

Purificación y estudio de la actividad enzimática de las superóxido dismutasas glicosomales de *Leishmania infantum*

Daniel Elvira Blázquez, Juan Carlos García Soriano, Héctor Elessar de Lucio Ortega, Antonio Jiménez Ruíz^a

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

a. antonio.jimenez@uah.es

Palabras clave: leishmaniosis; *Leishmania infantum*; glicosoma; SODB1; SODB2; IMAC

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por especies del género *Leishmania*, unos protozoos flagelados que infectan los macrófagos de sus hospedadores vertebrados. Estos parásitos son capaces de sobrevivir al estrés oxidativo del fagolisosoma gracias a un conjunto de enzimas antioxidantes, entre las que se encuentra la superóxido dismutasa (SOD). La SOD es una enzima dimérica capaz de dismutar los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. En *Leishmania*, a diferencia del ser humano, las SODs poseen como cofactor un átomo de hierro. Estos parásitos poseen 4 isoformas de la SOD: dos glicosomales (SODB1 y SODB2) y dos mitocondriales (SODA y SODC). Los glicosomas son unos orgánulos que compartimentan una gran variedad de rutas metabólicas en estos parásitos. Algunas de ellas, como la β -oxidación de ácidos grasos, generan especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las que se encuentran los radicales superóxido, que son retirados de los glicosomas gracias a SODB1 y SODB2. Algunos autores han demostrado que el knock-down simultáneo de ambas enzimas en *Trypanosoma brucei* reduce drásticamente la supervivencia de estos parásitos. Por estos motivos, SODB1 y SODB2 podrían ser unas buenas dianas terapéuticas. En este trabajo hemos realizado el clonaje de los genes que codifican las enzimas SODB1 y SODB2 de *Leishmania infantum* con objeto de expresar estas proteínas unidas a una etiqueta molecular de 6 histidinas que permite su purificación mediante una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Nuestro trabajo permite concluir que la expresión óptima de His6-SODB1 se obtiene tras una inducción de 2 horas a 16°C. En el caso de His6-SODB2 los mejores resultados se obtuvieron tras 4 horas a 16°C. Las proteínas SODB1 y SODB2 escindidas de su tag His6 presentaron una pureza de un 97.4% y un 93.9%, respectivamente. Finalmente, se realizó un ensayo de actividad con el que se confirmó que ambas enzimas son funcionales.

Cita: Elvira Blázquez, Daniel; García Soriano, Juan Carlos; de Lucio Ortega, Héctor Elessar; Jiménez Ruíz, Antonio (2018) Purificación y estudio de la actividad enzimática de las superóxido dismutasas glicosomales de *Leishmania infantum*. *dianas* 7 (2): e20180905. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20180905. URI http://hdl.handle.net/10017/15181](http://hdl.handle.net/10017/15181)

Copyright: © Elvira-Blázquez D, García-Soriano JC, de-Lucio-Ortega HE, Jiménez-Ruíz A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por especies del género *Leishmania*, perteneciente a la clase Kinetoplastida y al orden Trypanosomatida. Es un protozoo flagelado parásito obligado que infecta macrófagos, células dendríticas de la piel y de las vísceras. Esta enfermedad está incluida dentro del grupo que recibe el nombre de enfermedades tropicales desatendidas (NTDs, por sus siglas en inglés) [1, 2].

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida por el mundo, pudiéndose localizar en el Viejo Mundo (Asia, África y sur de Europa) y en el Nuevo Mundo (Centroamérica y Sudamérica). Su transmisión es debida a la picadura de dípteros hematófagos incluidos en los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) [1, 3].

Cada año surgen entre 0.7 y 1.2 millones de casos nuevos de leishmaniasis [1] y se cree que con el cambio climático van a empezar a surgir casos en regiones en las que no existía dicha enfermedad [2]. La leishmaniosis tiene carácter oportunista, ya que una gran parte de los afectados presenta alguna deficiencia en el sistema inmune como el SIDA [4].

Existen 3 tipos principales de leishmaniosis, que va a depender de la especie de *Leishmania* que infecte al hospedador: leishmaniosis visceral o *kala-azar*, mortal en más del 95% de los casos no tratados, causada por especies del complejo *L. donovani*; leishmaniosis cutánea, la más frecuente de las 3, provocada por especies de los complejos *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*; y

leishmaniosis mucocutánea, semejante a la anterior, causada principalmente por el complejo *L. braziliensis* [2, 5].

Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Las hembras de los flebótomos necesitan sangre para su alimentación y para el desarrollo de los huevos. Cuando los flebótomos pican a un hospedador ya infectado, estos incorporan la sangre a su cavidad abdominal, junto con amastigotes de *Leishmania* que portaba el hospedador. En las condiciones del tracto digestivo del flebótomo (26°C, pH ~ 7) [6], a las 36 - 48 horas desde la ingesta, los amastigotes comienzan a transformarse en promastigotes procíclicos, los cuales poseen aspecto alargado, delgado, con un largo flagelo antero-nuclear y cuentan con la presencia de lipofosfoliglicanos en su superficie para poder adherirse a las paredes del tracto digestivo del flebótomo [5, 7].

En el período de 2 - 5 días, los promastigotes procíclicos se dividen mitóticamente, a la vez que comienzan a avanzar por el tracto digestivo hacia la probóscide del flebótomo. A medida que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, los promastigotes procíclicos empiezan a diferenciarse a promastigotes metacíclicos infectivos y dejan de dividirse. Estos promastigotes poseen un tamaño menor y un flagelo más prominente, y se trasladan detrás de la válvula estomodeal (entre el estomodeo y el mesenterón del flebótomo) obstruyéndola. Dicha válvula degenera paulatinamente, permitiendo el avance de alguno de los promastigotes metacíclicos a las probóscides del flebótomo, dispuestos para infectar al siguiente hospedador [8, 9].

