGGCCTGCAGCACCCGTATGCTC	120
sT-DAF	Clon2	CGTTTTTCGATTGCCGAGGACAGTTTGTCTTCTGTCTCGGGCCTGCAGCACCCGTATGCTC	120
sT-DAF	Clon9	CGTTTTTCGATTGCCGAGGACAGTTTGTCTTCTGTCTCGGGCCTGCAGCACCCGTATGCTC	120
sT-DAF	Clon11	CGTTTTTCGATTGCCGAGGACAGTTTGTCTTCTGTCTCGGGCCTGCAGCACCCGTATGCTC *****	120
sT-DAF	Dm28c	ATGAATGGATTGGTTGGTTTTTTGTCCGGTGGTTTTAATGGAAATCAATGGAAGAATGAG	180
sT-DAF	Clon2	ATGAATGGATTGGTTGGTTTTTTGTCCGGTGGTTTTAATGGAAATCAATGGAAGAATGAG	180
sT-DAF	Clon9	ATGAATGGATTGGTTGGTTTTTTGTCCGGTGGTTTTAATGGAAATCAATGGAAGAATGAG	180
sT-DAF	Clon11	ATGAATGGATTGGTTGGTTTTTTGTCCGGTGGTTTTAATGGAAATCAATGGAAGAATGAG *****	180
sT-DAF	Dm28c	TACTTTGGGGTATACGCAGCTGTTTCATGGGGAGGTGACAACCAATTCGGGTGGTGCATC	240
sT-DAF	Clon2	TACTTTGGGGTATACGCAGCTGTTTCATGGGGAGGTGACAACCAATTCGGGTGGTGCATC	240
sT-DAF	Clon9	TACTTTGGGGTATACGCAGCTGTTTCATGGGGAGGTGACAACCAATTCGGGTGGTGCATC	240
sT-DAF	Clon11	TACTTTGGGGTATACGCAGCTGTTTCATGGGGAGGTGACAACCAATTCGGGTGGTGCATC *****	240
sT-DAF	Dm28c	TTCAAGGGCGTTGGTGCAGGGGCGGTGTGGCCTGTGGGAACACAGGGGCAGAATCAAATA	300
sT-DAF	Clon2	TTCAAGGGCGTTGGTGCAGGGGCGGTGTGGCCTGTGGGAACACAGGGGCAGAATCAAATA	300
sT-DAF	Clon9	TTCAAGGGCGTTGGTGCAGGGGCGGTGTGGCCTGTGGGAACACAGGGGCAGAATCAAATA	300
sT-DAF	Clon11	TTCAAGGGCGTTGGTGCAGGGGCGGTGTGGCCTGTGGGAACACAGGGGCAGAATCAAATA *****	300
sT-DAF	Dm28c	TACTACTTTTCAAACACCCAGTTCACTCTTCTGCGACGGTGTCTATAACAGGAAGTGCCG	360
sT-DAF	Clon2	TACTACTTTTCAAACACCCAGTTCACTCTTCTGCGACGGTGTCTATAACAGGAAGTGCCG	360
sT-DAF	Clon9	TACTACTTTTCAAACACCCAGTTCACTCTTCTGCGACGGTGTCTATAACAGGAAGTGCCG	360
sT-DAF	Clon11	TACTACTTTTCAAACACCCAGTTCACTCTTCTGCGACGGTGTCTATAACAGGAAGTGCCG *****	360
sT-DAF	Dm28c	AAGGAGGACAGCAGCCCCATTCTTTGATGGCGTGAAGATGAACGGCCCCAACGGCAAG	420
sT-DAF	Clon2	AAGGAGGACAGCAGCCCCATTCTTTGATGGCGTGAAGATGAACGGCCCCAACGGCAAG	420
sT-DAF	Clon9	AAGGAGGACAGCAGCCCCATTCTTTGATGGCGTGAAGATGAACGGCCCCAACGGCAAG	420
sT-DAF	Clon11	AAGGAGGACAGCAGCCCCATTCTTTGATGGCGTGAAGATGAACGGCCCCAACGGCAAG *****	420
sT-DAF	Dm28c	CTGGCGACGCTTCTGGGATCTCCTACAGTGGGATAAAAAAGTGGGAGGTGACGTTTAAC	480
sT-DAF	Clon2	CTGGCGACGCTTCTGGGATCTCCTACAGTGGGATAAAAAAGTGGGAGGTGACGTTTAAC	480
sT-DAF	Clon9	CTGGCGACGCTTCTGGGATCTCCTACAGTGGGATAAAAAAGTGGGAGGTGACGTTTAAC	480
sT-DAF	Clon11	CTGGCGACGCTTCTGGGATCTCCTACAGTGGGATAAAAAAGTGGGAGGTGACGTTTAAC *****	480
sT-DAF	Dm28c	GGCGTGAAGGCAACAGCCGAGGGGAGCGAGTGGGAACGGGGAGGGAATACCAAGTGGCA	540
sT-DAF	Clon2	GGCGTGAAGGCAACAGCCGAGGGGAGCGAGTGGGAACGGGGAGGGAATACCAAGTGGCA	540
sT-DAF	Clon9	GGCGTGAAGGCAACAGCCGAGGGGAGCGAGTGGGAACGGGGAGGGAATACCAAGTGGCA	540
sT-DAF	Clon11	GGCGTGAAGGCAACAGCCGAGGGGAGCGAGTGGGAACGGGGAGGGAATACCAAGTGGCA *****	540
sT-DAF	Dm28c	CTCATCCTGGAGGACGGTGAACAATCTTTGTGTACGTGAATGGCCAGATGCTGGGGAGC	600
sT-DAF	Clon2	CTCATCCTGGAGGACGGTGAACAATCTTTGTGTACGTGAATGGCCAGATGCTGGGGAGC	600
sT-DAF	Clon9	CTCATCCTGGAGGACGGTGAACAATCTTTGTGTACGTGAATGGCCAGATGCTGGGGAGC	600
sT-DAF	Clon11	CTCATCCTGGAGGACGGTGAACAATCTTTGTGTACGTGAATGGCCAGATGCTGGGGAGC *****	600
sT-DAF	Dm28c	TCGAAAACGATGCCGATTGGTAAGGAACGGCTACTCGATATCTCGCACTTCTACTTTGGC	660
sT-DAF	Clon2	TCGAAAACGATGCCGATTGGTAAGGAACGGCTACTCGATATCTCGCACTTCTACTTTGGC	660
sT-DAF	Clon9	TCGAAAACGATGCCGATTGGTAAGGAACGGCTACTCGATATCTCGCACTTCTACTTTGGC	660
sT-DAF	Clon11	TCGAAAACGATGCCGATTGGTAAGGAACGGCTACTCGATATCTCGCACTTCTACTTTGGC *****	660
sT-DAF	Dm28c	GGTGACAACGGCGAAGAAAAGGGAAACCGCATGTGAAAGTGAGGACCGTATTGTTGTAC	720
sT-DAF	Clon2	GGTGACAACGGCGAAGAAAAGGGAAACCGCATGTGAAAGTGAGGACCGTATTGTTGTAC	720
sT-DAF	Clon9	GGTGACAACGGCGAAGAAAAGGGAAACCGCATGTGAAAGTGAGGACCGTATTGTTGTAC	720
sT-DAF	Clon11	GGTGACAACGGCGAAGAAAAGGGAAACCGCATGTGAAAGTGAGGACCGTATTGTTGTAC *****	720

