



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**Expresión del dominio catalítico de la quitinasa ambiana
en la superficie de *Escherichia coli* y evaluación
de su actividad endoquitinolítica**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. RICARDO TORRES BAÑAGA

Tijuana, Baja California.

Enero de 2017.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 196

Tijuana, B. C., a 9 de enero de 2017

C. Ricardo Torres Bañaga
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al
tema: "Expresión del dominio catalítico de la quitinasa amibiana en la superficie de
Escherichia coli y evaluación de su actividad endoquitinolítica"

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

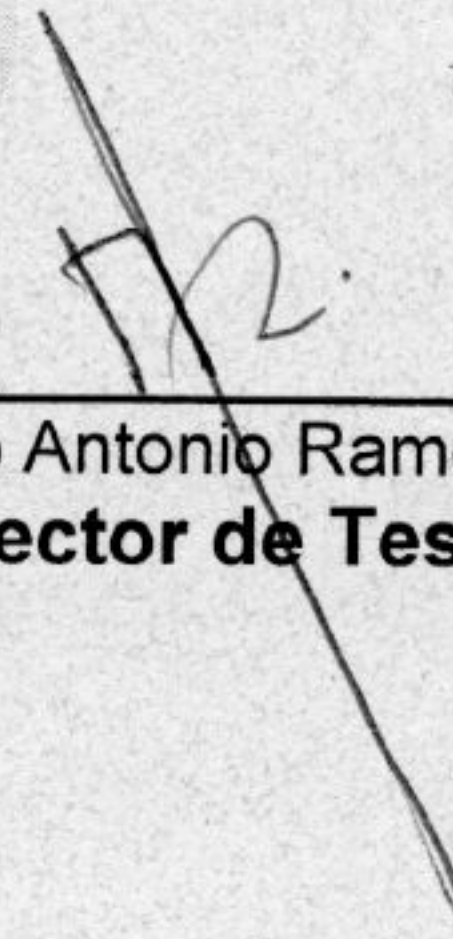
- I.- INTRODUCCION
- II.- JUSTIFICACION
- III.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS
- IV.- MATERIALES Y MÉTODOS
- V.- RESULTADOS
- VI.- DISCUSIÓN
- VII.- CONCLUSIÓN
- VIII.- BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. José Luis González Vázquez
Secretario


Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

TORRES BAÑAGA, RICARDO
**EXPRESIÓN DEL DOMINIO CATALÍTICO DE LA QUITINASA AMIBIANA EN LA SUPERFICIE DE
Escherichia coli Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ENDOQUITINOLÍTICA**
TESIS DE MAESTRÍA

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: “Torres Bañaga, Ricardo. Expresión del dominio catalítico de la quitinasa amibiana en la superficie de *Escherichia coli* y evaluación de su actividad endoquitinolítica. Tesis de Maestría. Programa Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Enero de 2017.”
- 3) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Torres Bañaga, Ricardo. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2017.

Tesis: EXPRESIÓN DEL DOMINIO CATALÍTICO DE LA QUITINASA AMIBIANA EN LA SUPERFICIE DE *Escherichia coli* Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ENDOQUITINOLÍTICA

Grado: Maestría en Ciencias, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Institución Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Ricardo Torres Bañaga

Fecha: Enero de 2017

El presente trabajo de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la dirección del profesor **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**, con financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para **Investigación en Ciencia Básica** (apoyo 155714), otorgado al Dr. Ramos.

El **Manuscrito de Tesis** correspondiente fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico** conformado por los siguientes profesores:

José Luis Mijangos Montiel, Dr. (Presidente)

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Secretario)

Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Sinodal)

Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, M.C. (Sinodal)

Marcio Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Sinodal)

Durante mis **Estudios de Posgrado** (Maestría), fui **Becario** del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, CONACyT (CVU 614910, periodo 08/2014 – 07/2016).

En el año **2016**, recibí el **Respaldo Académico y Apoyo Económico de la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC** para asistir y presentar los resultados del presente estudio en el **XXXI Congreso Nacional de Bioquímica**, evento académico realizado los días 6-11 de noviembre en la ciudad de Aguascalientes, México.

So just hold on you can make it happen for you reach for the stars and you will fly.