El flebótomo portador de promastigotes metacíclicos, vuelve a picar a otro individuo, pero esta vez el flebótomo transfiere los promastigotes metacíclicos infectivos que se situaban en la probóscide al individuo sano. Los promastigotes pueden seguir dos vías: ser directamente fagocitados por macrófagos [8]; o ser primero fagocitados por granulocitos polimorfonucleares (PMNs) (son los primeros en llegar), utilizando a estos como caballo de Troya. Según esta estrategia, algunos PMNs son incapaces de lisis a los parásitos y entrarían en apoptosis, exponiendo la fosfatidilserina en la superficie externa de su membrana plasmática. Es entonces cuando los macrófagos reconocerían y fagocitarían a estos PMNs, adquiriendo los promastigotes infectivos [8, 9]. Las condiciones presentes en el fagolisosoma del macrófago (37°C, pH 4.5 - 5.5) inducen la diferenciación de promastigote metacíclico infectivo a amastigote [8], con una forma redondeada, carente de flagelo y de un tamaño menor. Los amastigotes proliferan dentro del fagolisosoma hasta provocar su liberación al medio, infectando células circundantes. El ciclo se cierra cuando otro flebótomo no portador pica a este individuo [5].

Supervivencia en el fagolisosoma

Cuando el parásito es fagocitado por un PMN o por un macrófago, se tiene que enfrentar a una serie de adversidades dentro del fagolisosoma, entre las que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos ROS producen modificaciones covalentes en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [10]. Los ROS se generan en el lumen del fagolisosoma a causa de una enzima denominada NADPH oxidasa (NOX2). Esta enzima utiliza el NADPH como donador de electrones y se los cede al O₂, generándose radicales superóxido (O₂⁻) [11].

Los tripanosomátidos disponen de un conjunto de enzimas antioxidantes para combatir este estrés oxidativo. En el caso del radical superóxido, los tripanosomátidos lo eliminan gracias a la enzima superóxido dismutasa (SOD), una metaloenzima dimérica antioxidante que cataliza la siguiente reacción:



El superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitrito (ONOO⁻), una especie reactiva de nitrógeno (RNS) que genera estrés nitrosativo, con efectos devastadores para la viabilidad del parásito. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado en la reacción de la SOD también es perjudicial para el parásito. Los tripanosomátidos carecen de catalasa para eliminar el H₂O₂, pero en su defecto poseen una amplia variedad de peroxidases [12].

Superóxido dismutasas en *Leishmania* sp.

La mayoría de los eucariotas poseen SODs con cofactores de cobre y zinc, o SODs con manganeso [13]; sin embargo algunos procariotas, protozoos como *Leishmania* y orgánulos como cloroplastos poseen SODs con cofactor de hierro [13, 14]. Yamano y colaboradores confirman además que las SODs con hierro presentan una mayor sensibilidad a compuestos como la azida sódica o el fluoruro de sodio que las SODs con manganeso. Esta diferencia podría ser clave para considerar las SODs de *Leishmania* como potenciales dianas terapéuticas para la leishmaniosis [15].

En los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* (englobados en la familia Trypanosomatidae), hay descritas 4 isoformas de SODs: SODB1 y SODB2 en glicosomas (orgánulo característico de estos parásitos); y SODA y SODC en mitocondria [16, 17].

Glicosomas

Los glicosomas son unos orgánulos exclusivos de la clase Kinetoplastida que están compuestos de una única bicapa lipídica. Reciben dicho nombre porque en ellos se encuentran la mayoría de las enzimas glicolíticas que son citosólicas en eucariotas superiores. Esta compartimentación de las enzimas glicolíticas ha provocado la pérdida de su regulación alostérica. En estos orgánulos se producen los primeros pasos de la glucólisis, la fermentación aeróbica de glucosa a succinato y, en menor medida, la ruta de las pentosas-fosfato, la β -oxidación de ácidos grasos, la reposición de las purinas y la biosíntesis de pirimidinas, éter-lípidos y escualenos [18].

Estos orgánulos presentan una gran similitud con los peroxisomas. De hecho, *T. brucei* presenta 12 proteínas homólogas a las peroxinas que se encargan de la biogénesis de peroxisomas en células de mamíferos [19]. Sin embargo, tan solo se ha demostrado la funcionalidad en 2 de ellas en *L. donovani* [20, 21].

Es amplia la literatura que afirma la presencia de una gran cantidad de ROS debido a todas las rutas metabólicas que en los peroxisomas acontecen [22, 23]. En este sentido, cabe destacar la existencia de una gran variedad de enzimas antioxidantes para paliar esta generación de ROS en dichos orgánulos, entre las que se encuentran las SODs glicosomales y algunas peroxidases.

SODB1 y SODB2

Las enzimas antioxidantes glicosomales SODB1 y SODB2 poseen una señal de localización subcelular en el extremo C-Terminal (PTS1) que las dirige a glicosomas. Esta señal consta de 3 aminoácidos con el motivo SKL. Estudios *in silico* realizados en *T. brucei* han mostrado que, por un lado, SODB2 posee el PTS1 no canónico SDL que permite su transporte al glicosoma. Por otro, SODB1 presenta el motivo incompleto LKS y no es capaz de entrar en glicosomas por sí sola. Por ello se piensa que, en *T. brucei*, el homodímero SODB2 y el heterodímero SODB1/SODB2 se encontrarían en glicosomas, mientras que el homodímero SODB1 se localizaría en citosol [24]. En este sentido, otros autores localizaron en *T. brucei* la SODB2 en glicosomas y la SODB1 tanto en glicosomas como en citosol [17]. Sin embargo, estudios realizados en *L. infantum* demostraron que los motivos SQL de SODB1 y SDL de SODB2 direccionan ambas proteínas a glicosomas [25].

Plewes y colaboradores [25], mediante análisis de Northern blot, revelaron que existe una expresión diferencial de SODB1 y SODB2 en *L. infantum* en función del estadio en el que se encuentre. El máximo de expresión de SODB2 se da en el estadio de promastigote logarítmico, de lo que deducen que tiene una gran importancia en la supervivencia del parásito en el intestino del flebótomo; mientras que el máximo de expresión de SODB1 se observa en los estadios de promastigotes estacionarios y amastigotes, por lo que parece que tiene gran importancia para la supervivencia en el interior de los macrófagos.

Wilkinson y colaboradores realizaron un *knock-down* con ARN de interferencia para cada una de las SODs de *T. brucei*. El *knock-down* de la SODB1 no tiene ningún efecto, mientras que el de la SODB2 produce un ligero descenso de la viabilidad. El silenciamiento simultáneo de ambas proteínas provoca un descenso drástico en la viabilidad de los parásitos [17].

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es realizar el clonaje, la expresión y purificación de las proteínas glicosomales SODB1 y SODB2 de *L. infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) así como determinar si estas proteínas purificadas presentan actividad enzimática.