sT-DAF Dm28c	AACCGAGTGTTGAGTGCCAGTGAAGTGAATGCCGTCTTCCTGAAGAAGTTGTGCAAAAAG	780
sT-DAF Clon2	AACCGAGTGTTGAGTGCCAGTGAAGTGAATGCCGTCTTCCTGAAGAAGTTGTGCAAAAAG	780
sT-DAF Clon9	AACCGAGTGTTGAGTGCCAGTGAAGTGAATGCCGTCTTCCTGAAGAAGTTGTGCAAAAAG	780
sT-DAF Clon11	AACCGAGTGTTGAGTGCCAGTGAAGTGAATGCCGTCTTCCTGAAGAAGTTGTGCAAAAAG *****	780
sT-DAF Dm28c	CCACAGAGTGCGTCACCCACTTACCTAAAAAGCACGAATTCGGTCCGGAGGACGATGAA	840
sT-DAF Clon2	CCACAGAGTGCGTCACCCACTTACCTAAAAAGCACGAATTCGGTCCGGAGGACGATGAA	840
sT-DAF Clon9	CCACAGAGTGCGTCACCCACTTACCTAAAAAGCACGAATTCGGTCCGGAGGACGATGAA	840
sT-DAF Clon11	CCACAGAGTGCGTCACCCACTTACCTAAAAAGCACGAATTCGGTCCGGAGGACGATGAA *****	840

Figura Nro. 8: Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para sT-DAF de *T. cruzi* (cepa Dm28c) anotada en bases de datos con el producto de la secuenciación automática de las construcciones pQE80L-sT-DAF obtenidas. Alineamiento realizado utilizando el programa *Clustal W2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **sT-DAF Dm28c:** Secuencia nucleotídica codificante para sT-DAF anotada (*Genebank accession* ESS60956.1). **sT-DAF clon 2, 9 y 11:** Secuencia nucleotídica obtenida desde secuenciación automática de DNA de las construcciones pQE80L-sT-DAF purificadas desde las colonias bacterianas número 2, 9 y 11. Las bases que varían entre clones y la secuencia anotada se destaca en color rojo.