Hungry for heaven - DIO

Este trabajo va dedicado a mis padres Fabián Torres y Esther Bañaga, a mis hermanos Ana, Adrián y a mi abuelo, el señor Salvador Torres por siempre estar conmigo apoyándome, aconsejándome y procurándome desde el inicio y hasta el final, ya que lo que he logrado ser en la vida es gracias a ellos.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por prestarme vida y fuerza para concluir el reto más grande que he tenido hasta ahora.

A mis profesores y compañeros de laboratorio: Dr. Samuel, Dra. Rosy, Alexis, Analleli, Alvaro, Jorge, Ekaterina, Aldo, Jessica, Lilian y al resto de la familia BIOTEC por las experiencias, conocimiento compartidos y los buenos ratos dentro y fuera del laboratorio, **muchas gracias mi segunda familia.**

Y agradecer especialmente al Dr. Marco A. Ramos por todo su invaluable apoyo, consejos y sobre todo por la paciencia para guiarnos durante esta etapa.

A mis amigos Víctor, Diana, Ayla, Itzel, Vivian, a los del Nonis club y a muchos otros que de alguna manera u otra estuvieron presentes escuchándome y apoyándome durante el transcurso de esta etapa.

Gracias, ¡totales!

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
1.INTRODUCCIÓN	13
1.1.Quitina y quitinasa	13
1.1.1.Quitina como subproducto de alto valor económico	13
1.1.2.Aplicaciones de la quitina y sus derivados	13
1.1.3.Quitosán y sus aplicaciones.....	14
1.1.4.Quito-oligosacáridos y sus aplicaciones	14
1.1.5.Quitinasa	15
1.2.Entamoeba histolytica	16
1.2.1.Biología y ciclo de vida	16
1.2.2.E. histolytica como fuente proteínas de interés biomédico y biotecnológico.....	17
1.2.3.EhCHT1, la quitinasa amibiana	17
1.3.Lpp-OmpA como sistema de expresión en superficie bacteriana	18
1.3.1.Sistemas de expresión en membrana	18
1.3.2.Sistema Lpp-OmpA.....	18
1.3.3.Aplicaciones del sistema Lpp-OmpA	19
1.4.Expresión de EhCHT1c en superficie de E. coli	20
2.JUSTIFICACIÓN	22
3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1.Hipótesis	23
3.2.Objetivos	23
3.2.1.Objetivo General	23
3.2.2.Objetivos Específicos.....	23
4.MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1.Materiales: reactivos, soluciones, y estuches comerciales.....	24
4.2.Plásmidos, bacterias, y medios de cultivo	24
4.3.Oligonucleótidos sintéticos.....	25
4.4.Protocolos estándar	25
4.4.1.Preparación de un cultivo bacteriano semilla	25
4.4.2.Preparación de células bacterianas competentes.....	26
4.4.3.Transformación por choque térmico	26
4.4.4.Electroforesis de ADN en gel de agarosa	26
4.4.5.Purificación de ADN (plásmidos y productos de PCR) y secuenciación automática	27
4.4.6.Separación de proteínas mediante SDS-PAGE	27
4.4.7.Inmuno-detección tipo western blot	27
4.5.Construcción del plásmido pESE	28
4.5.1.Amplificación de Lpp-OmpA.....	28
4.5.2.Preparación de componentes para ligación: pET22b(+) y Lpp-OmpA.....	28
4.5.3.Ligación y obtención de pESE	29
4.6.Construcción del plásmido pESE-EhCHT1c.....	29
4.6.1.Amplificación de EhCHT1c.....	29
4.6.2.Preparación de componentes para ligación: pESE y EhCHT1c	30
4.6.3.Ligación y obtención de pESE-EhCHT1c.....	30
4.7.Análisis de parámetros fisiológicos.....	30
4.7.1.Curvas de crecimiento bacteriano	30
4.7.2.Análisis viabilidad bacteriana	31
4.8.Fraccionamiento subcelular	32