Material y métodos

A continuación, se describe el conjunto de técnicas empleadas en el desarrollo del trabajo para cumplir con el objetivo mencionado.

Extracción de ADN genómico de promastigotes de *L. infantum*

La extracción de ADN genómico de *L. infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) se realizó mediante lisis térmica de promastigotes a 65°C durante 1 hora en tampón de lisis recién preparado (200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0.5% SDS y 100 μ g/mL proteinasa K).

Oligonucleótidos empleados

Se emplearon las siguientes parejas de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes de cada una de las SODs con las que se trabajaron:

Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs)

Las PCRs se llevaron a cabo empleando el kit Pwo Master (Roche) con 1 ng/ μ L de ADN genómico extraído de *L. infantum* y los oligonucleótidos mencionados anteriormente (Tabla 1) a 400 nM cada uno. El programa de PCR para ambos genes se muestra en la Tabla 2:

Gen	Secuencias oligonucleótidos
<i>sodb1</i>	Directo: 5'- GGGGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCATGCCGTTTCGCTGTTTCAGCC -3'
	Reverso: 5'- CCCAAGCTTTTAAAGCTGGCTAGAGGGCGAAATCCCAGTCCACC -3'
<i>sodb2</i>	Directo: 5'- GGGGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCATGCCGTTTCGCTGTTTCAGCC -3'
	Reverso: 5'- CCCAAGCTTTTACAGATCACTGTTGACGTAGTGGGAGCCACCAGC -3'

Tabla 1.- Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para cada gen. Se encuentra señalada la secuencia diana de BamHI (rojo), la secuencia diana de HindIII (azul), la secuencia que dará la secuencia diana de la proteasa PreScission (verde) y secuencia de hibridación con el gen correspondiente (naranja).

Ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial del ADN	94°C	2 minutos
30	Desnaturalización del ADN	94°C	30 segundos
	Anillamiento	56.7°C	30 segundos
	Elongación	72°C	40 segundos
1	Elongación final	72°C	10 minutos
1	Almacenamiento	4°C	-

Tabla 2: Programa de PCR empleado para la amplificación de los genes SODB1 y SODB2.

Ligación de extremos romos de los productos de PCR a pJET1.2/blunt

Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis a 100V en un gel de agarosa (CondaLab) al 1% con bromuro de etidio. Una vez confirmado su tamaño se cortaron y purificaron con el kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

Los productos de PCR purificados del gel de agarosa se ligaron en el vector linealizado de extremos romos pJET1.2/blunt a 22°C durante 5 minutos utilizando el kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific). Los productos de las ligaciones fueron transformados en bacterias competentes *E. coli* DH5 α que se seleccionaron con ampicilina. Finalmente, se extrajo el ADN plasmídico de las colonias seleccionadas y se verificó la presencia del inserto mediante digestión enzimática y secuenciación de Sanger.

Transformación en bacterias competentes

La transformación de bacterias competentes se realizó mediante choque térmico a 42°C durante 90 segundos para, finalmente, sembrarlas en placas de agar con medio LB suplementado con los antibióticos de selección correspondientes.

Digestión enzimática de ADN plasmídico

Previamente a la digestión se realizó una extracción del ADN plasmídico de colonias crecidas a 37°C durante 16 horas en medio LB suplementado con antibióticos de selección utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAgen).

Este ADN plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción para la secuencia diana que les fue incorporada en los oligonucleótidos; BamHI y HindIII FastDigest (Thermo Fisher Scientific), durante 50 minutos a 37°C.

Ligación de extremos cohesivos de los productos de digestión a pET28a(+)

Los productos de digestión de las construcciones pJET1.2-SODB1 y pJET1.2-SODB2 fueron analizados en un gel de agarosa 1%. Los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias codificantes para la SODB1 y la SODB2 se purificaron del gel con el kit Illustra™.

Los fragmentos de ADN purificados se ligaron en el vector de expresión pET28a(+), previamente abierto también con las enzimas BamHI y HindIII, en una proporción 6:1 (inserto:vector) empleando 0.5 U/ μ L de T₄ ADN Ligasa (Thermo Fisher Scientific) a 22°C durante 1 hora.

El producto de ligación se transformó en bacterias competentes *E. coli* DH5 α seleccionando con kanamicina. Tras esto se extrajeron los plásmidos de las colonias resultantes y se confirmó la presencia del inserto deseado en ellos por digestión enzimática.

Finalmente, las construcciones confirmadas pET28a-His₆-SODB1 y pET28a-His₆-SODB2 fueron transformadas en bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta II y éstas se sembraron en placas de agar de LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se cargaron las muestras de lisados bacterianos y proteínas en geles de poliacrilamida al 15%. La electroforesis se realizaron a 200 V. Los geles se revelaron mediante tinción de coomasie con agitación leve durante 1 hora a temperatura ambiente. El azul de coomasie se compone de 0.2% w/v Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich), 10% v/v ácido acético (AppliChem) y 50% etanol absoluto (AppliChem).

Para llevar a cabo la densitometría, se utilizó el software ImageLabTM (BioRad).

Inducción de la expresión proteica en *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta II

La expresión de ambos genes se llevó a cabo en bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta II, las cuales se incubaron en medio LB suplementado con los antibióticos de selección kanamicina (50 μ g/mL) y cloranfenicol (25 μ g/mL) en un incubador orbital a 200 rpm y 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.4 – 0.6. En este momento se indujo la expresión de la proteína clonada añadiendo 1 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubando a las temperaturas indicadas en la sección de resultados y a 200 rpm durante 2 y 4 horas. Transcurrido dicho tiempo, el cultivo se centrifugó a 9000xg durante 4 minutos a 4°C y el sobrenadante fue descartado.

Purificación proteica de His₆-SODB1 y His₆-SODB2 mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC)

Las bacterias recogidas por centrifugación fueron resuspendidas en tampón de lisis recién preparado en una proporción de 30 mL / gramo de bacterias, y se dejó incubando en hielo durante 30 minutos. La composición del tampón de lisis fue la siguiente: 300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.7, 10 mM MgCl₂, 3 mM β -mercaptoetanol, 5% Glicerol, 25 mM imidazol, 1% v/v cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 1 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich).