Se realizó la traducción de la secuencia nucleotídica obtenida para sT-DAF (plasmidio pQE80L-sT-DAF purificado desde la colonia 11), de la cual se generaría una proteína de 314 aminoácidos con una masa molecular deducida de 34,45 kDa (*Protein Molecular Weight*, Bioinformatics.org)

Con el objetivo de determinar posibles diferencias en la secuencia aminoacídica deducida de la proteína T-DAF generada desde la construcción pQE80L-sT-DAF (clon 11) y la secuencia anotada en base de datos para *T. cruzi* de la cepa Dm28c (considerando el marco de lectura desde el nuevo ATG), se realizó un alineamiento aminoacídico (Figura 9). En general, la mayoría de los residuos aminoacídicos diferenciales que se detectan corresponderían a aminoácidos de características similares, fundamentalmente los que se encuentran en la mitad de la secuencia analizada. Sin embargo, en la región carboxi-terminal la modificación de residuos presentaría una mayor magnitud. Se desconoce los motivos de dichas importantes diferencias.

sT-DAFDm28c	MIKRVIIISWGEMDKRVLQLYRFSIAEDSLSSVGACSTRMLMNLVGFVLSGGFNGNQWKNE	60
sT-DAF	MIKRVIIISWGEMDKRVLQLYRFSIAEDSLSSVGACSTRMLMNLVGFVLSGGFNGNQWKNE *****	60
sT-DAFDm28c	YFGVYAAVHGEVTTNSGGAIKFGVGGAGAVWPVGTQGGQNIYYFNTQFTLLATVSIQEV	120
sT-DAF	YFGVYAAVHGEVTTNSGGAIKFGVGGAGAVWPVGTQGGQNIYYFANTQFTLLTTVSIQEV *****:*****:*****	120
sT-DAFDm28c	KEDSSPIPLMGVKMNGPNGLATLLGISYSADKKWEVTFNGVKATAEGSEWELGREYQVA	180
sT-DAF	KEDSSPIPLMGVKMNGPNGLATLLGVSYSADKKWEVTFNGVKATAEGSEWELGREYQVA *****:*****	180
sT-DAFDm28c	LILEDGETIFVYVNGQMLGSSKTMPIGKERLLDISHFYFGDNGEKGNRHVKVRNVL	240
sT-DAF	LILEDGETIFVYVNGQMLGSSKTMPTGKERLLDISHFYFGDNGEKGNRHVKVRDVL *****:*****:*****	240
sT-DAFDm28c	NRVLSASELQCRLPEEVVQKPKQSASPTSPKKHEFGPEDDEFYTVLFPEKLCCLAFQCN	300
sT-DAF	NRVLSASELQCRLPEEVVQKPKQSASPTSPKKHEFGPEDDEFYTVLFPEKLSVLLSNATGS *****.:.::	300
sT-DAFDm28c	QEKCLGYCHSP--- 311	
sT-DAF	PKKMPLVLPQPLEA 314 :* .*	

Figura Nro. 9: Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida para sT-DAF a partir del plasmidio pQE80L-sT-DAF con la secuencia aminoacídica deducida de sT-DAF de *T. cruzi* de la cepa Dm28c. sT-DAFDm28c: secuencia aminoacídica deducida a partir de secuencia acortada disponible en GenBank, de T-DAF de *T. cruzi* de la cepa Dm28c; sT-DAF: secuencia aminoacídica de sT-DAF de *T. cruzi* de la cepa Dm28c, deducida de la secuenciación automática de DNA de la construcción pGEMT-sT-DAF, purificado a partir del cultivo de la colonia bacteriana número 11.

2. Expresar y purificar la proteína recombinante sT-DAF en bacterias *E. coli*.

Las bacterias *E. coli* JM109 transformadas con la construcción pQE80L-sT-DAF fueron inducidas a expresar la proteína recombinante sT-DAF mediante la adición de IPTG. Posteriormente, fueron recuperadas mediante centrifugación y sonicadas, para finalmente corroborar la expresión de la proteína mediante SDS-PAGE al 12% fijado y teñido con una solución de metanol, ácido acético y azul de Coomassie y mediante ensayos de “Western Blot” (Figura 10).