4.8.1.Obtención de fracciones subcelulares	32
4.8.2.Análisis de las fracciones subcelulares	33
4.9.Análisis de actividad endoquitinolítica en membrana celular	33
4.9.1.Expresión de EhCHT1c en superficie de E. coli	33
4.9.2.Ensayo típico de actividad	33
4.9.3.Análisis cinético de la actividad	34
4.10.Análisis preliminar de la actividad quitinolítica sobre sustratos complejos	34
4.10.1.Preparación de quitina coloidal	34
4.10.2.Expresión y ensayo de actividad	35
4.10.3.Determinación de azúcares reductores mediante reducción de DNSA	35
4.10.4.Determinación de azúcares reductores mediante reducción de ferricianuro	36
4.11.Tratamiento de datos y análisis estadístico	36
4.12.Bioservidores y biocomputo	36
5.RESULTADOS	38
5.1.Obtención del plásmido pESE	38
5.2.Obtención del plásmido pESE-EhCHT1c.....	38
5.3.Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-EhCHT1c se localizan en la membrana externa de E. coli.....	40
5.4.La sobre-expresión de proteínas afecta la fisiología bacteriana.....	41
5.5.EhCHT1c desplegada en superficie de E. coli exhibe actividad endoquitinolítica	43
5.6.La solubilidad del sustrato es una limitante de la actividad quitinolítica de EhCHT1c desplegada en superficie de E. coli	45
6.DISCUSIÓN	46
7.CONCLUSIÓN	49
8.BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS.....	53
Anexo 1. Representación esquemática del plásmido pQSE.....	53
Anexo 2. Representación esquemática del plásmido pET22b(+).	54
Anexo 3. Representación esquemática del plásmido pET22-EhCHIT82.	55

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Ciclo de vida de Entamoeba histolytica.	16
Fig. 2. Representación esquemática de la organización estructural de EhCHT1.	18
Fig. 3. Representación esquemática de la fusión Lpp-OmpA. (A) Organización estructural de la construcción Lpp-OmpA-β-lactamasa. (B) Modelo propuesto para el despliegue de enzimas y otras proteínas en superficie bacteriana usando a Lpp-OmpA como acarreador.	19
Fig. 4. Representación esquemática de la fusión Lpp-OmpA, de 7 pasos transmembranales (β ₁ -β ₇).	20
Fig. 5. Separación de fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio: (A) Producto de PCR Lpp-OmpA, y (B) plásmido pESE lineal (digerido con HindIII).	38
Fig. 6. Representación esquemática del plásmido pESE.	39
Fig. 7. Separación de fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio: (A) Producto de PCR EhCHT1c, y (B) plásmido pESE-EhCHT1c digerido con diferentes endonucleasas.	39
Fig. 8. Representación esquemática del plásmido pESE-EhCHT1c.	40
Fig. 9. Análisis de expresión de las fusiones proteicas Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-EhCHT1c en lisados bacterianos de E. coli BL21 (DE3) portadora de los plásmidos respectivos.	41
Fig. 10. Análisis de la localización celular de las fusiones proteicas Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-EhCHT1c en fracciones subcelulares de E. coli BL21 (DE3) portadora de los plásmidos respectivos.	41
Fig. 11. Análisis de crecimiento de cultivos de E. coli BL21 (DE3) que despliega las fusiones proteicas Lpp-OmpA o Lpp-OmpA-EhCHT1c.	42
Fig. 12. Análisis de viabilidad de E. coli BL21 (DE3) que despliega la fusión Lpp-OmpA o Lpp-OmpA-EhCHT1c.	42
Fig. 14. Análisis semi-cuantitativo de la cinética (0-4 h) de actividad endoquitinolítica de EhCHT1c desplegada en superficie de E. coli BL21 (DE3).	44
Fig. 13. Análisis cualitativo de la actividad endoquitinolítica de EhCHT1c desplegada en la superficie de E. coli BL21 (DE3).	44
Tabla 1. Cepas de Escherichia coli utilizadas en el presente estudio.	24
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.	25
Tabla 3. Resultados de análisis de curvas de crecimiento y sobrevivencia (n = 3; media ± E.E.M).	43