Después, el lisado se sonicó en hielo durante 30 minutos con pulsos del 50% a una potencia de 7 con un Sonifier Cell Disruptor B15 (Branson Sonic Power Co.). El lisado se centrifugó a 9000xg durante 1 hora a 4°C y se recogió el sobrenadante para volver a sonicar 10 minutos con las condiciones antes descritas, y finalmente se filtró en un filtro PVDF de 0,45 μ m (fracción soluble). El precipitado resultante de la anterior centrifugación se disolvió con urea 8 M en el mismo volumen usado para la lisis de las bacterias (fracción insoluble).

El sobrenadante se dejó recirculando, mediante una bomba peristáltica, a través de una columna de níquel HisTrap FF crude (GE HealthcareLifeSciences) de 5 mL durante 16 horas a 4°C, previamente equilibrada con el tampón en el que dejamos nuestras proteínas (tampón A descrito a continuación).

La cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) requiere de la preparación de dos tampones: un tampón A (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7, 1 mM TCEP y 5% glicerol) y un tampón B, que tiene la misma composición y pH que el tampón A salvo por la adición de 500 mM de imidazol. Estos dos tampones se utilizaron para poder obtener tampones con distintas concentraciones de imidazol.

La columna HisTrap FF crude se conectó a un ÄKTA purifierTM UPC10 (GE Healthcare Life Sciences) donde se realizó la cromatografía. Primero se realizaron dos lavados sucesivos de la columna con tampones que contenían 25 y 50 mM de imidazol. A continuación, se realizaron 3 eluciones distintas utilizando 3 tampones que contenían 200, 350 y 500 mM de imidazol.

Las fracciones que contenían nuestra proteína se pasaron por una columna de HiPreP 26/10 Desalting (GE Healthcare), equilibrada previamente con el tampón A, quitándonos así el imidazol de las fracciones anteriormente recogidas.

Escisión de la etiqueta molecular de 6 histidinas

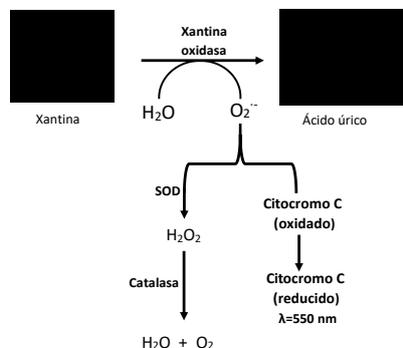
La digestión se realizó con la proteasa GST-PreScission durante 16 horas a 4°C con leve agitación, en una proporción de 1 mg de dicha proteasa por cada 30 mg de proteína.

Los productos de la digestión se sometieron a un proceso de recirculación durante 16 horas a 4°C a través de una columna GSTrap HP (GE Healthcare) acoplada a una columna HisTrap FF crude. El volumen residual, donde se encuentran las proteínas digeridas, se concentró con un Amicon Ultra-4 de 10000 MWCO (Millipore) con centrifugaciones sucesivas a 4000xg y 4°C durante 10 minutos.

Ensayo de actividad deSOD

El ensayo de actividad para detectar la actividad SOD está basado en el ensayo diseñado por McCord y Fridovich [26], aplicado para microplacas de 96 pocillos Nunclon™ Delta Surface (Thermo Fisher Scientific), cuya reacción ocurre como se muestra en el Esquema 1.

La reacción se compone de 50 mM fosfato potásico pH 7.8, 2.5 mM xantina (Sigma-Aldrich), 0.1 mM EDTA (Calbiochem), 0.02 mM citocromo c (Sigma-Aldrich), 160 nM catalasa de hígado de oveja (Roche), 75 nM xantina oxidasa (Sigma-Aldrich) y 3 μM de la proteína a analizar. Dicho ensayo se llevó a cabo a 26°C en un VersaMax Microplate Reader (Bionova), con lecturas de absorbancia a 550 nm.



Esquema 1.- Reacción del ensayo de actividad SOD.

Resultados y Discusión

Diseño de oligonucleótidos

Los genes *sodb1* (LinJ.32.1910) y *sodb2* (LinJ.32.1920) de *L. infantum* se encontraron en las bases de datos del NCBI [27] y de TriTryp [28]. En base a estas secuencias se eligieron las zonas de hibridación de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR (Tabla 1).

Los oligonucleótidos directos y reversos presentan las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción BamHI y HindIII, respectivamente. Además, los oligonucleótidos directos también contienen la secuencia de nucleótidos que codifica la diana de la proteasa PreScission entre la secuencia reconocida por BamHI y las zonas elegidas para la hibridación (Tabla 1).

De esta forma, cuando ligamos el inserto en el vector pET28a(+), el *tag*-His₆ queda dispuesto en N-terminal seguido de la secuencia diana de la proteasa PreScisión, que nos permitirá digerir y escindir el *tag*-His₆ tras la Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC).

Clonaje de los genes *sodb1* y *sodb2* en el vector de expresión pET28a(+)

Los oligonucleótidos descritos en el apartado anterior se utilizaron para amplificar DNA genómico extraído de los parásitos. Los productos de PCR así obtenidos se cargaron y corrieron en un gel de agarosa al 1%. Cortamos y purificamos de la agarosa las bandas que correspondían a las construcciones de *sodb1* (~624 pares de bases) y *sodb2* (~663 pares de bases). Estos productos de PCR se ligaron en el vector pJET1.2/blunt y se transformaron en bacterias competentes *E. coli* DH5α. Confirmamos la correcta presencia del inserto de colonias crecidas en medio LB con ampicilina mediante visualización del inserto por digestión con las enzimas BamHI y HindIII, y posterior secuenciación de Sanger. Confirmados los insertos de ambos genes, se digirieron los plásmidos con BamHI y HindIII y, las bandas correspondientes a nuestras construcciones, se purificaron y se ligaron en el vector de expresión pET28a(+), también abierto por digestión con BamHI y HindIII. Finalmente, transformamos estas ligaciones en bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta II para llevar a cabo la expresión de las proteínas His₆-SODB1 y His₆-SODB2 por inducción con IPTG (datos no mostrados).

Análisis de inducción y solubilidad de las proteínas His₆-SODB1 y His₆-SODB2

Una vez transformadas las construcciones pET28a-SODB1 y pET28a-SODB2 en las bacterias de expresión *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta II, se realizó un estudio para establecer las condiciones óptimas de expresión para ambas proteínas. Para ello, indujimos un cultivo según el procedimiento descrito en el apartado "Inducción de la expresión proteica en *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta II" de Material y Métodos.