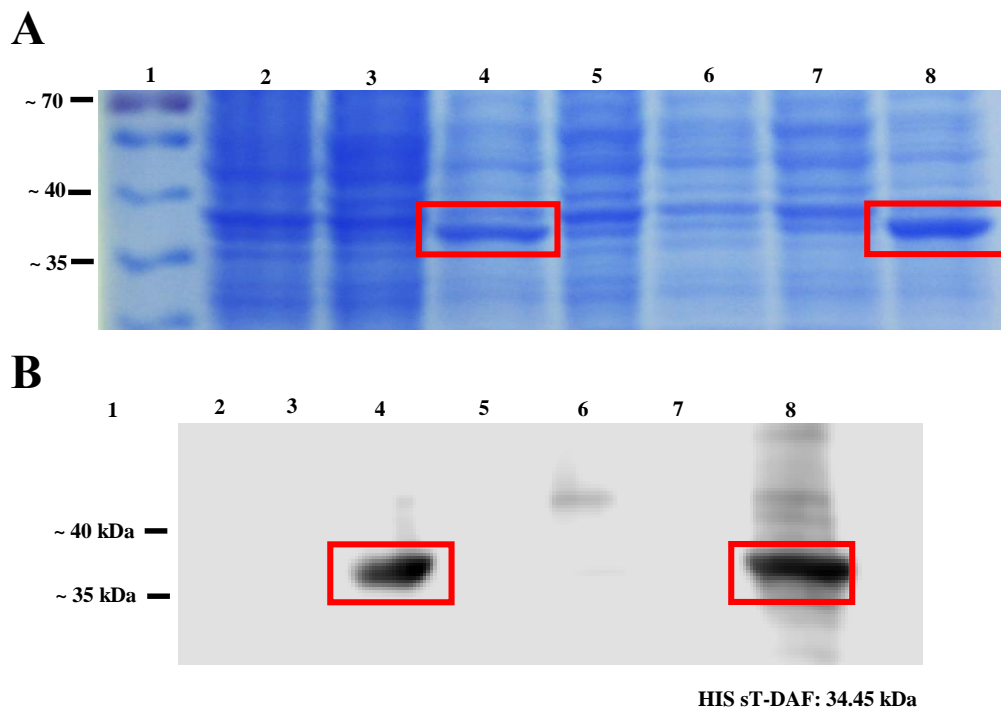


Figura Nro. 10: Identificación de la sobreexpresión de la proteína recombinante HIS sT-DAF en homogeneizados de bacterias *E. coli* JM109 transformadas con la construcción pQE80L-sT-DAF, por: (A) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y (B) Western blot.

Carril 1: Estándar de peso molecular (de 10 a 180 kDa); Carril 2: homogeneizados de *E. coli* JM109; Carril 3: homogeneizados de proteínas de *E. coli* JM109 colonia 2 con la construcción pQE80L-sT-DAF, sin adición de IPTG; Carril 4: homogeneizados de proteínas de *E. coli* JM109 colonia 2 con la construcción pQE80L-sT-DAF, en presencia de IPTG 1nM; Carril 5: homogeneizados de proteínas de *E. coli* JM109 colonia 9 con la construcción pQE80L-sT-DAF, sin adición de IPTG; Carril 6: homogeneizados de proteínas de *E. coli* JM109 colonia 9 con la construcción pQE80L-sT-DAF, en presencia de IPTG 1nM; Carril 7: homogeneizados de proteínas de *E. coli* JM109 colonia 11 con la construcción pQE80L-sT-DAF, sin adición de IPTG; Carril 8: homogeneizados de proteínas de *E. coli* JM109 colonia 11 con la construcción pQE80L-sT-DAF, en presencia de IPTG 1nM. Los cuadros rojos señalan la proteína recombinante HIS sT-DAF expresada en la colonia 2 y 11 en adición de IPTG.

Luego se procedió a purificar la proteína en condiciones nativas. Para esto se escogió una de las colonias de bacterias *E. coli* JM109 transformadas con la construcción pQE80L-sT-DAF que expresó la proteína (Figura 10, colonia 11), la cual fue incubada para luego ser inducida a expresar sT-DAF mediante la adición de IPTG. Las bacterias fueron recuperadas mediante centrifugación, para luego ser sometidas a la acción de un buffer de lisis y sonicación. El sobrenadante fue aplicado sobre una columna Ni-NTA dos veces, esta columna fue lavada y posteriormente la proteína fue extraída mediante el uso de un buffer de elución. Se corroboró la purificación de la proteína mediante SDS-PAGE al 12% fijado y teñido con una solución de metanol, ácido acético y azul de Coomassie, así como mediante ensayos de “*Western Blot*” (Figura 11).

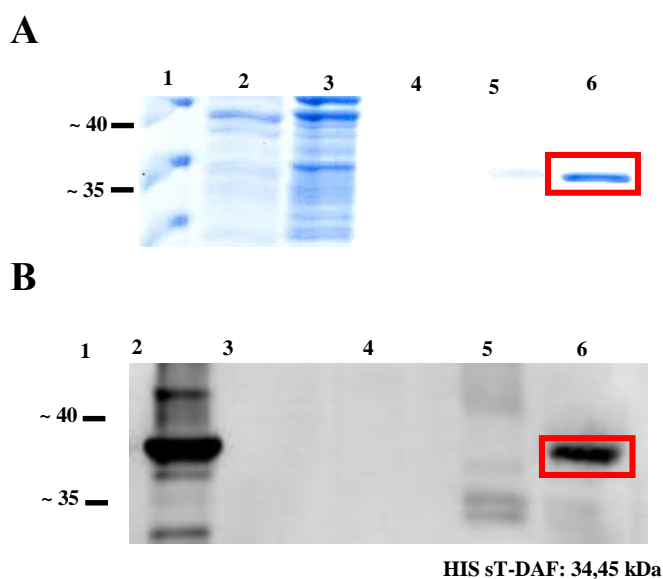


Figura Nro. 11: Identificación de la proteína recombinante HIS sT-DAF purificada desde la colonia 11 de bacterias *E. coli* JM109 transformadas con la construcción pQE80L-sT-DAF por (A) Gel de poliacrilamida 12% teñido con azul de Coomassie y (B) *Western blot*.

Carril 1: Estándar de peso molecular (de 10 a 180 kDa); Carril 2: homogenizado de proteínas totales de *E. coli* transformada e inducida para expresar sT-DAF (precarga); Carril 3: proteínas obtenidas posterior a la unión de sT-DAF a la columna de Ni-NTA (postcarga); Carril 4: Solución obtenida posterior al lavado de la columna de Ni-NTA unida a la proteína de interés (sT-DAF); Carriles 5-6: Eluciones secuenciales de la proteína sT-DAF purificada. El cuadrado rojo señala la proteína purificada.