ABREVIATURAS

A ₄₁₅ ; A ₅₄₀	Absorbancia a 415 nm; Absorbancia a 540 nm
ANSA	Ácido 3-amino-5-nitrosalicílico
AR	Azúcares reductores
C/P	Citoplasmática/Periplasmática (fracción subcelular)
DNSA	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO ₆₅₀ ; DO ₆₀₀	Densidad óptica a 650 nm; Densidad óptica a 600 nm
DPBS	Solución amortiguadora de fosfatos-salina, formulación de Dulbecco
<i>Eh</i> CHT1	Quitinasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Eh</i> CHT1c	Dominio catalítico de <i>Eh</i> CHT1
g; µg; ng	Gramos; Microgramos; Nanogramos
h; min; s	Horas; Minutos; Segundos
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilopares de bases
KDa	Kilodalton
L; mL; µL	Litros; Mililitros; Microlitros
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LB-Amp	LB suplementado con ampicilina a 0.15 mg/mL
LBT	Lisado bacteriano total
Lpp	Lipoproteína principal de <i>Escherichia coli</i>
M; Mm; nm	Molar; Milimolar; Nanomolar
ME	Membrana externa (fracción subcelular)
MI	Membrana interna (fracción subcelular)
OmpA	Proteína de membrana externa de <i>Escherichia coli</i>
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
QC	Quitina coloidal
QOS	Quito-oligosacáridos
RBS	Sitio de unión al ribosoma
Rpm	Revoluciones por minuto
T7-ARNpol	ARN Polimerasa del bacteriófago T7
TBST	Solución amortiguadora tris-salina con Tween-20
UDO	Unidades de densidad óptica
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
V	Volts
µ	Rapidez específica de crecimiento
CBD	Dominio de unión a quitina
T _d	Tiempo de duplicación
°C	Grados Celsius (centígrados)
2X YT	Medio de cultivo con extracto de levadura y tripton (medio 2X)
4MUF	4-metilumbeliferona
4MUF-TAQT	4-metilumbeliferil-β-D-triacetilquitotriósido
6xHis	Hexámero de histidinas

RESUMEN

El despliegue en la superficie celular de bacterias ha sido considerado como una estrategia atractiva para la producción de proteínas totalmente activas ancladas a membrana celular. La fusión génica de una secuencia señal con una proteína de anclaje (p. ej., Lpp-OmpA) se ha convertido en una estrategia exitosa para dirigir proteínas a la membrana celular externa de *Escherichia coli*. La quitinasa amibiana (*Eh*CHT1) es una glicosil hidrolasa importante para el ciclo de vida del protozooario intestinal *Entamoeba histolytica*, el agente causal de la amibiasis en humanos. Interesantemente, *Eh*CHT1 posee características estructurales que la hacen deseable para propósitos biotecnológicos, estable a un amplio rango de pH y de temperatura, las cuales son deseables en proceso biotecnológicos e industriales.

En el presente trabajo, se describen los resultados obtenidos de la expresión funcional del dominio catalítico de la quitinasa amibiana (*Eh*CHT1c) en la superficie celular de la bacteria *E. coli* BL21 (DE3). La secuencia codificante para *Eh*CHT1c fue insertada en fase con la secuencia del polipéptido Lpp-OmpA, usando como vector parental al plásmido pESE (derivado de pET22b(+)), el cual porta la fusión proteica bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7). Inicialmente, la expresión y correcta localización subcelular de Lpp-OmpA-*Eh*CHT1c fue verificada mediante inmuno-detección. Sin embargo, como consecuencia fisiológica de la sobre-expresión, se observó un efecto negativo sobre la rapidez de crecimiento y viabilidad celular. No obstante, *Eh*CHT1c desplegada en la superficie bacteriana exhibe actividad catalítica, demostrando su viabilidad funcional sobre sustratos solubles de bajo peso molecular y vislumbrando su potencial como alternativa biotecnológica para la biodegradación de quitina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Quitina y quitinasa