Las pruebas de inducción y solubilidad se realizaron utilizando 3 temperaturas de inducción (37°C, 26°C y 16°C), recogiendo muestras de cada condición a las 2, 4 y 20 horas de inducir la expresión de SODB1 y SODB2 con 1 mM de IPTG. Las muestras utilizadas para analizar la solubilidad de ambas proteínas se lisaron en las condiciones usadas en la purificación final (explicadas en el apartado "Purificación proteica

de His₆-SODB1 y His₆-SODB2 mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC)” de Material y Métodos), separándose la fracción de proteínas solubles e insolubles mediante centrifugación.

En las pruebas de inducción (Figura 1), vimos una clara expresión de ambas proteínas a las tres temperaturas de incubación que se probaron, por lo que cualquiera de las temperaturas era válida para His₆-SODB1 y His₆-SODB2.

En las pruebas de solubilidad (Figura 1) se vio que la temperatura que más favorece el correcto plegamiento, y con ello una mayor proporción de proteína en la fracción soluble, es la temperatura de 16°C. En el caso de la His₆-SODB1, decidimos que, dentro de esa temperatura, la mejor condición era la de 2 horas, ya que a las 2 horas había una mayor proporción de proteína His₆-SODB1 en la fracción soluble que en el resto de tiempos. En el caso de His₆-SODB2, a 16°C todos los tiempos presentaban una mayor proporción de la proteína en la fracción soluble, aunque seleccionamos la condición de 4 horas, una condición que ha sido muy efectiva para la expresión de otras proteínas en nuestro laboratorio.

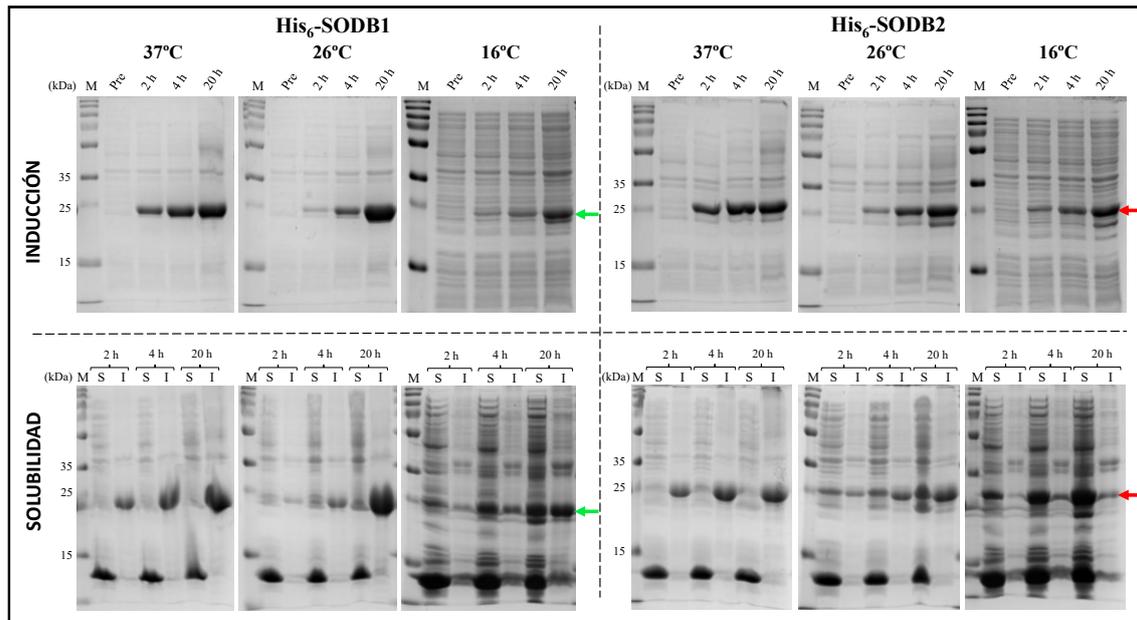


Figura 1.- Pruebas de inducción y solubilidad de las proteínas His₆-SODB1 (←) y His₆-SODB2 (→). Pruebas realizadas a 37°C, 26°C y 16°C de incubación durante 2, 4 y 20 horas. Se recogieron muestras para ver el nivel de expresión (inducción), y para evaluar la presencia de la proteína en la fracción soluble e insoluble (solubilidad). M: marcador; Pre: lisado bacteriano antes de adicionar 1 mM IPTG; S: fracción de proteínas soluble; I: fracción de proteínas insolubles.

A la luz de estos resultados, podemos asegurar que, a diferencia de lo descrito por Bachega y colaboradores [29], nosotros hemos conseguido obtener unas condiciones en las que las proteínas His₆-SODB1 y His₆-SODB2 son solubles sin la necesidad de añadir una proteína de fusión que mejore de la solubilidad. Estos autores consiguen purificar y resolver las estructuras de las proteínas SODB1 de *T. cruzi* y SODB2 de *T. brucei*, ambas con un tag de 6 histidinas, siendo necesaria la fusión adicional a la SODB1 de la proteína de fusión GST por problemas de solubilidad.

Cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC)

La presencia del tag de 6 histidinas en SODB1 y SODB2 se debe a que dicho tag permite la unión de la proteína con alta afinidad al níquel de la columna HisTrap FF crude, pudiendo llevar a cabo la purificación mediante IMAC [30, 31]. El imidazol, grupo característico de la cadena lateral de las histidinas, compite con el tag-His₆ por la unión a la columna de manera que, cuando aumentamos su concentración, desplaza a las proteínas que había unidas provocando su elución.

Recogimos y juntamos aquellas fracciones que incluían los picos de absorbancia en el ultravioleta, que contenían la proteína de interés. Realizamos una cromatografía de exclusión molecular con la columna HiPrep 26/10 Desalting de lo recogido anteriormente, y con ello eliminamos de las muestras el imidazol presente. Finalmente, concentramos la muestra con un Amicon Ultra-4 de 10000 MWCO hasta una concentración de 1 mg/mL.