3. Caracterizar la secuencia aminoacídica la proteína sT-DAF recombinante.

Con el objetivo de caracterizar la posible estructura que adquiriría la proteína sT-DAF, la secuencia aminoacídica deducida de sT-DAF fue utilizada para realizar un modelamiento *in silico*, usando como molde la proteína 1wcs.1 de *Trypasonoma rangeli*. Esta última proteína corresponde a una *trans*-sialidasa que presenta un 42,08% de identidad con sT-DAF (Figura 12). A pesar del bajo porcentaje de identidad entre ambas secuencias, se observan regiones que se estructurarían de manera similar entre ambas proteínas. Sin embargo, estos resultados deben ser corroborados en estudios posteriores mediante cristalografía.

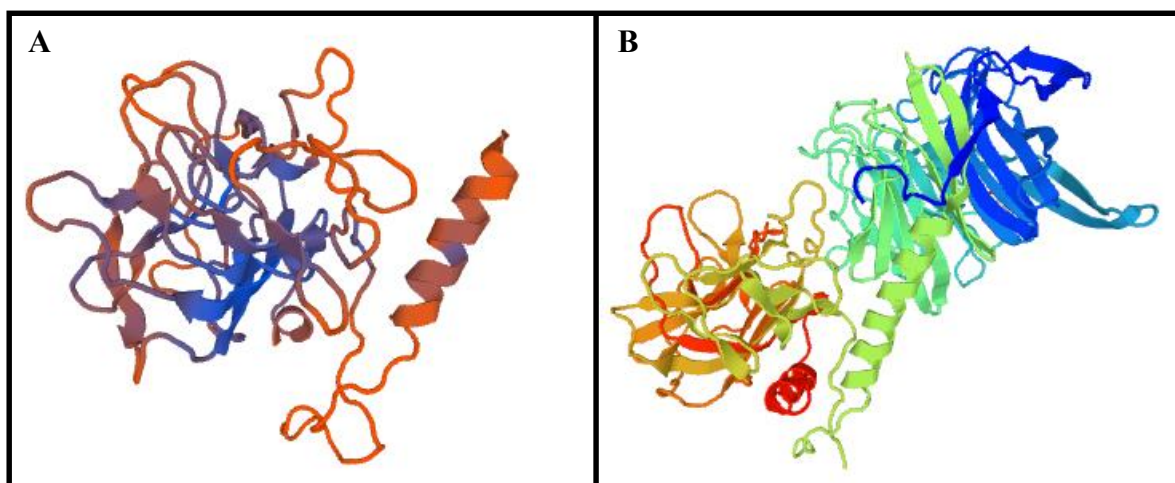


Figura Nro. 12: Modelamiento 3D para sT-DAF (A) Figura 3D para sT-DAF (B) Figura 3D de la proteína 1wcs.1 de *Trypasonoma rangeli*.

DISCUSIÓN

La generación de proteínas recombinantes se considera uno de los aportes más importantes de la biotecnología a la ciencia. Uno de los principales modelos utilizados para la expresión y purificación de proteínas recombinantes son las bacterias *E. coli*. Dentro de las diversas ventajas del uso del modelo *E. coli* para la obtención de proteínas recombinantes se menciona la existencia de una gran cantidad de vectores plasmidiales disponibles comercialmente, el conocimiento completo del genoma bacteriano, el conocimiento de su metabolismo y fisiología, y la rapidez proliferativa que presentan dichas bacterias, entre otros. Sin embargo, una de las principales desventajas del uso del modelo bacteriano es su incapacidad de realizar un importante grado de modificaciones post-traduccionales, los cuales sólo son generados por células eucariontes (Lara, 2011).

Las modificaciones post-traduccionales pueden conferir diversas propiedades estructurales y funcionales a las proteínas. Las glicosilaciones generadas en retículo endoplasmático y aparato de Golgi se relacionan con el plegado de las proteínas, su antigenicidad, su actividad biológica y su vida media (Blom *et al.*, 2004). T-DAF es una glicoproteína de membrana destinada desde el aparato de Golgi (Krautz *et al.*, 2000) y por lo tanto el uso de *E. coli* como modelo para obtener T-DAF recombinante podría determinar la generación de una proteína con estructura y funcionalidad diferente a la proteína que expresa normalmente *T. cruzi*. A pesar de esto, en la literatura se han descrito otras proteínas recombinantes de *T. cruzi* que han sido generadas y purificadas utilizando modelos bacterianos como es el caso de la calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT). La TcCRT es una molécula chaperona de retículo endoplasmático altamente pleiotrópica, la cual juega un rol importante en varias interacciones hospedero-parásito (Valck *et al.*, 2010). Para su clonamiento, se obtuvo el gen que codifica la proteína desde una biblioteca genómica de *T. cruzi* cepa Miranda/76; posterior a esto se generó una construcción utilizando como vector el bacteriófago λ gt-11, el que se utilizó para infectar bacterias *E. coli* Y-1090 (Aguillón *et al.*, 2000). TcCRT recombinante, generada con técnicas de biología molecular similares a las usadas en esta memoria de título, ha demostrado presentar actividad, inhibiendo tanto la VC (Ferreira *et al.*, 2004), como en la VL (Sosoniuk *et al.* 2014) del C de humanos.