1.1.1. Quitina como subproducto de alto valor económico

Quitina, polisacárido homo-polimérico formado por unidades de N-acetil- β -D-glucosamina unidas por enlaces β -(1,4), es el segundo compuesto biológico más abundante sobre la tierra, después de celulosa. Por sus características físicas, es componente estructural importante de diversos organismos; p. ej., exoesqueleto de insectos, cutícula de crustáceos, cascara de camarón, y pared celular de plantas y hongos [Nelson & Cox, 2008; Itoh *et al.*, 2013]. Este polisacárido se obtiene como un subproducto de diversas actividades económicas marinas; p.ej., producción de camarón y langosta, generándose más de 2.3 millones de toneladas por año en toda la biosfera acuática [Yandigeri *et al.*, 2015]. En el año 2009, la SAGARPA reportó una producción de 7,440 toneladas de quitina, como subproducto obtenido de la comercialización de 129,671 toneladas de camarón producido en granjas de los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Baja California Sur, Colima, y Baja California. Como resultado de este estudio, se planteó que la utilización de quitina a gran escala en México es muy prometedora; específicamente, en la producción de polímeros biodegradables y biomateriales de soporte [SAGARPA, 2009].

1.1.2. Aplicaciones de la quitina y sus derivados

Como polímero natural, quitina posee propiedades altamente atractivas (biocompatible, biodegradable, y no tóxico) que le aseguran aplicabilidad en biomedicina (p. ej., ingeniería de tejidos o liberación de fármacos) y en diferentes procesos industriales (p. ej., tratamiento de agua residual o preservación de alimentos) [Barikani *et al.*, 2014]. Sin embargo, además de la diversidad de procesos industriales requeridos para obtener quitina de alta pureza, la baja solubilidad es el mayor inconveniente asociado a su utilización directa, por lo que las principales aplicaciones de este producto natural proceden del uso de quitosán y otros derivados [Younes & Rinaudo, 2015]. Quitosán es un biopolímero no tóxico obtenido mediante la deacetilación de quitina. En las últimas décadas, quitosán y otros derivados (p. ej., quito-oligosacáridos) han recibido considerable atención debido a

sus propiedades y actividades biológicas con valor comercial. Los quito-oligosacáridos son productos bioactivos obtenidos mediante degradación biológica (hidrólisis enzimática) o química (hidrólisis ácida) de quitina o quitosán. Actualmente, todos los derivados de quitina han demostrado aplicabilidad en diferentes sectores; primordialmente, en el sector médico-farmacéutico [Park & Kim, 2010].

1.1.3. Quitosán y sus aplicaciones

Como polímero biodegradable y económico, el quitosán tiene numerosas aplicaciones en la industria biomédica y biofarmacéutica, primordialmente en la regeneración de tejidos, liberación de fármacos, cicatrización de heridas, y como anti-microbiano y anti-tumoral [Cheung *et al.*, 2015]. Como biomaterial de soporte en la ingeniería de tejidos, ha mostrado una velocidad de biodegradación razonable sin ocasionar alguna reacción inflamatoria o producir compuestos tóxicos cuando se regenera el tejido [Croisier & Jerome, 2013]. Por otro lado, su biocompatibilidad y naturaleza porosa le han permitido integrarse eficientemente en sistemas de liberación de fármacos. Inclusive, como acarreador de agentes anti-tumorales, se ha sugerido que fortalece la actividad terapéutica del fármaco, ya que posee la habilidad de inducir la producción de citocinas mediante el estímulo de la proliferación de linfocitos T [Cheung *et al.*, 2015; Duttagupta *et al.*, 2015].

1.1.4. Quito-oligosacáridos y sus aplicaciones

Los quito-oligosacáridos (QOS) son derivados de quitina o quitosán producidos mediante hidrólisis química (hidrólisis ácida) o bioquímica (hidrólisis enzimática con glicosil hidrolasas: quitinasas o quitosanasas) de los enlaces β -(1,4). Específicamente, los QOS han mostrado aplicabilidad en diferentes formulaciones terapéuticas; p. ej., agentes anti-bacterianos o inhibidores de quitinasa (parasitarias y fúngicas), agentes anti-tumorales y anti-metastásicos, como inmunomoduladores, y como hipoglucecientes [Aam *et al.*, 2010].

Efecto anti-microbiano y anti-fúngico. Uno de los efectos más conocidos de los QOS es su potencial anti-microbiano de amplio espectro, atribuido primordialmente a su capacidad de unión a proteínas de membranas bacterianas y al peptidoglicano, afectando la permeabilidad celular y conduciendo a la muerte [Tayel *et al.*, 2016]. Otro de los efectos potenciales que poseen los QOS es

su actividad anti-fúngica, la cual ha sido experimentalmente empleada para tratar infecciones micóticas en la piel [Mei *et al.*, 2015].