En el cromatograma de His₆-SODB1 (Figura 2, izquierda), visualizamos un aumento de la absorbancia en el ultravioleta cuando se eluyó la columna con 200 mM imidazol (señalado con una flecha verde en el cromatograma). Las muestras de elución obtenidas durante la cromatografía a las distintas concentraciones de imidazol se recogieron y analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, demostrándose la presencia de His₆-SODB1 mayoritariamente en aquellas que comprendían el pico de absorbancia.

En el cromatograma de His₆-SODB2 (Figura 2, derecha), apreciamos dos aumentos drásticos de la absorbancia, uno cuando eluimos con 200 mM imidazol y otro con 350 mM imidazol (señalado con dos flechas rojas). Las muestras de elución obtenidas durante la cromatografía a las distintas concentraciones de imidazol se recogieron y analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, demostrándose la presencia de His₆-SODB2 mayoritariamente en aquellas que comprendían los dos picos de absorbancia.

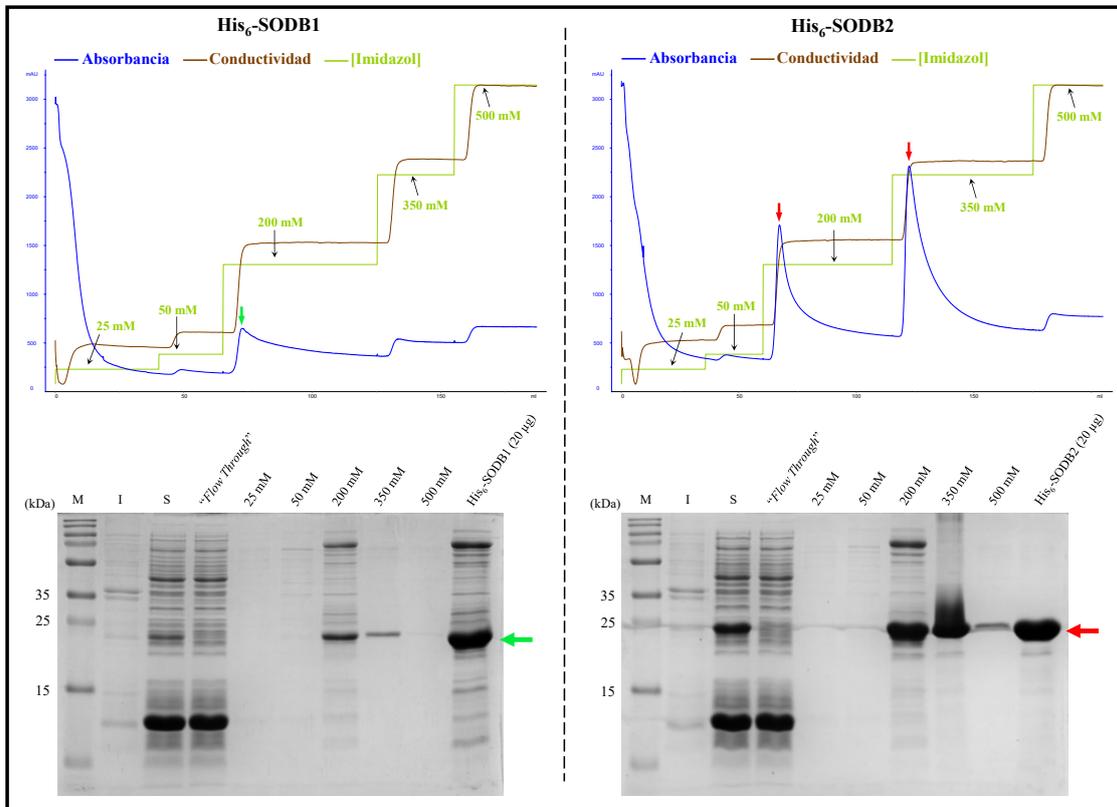


Figura 2.- Cromatogramas (IMAC) de la purificación de His₆-SODB1 (izquierda, ←) y His₆-SODB2 (derecha, ←) en una columna de Níquel HisTrap FF crude y análisis de la purificación por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y tinción de coomasie. En el gel se muestran fracciones representativas de la cromatografía de afinidad (25, 50, 200, 350 y 500 mM imidazol). El último carril muestra 20 µg de la proteína tras la última etapa del proceso de purificación. M: marcador; I: fracción insoluble del lisado; S: fracción soluble del lisado; “Flowthrough”: fracción soluble después de recircular el lisado a través de la columna HisTrap FF crude.

Escisión de la etiqueta molecular de 6 histidinas

Los genes *sodb1* y *sodb2* se clonaron en el vector pET28a(+) para la expresión de sus correspondientes proteínas fusionadas a un *tag* de 6 histidinas en el extremo N-terminal seguido de la secuencia diana de la proteasa PreScission (H₂N – LEVLFG/GP – COOH). Las secuencias que codifican el extremo N-terminal descrito se añadieron en el oligonucleótido directo (Tabla 1).

Después de realizar la digestión con la proteasa GST-PreScission y recircular a través de una columna GST-Trap unida a una HisTrap, se cargaron las muestras en un gel para ver si efectivamente se había producido digestión por la PreScission. En la columna GST-Trap se queda retenida la proteasa GST-PreScission mientras que en la columna HisTrap se quedan unidos los *tags* de 6 histidinas que se han liberado y todas aquellas proteínas contaminantes que copurificaron con las nuestras durante la cromatografía de afinidad. Con ello, aumentamos el grado de pureza de las proteínas purificadas.

En la Figura 3 podemos ver que tanto SODB1 como SODB2 han sido digeridas. Esto queda reflejado en la disminución de su tamaño. Además, durante este proceso también conseguimos aumentar el grado de pureza de nuestras fracciones. De hecho, al comparar las muestras de 20 µg de SODB1 o SODB2 (Figura 3) con las de 20 µg de His₆-SODB1 o His₆-SODB2 (Figura 2), se observa una disminución en la cantidad de proteínas contaminantes, sobre todo en el caso de SODB1. El análisis densitométrico de las proteínas digeridas, reveló que la SODB1 y la SODB2 presentan un grado de pureza del 97.4% y del 93.9%, respectivamente.

Las proteínas His₆-SODB1, His₆-SODB2, SODB1 y SODB2 se concentraron con un Amicon Ultra-4 de 10000 MWCO y se almacenaron en el tampón A con un 50% de glicerol, a -20°C.