Por otro lado, diversos estudios han logrado generar la proteína DAF de humano (HuDAF) recombinante. Moran *et al.* (1992) generó 3 tipos de HuDAF recombinante

derivado de células de ovario de hámster chino (CHO). El primer HuDAF recombinante generado poseía tallo GPI y fue denominado DAF de membrana (mDAF), el segundo era liberado a partir de mDAF, por lo que no poseía tallo GPI (sDAF) y el tercero, denominado DAF secretado (seDAF) fue generado mediante la delección de la señal para generar el tallo GPI. Al probar la actividad de estas proteínas recombinantes, se vio que todas bloqueaban la actividad del C, tanto las formas de membrana como las proteínas recombinantes solubles.

Años más tarde se generó HuDAF a partir de bacterias *E. coli*, utilizando como vector al plasmidio pET. Esta proteína recombinante fue obtenida a partir cuerpos de inclusión y por lo tanto requirió de métodos de repliegamiento, obteniendo de esta forma HuDAF recombinante soluble. Al probar la funcionalidad de esta proteína se llegó a la conclusión de que este era funcionalmente similar a los HuDAF solubles recombinantes obtenidos por Moran *et al.* el año 1992, teniendo como principal ventaja, que este modelo procariota permite generar grandes cantidades de proteína la recombinante (White *et al.*, 2004).

El mecanismo por el cual DAF actúa sobre el C se ha sido ampliamente investigado. Lublin y Atkinson (1989) señalaron que la región activa de HuDAF se encontraba en SCRs presentes en la proteína, pero se desconocía qué región de estas sería la responsable de la unión con C3b. Trabajos más recientes han podido dilucidar que HuDAF posee un total de 4 SCRs de 60 aminoácidos de longitud, las cuales incluirían la parte funcional de la proteína. Mediante mutaciones realizadas en estas regiones se pudo demostrar que la actividad de DAF residiría en 3 de las 4 SCRs, ya que al generar mutaciones en las SCR 2 y 3, se inhibe la actividad de DAF sobre la VC y VA, mientras que alteraciones en la SCR 4 afectan la actividad de la proteína sobre la VA solamente (Kuttner-Kondo *et al.*, 2001). Estas SCR descritas para HuDAF se encuentran presentes en diversas moléculas del complemento, tales como Factor B, Factor H, CR1, entre otras, por lo que se asocia la presencia de estas a la unión con C4b o C3b. Además, poseen un marco de aminoácidos altamente conservados que incluyen un triptófano, una prolina y dos a cuatro residuos de cisteína (Fujita *et al.*, 1987; Tomlinson y Raper, 1998).

Se describe que la secuencia de T-DAF, por otro lado, posee 1,5 SCRs, pero que al contrario con las SCRs presentes en HuDAF, estas no poseen este marco de aminoácidos altamente conservados. En la actualidad se desconoce que implicancias tendría la ausencia

de estos residuos estructuralmente importantes (Tomlinson y Raper, 1998), por lo que sería de gran relevancia realizar investigaciones con el fin de dilucidar los motivos funcionales de T-DAF.

Las proteínas más abundantes en la superficie de *T. cruzi* son aquellas pertenecientes a las familias *trans*-sialidasa y mucina, las cuales, en su conjunto, representan el 5% del genoma del parásito. La gran variedad de genes que codifican *trans*-sialidasas ha resultado en la existencia de una gran cantidad de moléculas que forman parte de esta familia. Sin embargo, al contrario de las *trans*-sialidasas canónicas que se relacionan con la adquisición de ácido siálico desde el hospedero, las denominadas *trans*-sialidasas-*like* no presentan dicha actividad. Dentro de este último grupo se encuentra T-DAF (Frasch, 2000).

Las *trans*-sialidasas-*like* poseen un 30-40% de homología con la familia de las *trans*-sialidasas y se expresan en tripomastigotes sanguíneos, metacíclicos y en amastigotes. Se describe que los genes que codifican para este grupo de proteínas están en constante duplicación, mutación y recombinación, además de existir la co-expresión de un gran número de variantes (Frasch, 2000).

La alta heterogenicidad genética que posee *T. cruzi*, se relaciona con la adaptación del parásito a sus diferentes hospederos. Esta heterogenicidad generaría un gran impacto a nivel fenotípico, influenciando desde la forma que poseen los tripomastigotes, hasta su perfil antigénico, su virulencia, metaciclologénesis, patogenicidad, tropismo celular y la sensibilidad a los fármacos anti-chagasicos (Buscaglia y Di Noia, 2003; Frasch, 2000). Al ser T-DAF caracterizada como una *trans*-sialidasas-*like*, su estudio recobra gran importancia, debido a que la constante mutación que sufren este tipo de proteínas podría estar directamente relacionada con la evasión del sistema inmune por parte del parásito. Además, al ser las *trans*-sialidasas-*like* un sub-miembro de la familia de las *trans*-sialidasas, se genera la posibilidad de que T-DAF, además de poseer acción como una proteína aceleradora del decaimiento de la C3 convertasa, esta tenga otras funciones relacionadas con la unión a ácido siálico ().