Efecto anti-tumoral y anti-metastásico: Se ha reportado que los QOS ejercen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células cancerosas, y por ende reduciendo el tamaño del tumor, mediante estimulación de la actividad cito-tóxica de los linfocitos. Además, han mostrado efecto inhibitorio sobre proteínas modificadoras de matriz extra-celular, reduciendo la capacidad metastásica del tejido tumoral [Aam *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2014]. Por otro lado, existen indicios que asocian a los QOS como inductores de apoptosis, mediante la activación de la proteína pro-apoptótica Bax e inhibición de angiogénesis [Mourya *et al.*, 2011].

Glucosamina. El QOS más sencillo es la glucosamina, el cual en combinación con condroitina, es empleado en el tratamiento de osteoartritis de rodilla y cadera, para regenerar el cartílago y retrasar la degeneración ósea, ayudando a reducir la posibilidad de intervención quirúrgica [Henrotin *et al.*, 2012; Fransen, *et al.* 2014].

1.1.5. Quitinasa

Las quitinasas son glicosil hidrolasas capaces de romper el enlace β -(1,4) de quitina. En la naturaleza, estas enzimas se encuentran en un amplio rango de organismos, tales como bacterias, hongos, levaduras, actinomicetos, artrópodos, plantas, y mamíferos. De acuerdo al sitio de ruptura en el polímero, se clasifican en endoquitinasas y exoquitinasas. Las endoquitinasas hidrolizan aleatoriamente en sitios internos, liberando dímeros (quitobiosa) y oligómeros de bajo peso molecular (quitotriosa, quitotetrosa). Las exoquitinasas han sido subdivididas en 2 categorías: quitobiosidasas, las cuales catalizan la liberación progresiva de quitobiosa a partir del extremo no reductor, y β -N-acetilglucosaminidasas, las cuales hidrolizan los productos oligoméricos de las endoquitinasas y quitobiosidasas, liberando unidades de β -N-acetilglucosamina [Hamid *et al.*, 2013].

Por otro lado, cuando se clasifican de acuerdo a su similitud de secuencias polipeptídicas, se subdividen en tres familias: 18, 19, y 20. La familia 18 incluye las quitinasas derivadas principalmente de hongos, pero incluye algunas de virus, bacterias, insectos, plantas, y mamíferos. La familia 19 comprende las quitinasas derivadas primordialmente de plantas y de varias bacterias. La familia 20 contiene la N-acetilglucosaminidasa de *Vibrio harveyi* y las N-acetilhexosaminidasas de *Dictyostelium discoideum* y de humano. Muchas bacterias, como *Serratia marcescens*, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Streptomyces griseus*, producen varias quitinasas. Incluso, el hongo

Trichoderma harzianum produce dos N-acetilglucosaminidasas, cuatro endoquitinasas, y una quitobiosidasa [Swiontek Brzezinska *et al.*, 2014].

1.2. *Entamoeba histolytica*

1.2.1. Biología y ciclo de vida

Entamoeba histolytica, comúnmente llamada amiba, es un parásito protozooario unicelular residente del tracto gastrointestinal que mundialmente afecta a 50 millones de personas y causa de 40 a 100 mil muertes por año [Jeelani & Nozaki, 2014]. Además, posee la capacidad de migrar a otros órganos como hígado, cerebro, pulmón una vez que ha perforado la pared intestinal [Zakaria *et al.*, 2016]. El ciclo de vida del parásito (ver Fig. 1) inicia con la ingesta de alimentos contaminados con quistes (forma infectiva), los cuales poseen una pared compuesta principalmente de quitina [Das *et al.*, 2006]. Una vez que el quiste ha entrado al cuerpo, éste migra a través del intestino delgado hasta