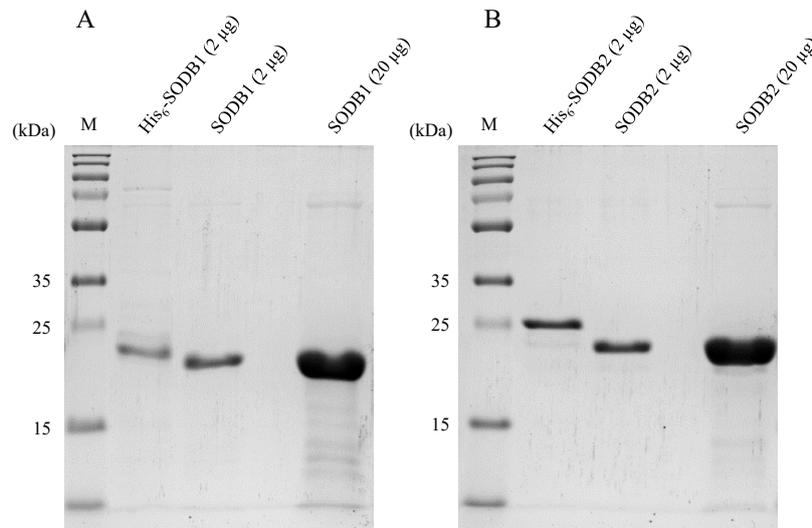


Figura 3.- Digestión de las proteínas His₆-SODB1 y His₆-SODB2 con la proteasa GST-PreScission. Muestra antes y después de la digestión con la proteasa GST-PreScission de las proteínas His₆-SODB1(A) y His₆-SODB2 (B). El último carril de cada gel muestra 20 µg de cada proteína tras su digestión y posterior concentración hasta 1 mg/mL.

Ensayo de actividad SOD

Finalmente, para comprobar si las proteínas purificadas son activas, realizamos un ensayo de actividad enzimática basado en el de McCord y Fridovich [1], aplicado a microplacas de 96 pocillos.

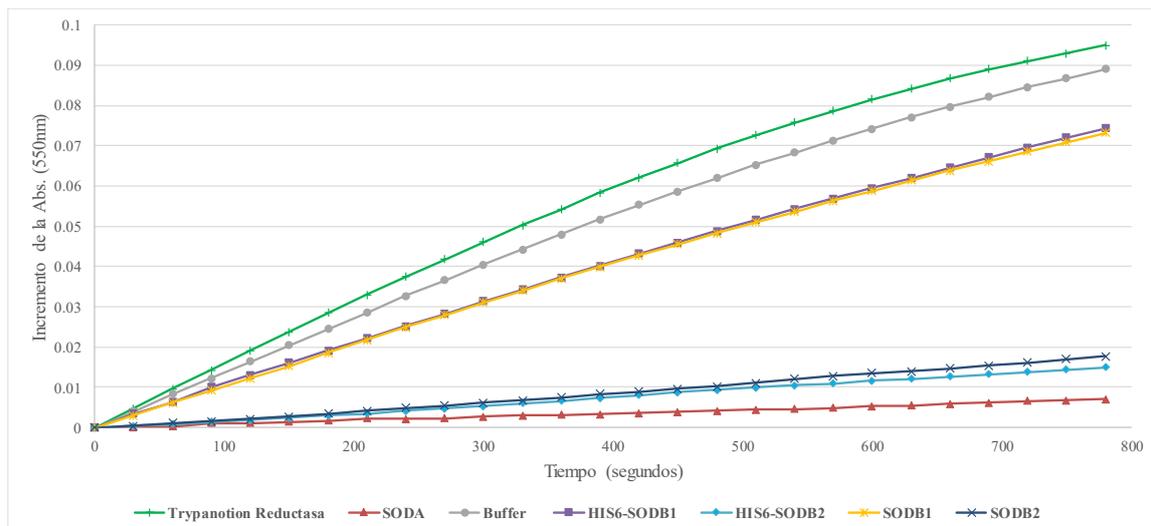


Figura 4.- Ensayo de actividad SOD. Las enzimas tripanotión reductasa, His₆-SODB1, SODB1, His₆-SODB2 y SODB2 se encuentran a 3 µM; la enzima SODA se encuentra a 212 nM.

En este ensayo de actividad, la xantina oxidasa, a partir de xantina y H₂O, genera ácido úrico y radical superóxido. Este superóxido reduce el citocromo c, provocando un aumento de absorbancia a 550 nm. En presencia de una SOD, esta va a dismutar los radicales superóxido del medio a H₂O₂, por lo que habrá menos superóxido en el ambiente que reduzca al citocromo c, y por lo tanto menor será la pendiente de la recta que representa el aumento de concentración de citocromo c reducido. Añadimos catalasa al ensayo para retirar el peróxido de hidrógeno, que también podría reducir el citocromo c, y convertirlo en H₂O y oxígeno (ver esquema 1 en Materiales y Métodos).

En el ensayo de actividad utilizamos como control negativo la tripanotión reductasa de *L. infantum*, una enzima homóloga a la glutatión reductasa humana y que no posee actividad SOD. Como control positivo empleamos la SODA mitocondrial de *L. infantum*. Como podemos apreciar en la Figura 4, las proteínas His₆-SODB2 y SODB2 tienen una mayor actividad que las enzimas His₆-SODB1 y SODB1. Además, la presencia del tag de 6 histidinas en ambas proteínas no afecta a sus actividades enzimáticas correspondientes, lo que sugiere que este tag no parece entorpecer su correcto plegamiento.

La mayor actividad de SODB2 con respecto a SODB1 podría estar relacionada con lo observado por Wilkinson y colaboradores, que demostraron que el *knock-down* de la SODB1 en *T. brucei* no afecta a su viabilidad, mientras que el de SODB2 provoca una reducción de la viabilidad de los parásitos [17].

Conclusiones

Hemos definido las condiciones óptimas de expresión de las proteínas His₆-SODB1 (1 mM de IPTG; 2 horas inducción a 16°C) y His₆-SODB2 (1 mM de IPTG; 4 horas inducción a 16°C). El empleo de estas condiciones maximiza la solubilidad de las proteínas expresadas.

La digestión de His₆-SODB1 y His₆-SODB2 con la proteasa GST-PreScisión a 4°C elimina el *tag* de 6 histidinas sin producir problemas en la solubilidad de las proteínas. Además esta digestión, seguida del posterior proceso de purificación, permite aumentar significativamente el grado de pureza.