A pesar de que en esta memoria de título se amplificó en reiteradas ocasiones la secuencia nucleotídica codificante para T-DAF completa, siempre se evidenció la carencia de un nucleótido que no se encontraba descrita en la secuencia para T-DAF (cepa Dm28c) presente en bases de datos de internet. Este resultado sugiere un problema en la anotación del gen de T-DAF para esta cepa. Sin embargo, no se descarta que producto de la gran cantidad

de duplicación y recombinación a la que se encuentran sometidos los genes codificantes para *trans-sialidasas-like*, los amplificadores obtenidos en esta memoria de título hayan correspondido siempre a secuencias alteradas por el parásito. La plataforma que se usó en esta memoria de título para la obtención de la región nucleotídica codificante para T-DAF fue GenBank. En la actualidad esta contiene secuencias nucleotídicas para aproximadamente 260.000 especies distintas, las cuales se obtienen principalmente a través de publicaciones de laboratorios individuales y presentaciones de proyectos de secuenciación a gran escala (Benson *et al.*, 2013). Debido al gran valor que poseen esta y otras bases de datos públicas para el desarrollo científico, se han realizado múltiples trabajos con la finalidad de dilucidar el nivel de error que poseen en sus anotaciones, debido a que la mayoría de las secuencias proteicas encontradas no han sido caracterizadas experimentalmente, siendo solamente el resultado de análisis computacionales (Schnoes *et al.*, 2009). Los errores presentes en las secuencias nucleotídicas pueden conducir a errores en la detección de señales de inicio y término, la suposición de la presencia de polimorfismos y errores al estimar la tasa de sustitución de nucleótidos o recombinación, lo que puede tener consecuencias graves al realizar comparaciones intraespecíficas en especies con baja variabilidad genética (Wesche *et al.*, 2004). Schnoes *et al* (2009) investigaron el nivel de error en las anotaciones proteicas en cuatro bases de datos (UniProt/Swiss-Prot, GenBank, UniProtKB/TrEMBL y KEGG) comparando 37 familias de enzimas, de las cuales existe un gran trabajo experimental disponible, con lo publicado en estas bases de datos. Swiss-Prot fue la base de datos con menor error, obteniendo casi un 0% en la mayoría de las familias estudiadas, en cambio las otras 3 bases de datos nombradas con anterioridad presentaron errores que iban desde el 5% al 63% en 6 de las 37 familias enzimáticas estudiadas. Wesche *et al* (2004), por otro lado, analizaron el nivel de error presente en secuencias de DNA anotadas en GenBank para el genoma del ratón, comparando estas con secuencias obtenidas como parte de un proyecto de secuenciación del genoma de ratón cepa C57BL/6J y otras publicaciones de otros laboratorios. Debido a que los ratones C57BL/6J han sido generados mediante apareamiento hermano-hermana por más de 100 generaciones, se asumió que estos no poseían polimorfismos en sus secuencias, estimando que el error era de 0,1% para secuencias exones y un 0,22% para intrones, lo que es muy bajo en comparación con el error descrito en otros trabajos.

Uno de los principales motivos que generan errores en las bases de datos, es la anotación de secuencias proteicas deducidas en base a secuencias similares de proteínas anotadas con anterioridad, teniendo estas un rango de error de un 5% a un 40%. Además de deducir las secuencias proteicas en base a comparaciones, este error se extiende al deducir también las funciones que poseerían estas proteínas basándose en que secuencias proteicas similares poseerían similar actividad (Devos y Valencia, 2001; Jones *et al.*, 2007).

En resumen, en esta memoria de título se expresó, purificó y caracterizó la proteína T-DAF recombinante de *T. cruzi*. Estos resultados abren las puertas a futuras investigaciones tendientes a dilucidar la funcionalidad de esta proteína. Además, el estudio en profundidad tanto de T-DAF, como de otras proteínas que *T. cruzi* utiliza para evadir el sistema inmune de sus hospederos, representa una posible herramienta que a futuro podría formar parte de un nuevo blanco terapéutico para la generación de agentes farmacológicos que pudieran emplearse para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILLÓN, J.; FERREIRA, L.; PÉREZ, C.; COLOMBO, A.; MOLINA M.; WALLACE, A.; SOLARI, A.; CARVALLO, P.; GALINDO, M.; GALANTI, N.; ÖRN, A.; BILLETTA, R.; FERREIRA, A. 2000. Tc45, a Dimorphic *Trypanosoma cruzi* Immunogen with Variable Chromosomal Localization, is Calreticulin. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 63(5): 211-215.

APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.M.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. Revista Chilena de Infectología. 25(3): 190-193.

BENSON, D.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.; OSTELL, J.; SAYERS, E. 2013. GenBank. Nucleic Acids Research. 41: 36-42.

BLOM, N.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. Proteomics. 4(6): 1633-1649.

BUSCAGLIA C.; DI NOIA, J. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. Microbes and Infection. 5(5): 419-427.

DEVOS, D.; VALENCIA, A. 2001. Intrinsic errors in genome annotation. TRENDS in Genetincs. 17(8): 429-431.