Las proteínas His₆-SODB1, SODB1, His₆-SODB2 y SODB2 obtenidas tras el proceso de purificación presentan actividad enzimática SOD.

Las proteínas His₆-SODB1 y SODB1 muestran una actividad enzimática específica similar, lo que permite afirmar que el *tag* de 6 histidinas no interfiere en el correcto plegamiento de la proteína ni en su mecanismo enzimático. Esta misma afirmación es válida para las proteínas His₆-SODB2 y SODB2

Las proteínas His₆-SODB2 y SODB2 presentan una actividad enzimática mayor que la de las proteínas His₆-SODB1 y SODB1.

Bibliografía

1. Leishmaniasis. 2018 (19 de Junio). En CDC, Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>
2. Leishmaniasis. 2018 (19 de Junio). En OMS, Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
3. Jhingran, A., Chatterjee, M., & Madhubala, R. 2008. Leishmaniasis: Epidemiological Trends and Diagnosis. In Myler, P.J. & Fasel, N. *Leishmania after the genome*, Caister Academic Press, Norfolk. pp. 1-14.
4. Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R. and Moreno, J. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21, 334-359, table of contents.
5. Becerril Flores, M.A. 2014, *Parasitología médica*, 4ª edn, McGraw-Hill, México.
6. Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T. and Courret, N. (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*, 6, 392-401.
7. Sacks, D., Lawyer, P. & Kamhawi, S. 2008. The Biology of *Leishmania*-Sandfly Interaction. In Myler, P.J. & Fasel, N. *Leishmania after the genome*, Caister Academic Press, Norfolk. pp. 205-239.
8. Liévin-Le Moal, V. & Loiseau, P.M. 2016, "Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments", *FEBS Journal*, vol. 283, no. 4, pp. 598-607.
9. Lawyer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., Odongo, S.O., Mebrahtu, Y.B., Githure, J.I., Koech, D.K. & Roberts, C.R. 1990, "Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae)", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 43, no. 1, pp. 31-43.
10. Paniagua Gómez Álvarez, R. & e-libro, C. 2007; 2013, *Biología celular*, 3ª edn, McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, pp. 387.
11. Bedard, K. & Krause, K. 2007, "The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology", *Physiological Reviews*, vol. 87, no. 1, pp. 245-313.
12. Levick, M.P., Tetaud, E., Fairlamb, A.H. & Blackwell, J.M. 1998, "Identification and characterisation of a functional peroxidase from *Leishmania major*", *Molecular & Biochemical Parasitology*, vol. 96, no. 1, pp. 125-137.
13. Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002), "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 33, no.3, pp. 337-349.
14. Dufernez, F., Yernaux, C., Gerbod, D., Noël, C., Chauvenet, M., Wintjens, R., Edgcomb, V.P., Capron, M., Opperdoes, F.R. & Viscogliosi, E. 2006, "The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 40, no. 2, pp. 210-225.

15. Yamano, S., Sako, Y., Nomura, N. & Maruyama, T. 1999, "A cambialistic SOD in a strictly aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*", *Journal of biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 218.
16. Bodył, A. & MacKiewicz, P. 2008, "Were class C iron-containing superoxide dismutases of trypanosomatid parasites initially imported into a complex plastid? A hypothesis based on analyses of their N-terminal targeting signals", *Parasitology*, vol. 135, no. 9, pp. 1101-1110.
17. Wilkinson, S.R., Prathalingam, S.R., Taylor, M.C., Ahmed, A., Horn, D. & Kelly, J.M. 2006, "Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 40, no. 2, pp. 198-209.
18. Michels, P.A.M., Bringaud, F., Herman, M. & Hannaert, V. 2006, "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids", *BBA - Molecular Cell Research*, vol. 1763, no. 12, pp. 1463-1477.
19. Moyersoer, J., Choe, J., Fan, E., Hol, W.G.J. & Michels, P.A.M. 2004, "Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target", *FEMS microbiology reviews*, vol. 28, no. 5, pp. 603.
20. Flaspohler, J.A., Rickoll, W.L., Beverley, S.M. & Parsons, M. 1997, "Functional identification of a *Leishmania* gene related to the peroxin 2 gene reveals common ancestry of glycosomes and peroxisomes", *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17, no. 3, pp. 1093-1101.
21. Jardim, A., Liu, W., Zheleznova, E. & Ullman, B. 2000, "Peroxisomal Targeting Signal-1 Receptor Protein PEX5 from *Leishmania donovani*", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 18, pp. 13637.
22. Sandalio, L.M. & Romero-Puertas, M.C. 2015, "Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks", *Annals of botany*, vol. 116, no. 4, pp. 475-485.
23. Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C. & del Río, L.A. 2013, "Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules", *Sub-cellular biochemistry*, vol. 69, pp. 231.
24. Opperdoes, F.R. & Szikora, J. 2006, "In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes", *Molecular & Biochemical Parasitology*, vol. 147, no. 2, pp. 193-206.
25. Plewes, K.A., Barr, S.D. & Gedamu, L. 2003, "Iron Superoxide Dismutases Targeted to the Glycosomes of *Leishmania chagasi* Are Important for Survival", *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 10, pp. 5910-5920.
26. McCord, J.M. & Fridovich, I. 1968, "The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 243, no. 21, pp. 5753.
27. Genes. 2018 (17 de Junio). En NCBI, National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
28. TriTryp. 2018 (17 de Junio). <http://tritrypdb.org>
29. Bachega, J.F.R., Navarro, Marcos Vicente Albuquerque Salles, Bleicher, L., Bortoleto-Bugs, R.K., Dive, D., Hoffmann, P., Viscogliosi, E. & Garratt, R.C. 2009, "Systematic structural studies of iron superoxide dismutases from human parasites and a statistical coupling analysis of metal binding specificity", *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, vol. 77, no. 1, pp. 26-37.
30. Waugh, D.S. 2005, "Making the most of affinity tags", *Trends in Biotechnology*, vol. 23, no. 6, pp. 316-320.
31. Raran-Kurussi, S. & Waugh, D. S. "Expression and Purification of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* with a His6 or Dual His6-MBP Tag", *Methods in Molecular Biology*, MIMB, vol. 1607.