FRASCH, A. 2000. Functional Diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Today. 16(7): 282-286.

FENTON, B.; JOINER, K. 1993. Developmentally Regulated Virulence Factors of *Trypanosoma cruzi* and Their Relationship to Evasion of Host Defenses. The Journal of Eukaryotic Microbiology 40(2):207-213.

FERREIRA V.; VALCK, C.; SÁNCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA S.; MOLINA, M.; SIM, ROBERT.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. 2004. The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Immunology. 172(5): 3042-3050

FUJITA, T.; INOUE, T.; OGAWA, K.; IIDA, K.; TAMURA, N. 1987. The Mechanism of Action of Decay-Accelerating Factor (DAF): DAF Inhibits the Assembly of C3 Convertases by Dissociating C2a and Bb. The Journal of Experimental Medicine. 166(5): 1221-1228

HOURCADE, D. 2006. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. The Journal of Biological Chemistry. 281(4):2118-2132.

JONES, C.; BROWN, A.; BAUMANN, U. 2007. Estimating the annotation error rate of curated GO database sequence annotations. BMC Bioinformatics. 8:170-179.

- KRAUTZ, G.; KISSINGER J.; KRETTLI, A.** 2000. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. 16(1):31-34.
- KUTTNER-KONDO, A.; MITCHELL, L.; HOURCADE, D.; MEDOF, M.** 2001. Characterization of the Active Sites in Decay-Accelerating Factor. *The Journal of Immunology*. 167: 2164-2171.
- LARA, A.** 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(2): 209-223.
- LUBLIN, D.; ATKINSON, J.** 1989. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annual Review of Immunology*. 7: 35-58
- MATHERN, D.; HEEGER, P.** 2015. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 10(9):1636-1650
- MORAN, P.; BEASLEY, H.; GORRELL, A.; MARTIN, E.; GRIBLING, H.; FUCHS, N.; BURTON, L.; CARAS, I.** 1992. Human recombinant soluble decay accelerating factor inhibits complement activation in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*. 149:1736-1743.
- MORLEY, B.; WALPORT, M.** 2000. *The Complement Facts Book*. Academic Press. London, UK. 228p.
- NICHOLSON-WELLER, A; BURGE, J.; FEARON, D.; WELLER, P.; AUSTEN, K.** 1982. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *The Journal of Immunology*. 129(1): 184-189.
- PAHO.** 2014. Enfermedad de Chagas. [en línea] <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743> [27-02-2015]
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES, J.** 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 26(2):275-291.
- SCHNOES, A.; BROWN, S., DODEVSKI, I.; BABBITT, P.** 2009. Annotation Error in Public Databases: Misannotation of Molecular Function in Enzyme Superfamilies. *Computational Biology*. 5(12).
- SOLANA, M.; FERRER, M.; NOVOA, M.; SONG, W.; GOMEZ, R.** 2012. Decay-Accelerating Factor 1 Deficiency Exacerbates *Trypanosoma cruzi*-Induced Murine Chronic Myositis. *Muscle and Nerve*. 46(4):582-587

SOSONIUK, E.; VALLEJOS, G.; KENAWY, H.; GABORIAUD, C.; THIELENS, N.; FUJITA, T.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.; VALCK, C. 2014. *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. *Molecular Immunology*. 60(1):80-85.

TAMBOURGI, D.; KIPNIS, T.; DIAS, W.; JOINER, K.; SHER, A.; HEATH, S.; HALL, B.; OGDEN, G. 1993. A Partial cDNA Clone of Trypomastigote Decay-Accelerating Factor (T-DAF), a Developmentally Regulated Complement Inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, Has Genetic and Functional Similarities to the Human Complement Inhibitor DAF. *Infection and Immunity*. 61(9):3656-3663.

TAPIA, V.; GALDAMES, P.; RAMIREZ, G. 2012. Mecanismos de evasión del sistema del complemento utilizados por *Trypanosoma cruzi*. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 27(2):10-19.

TOMLINSON, S.; RAPER, J. 1998. Natural Human Immunity to Trypanosomes. *Parasitology Today*. 14(9): 354-359.

VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; LÓPEZ, N.; RIBEIRO, C.; MALDONADO, I.; SÁNCHEZ, G.; FERREIRA, V.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. 2010. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Molecular Immunology*. 47(7-8):1516-121

VIDYA, J.; WARD, P. 2011. The complement system. *Cell and Tissue Research*. 343:227-235.

WESCHE, P.; GAFFNEY, D.; KEIGHTLEY, P. 2004. DNA Sequence Error Rates in Genbank Records Estimated using the Mouse Genome as a Reference. *DNA Sequence*. 15(5/6): 362-364.

WHITE, J.; LUKACIK, P.; ESSER, D.; STEWARD, M.; GIDDINGS, N.; BRIGHT, J.; FRITCHLEY, S.; MORGAN, B.; LEA, S.; SMITH, G.; SMITH, R. 2004. Biological activity, membrane-targeting modification and crystallization of soluble human decay accelerating factor expressed in *E. coli*. *Protein Science*. 13:2406-2415.