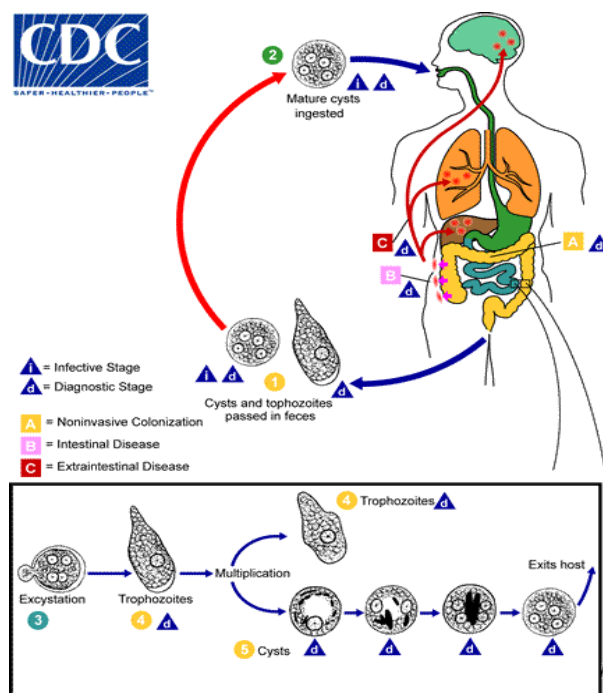


Fig. 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

Imagen tomada del portal del Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de Norteamérica. (<http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.html>), la cual permanece en su formato original.

alcanzar el colon, donde inicia el proceso de desenquistamiento, el cual consiste en el reblandecimiento de la pared quitinosa mediada por el medioambiente y la acción de una quitinasa, dando lugar a la liberación de 4 trofozoitos (forma invasiva). Cuando las condiciones para la sobrevivencia no son óptimas, inicia el proceso de enquistamiento; es decir, la síntesis de la pared quitinosa mediada por las enzimas quitina sintasa, quitina deacetilasa, y quitinasa [Saha *et al.*, 2015].

1.2.2.E. *histolytica* como fuente proteínas de interés biomédico y biotecnológico

La amiba es un organismo altamente secretor con un gran repertorio de enzimas que forman parte de sus factores de virulencia; p. ej., proteasas, que juegan un papel importante en los mecanismos de invasión tisular y evasión del sistema inmune [Ralston & Petri, 2011; Begum *et al.*, 2015]. Además, como respuesta al ataque por células del sistema inmune, el parásito exporta hacia la superficie celular una peroxiredoxina que le permite resistir el ataque oxidativo [Choi *et al.*, 2005]. Por otro lado, durante los procesos de enquistamiento y desenquistamiento, las enzimas de la ruta biosintética de quitina aumentan considerablemente, representando excelentes dianas terapéuticas [Jeelani *et al.*, 2012]. Por lo anterior, y considerando que *E. histolytica* tolera diferentes condiciones medioambientales severas (*e.g.*, pH y temperatura, entre otras) durante su ciclo biológico, es factible suponer que sus proteínas son el producto de un proceso evolutivo altamente selectivo, el cual les ha proporcionado propiedades biofísicas y bioquímicas de gran interés biomédico y biotecnológico [Faust & Guillen, 2012; Muñoz *et al.*, 2016]

1.2.3. *Eh*CHT1, la quitinasa amibiana

La quitinasa de *E. histolytica* (*Eh*CHT1, UniProt P90546), perteneciente a la familia 18, posee un dominio único de unión a quitina (CBD) en el extremo N-terminal, que contiene 8 residuos de cisteína, altamente conservados y conformando 4 enlaces disulfuro, y varios aminoácidos aromáticos conservados que presumiblemente se unen al anillo de los azúcares de quitina. Interesantemente, *Eh*CHT1 tiene un espaciador de baja complejidad entre el dominio CBD y el dominio catalítico (ver Fig.2), el cual se caracteriza por presentar un número variable de heptapéptidos repetidos que han sido aplicados para distinguir aislados clínicos [Samuelson & Robbins, 2011]. El dominio catalítico, ubicado en el extremo C-terminal, exhibe el patrón típico adoptado por dominios ortólogos activos,

un barril de ocho cadenas α/β [Muñoz *et al.*, 2016]; además, su sitio activo contiene el motivo DxxDxDxE (²⁶⁷DGIDIDWE²⁷⁴), característico de quitinasas de la familia 18 [Bonfim *et al.*, 2006]. En un estudio reciente, se reportó que *Eh*CHT1 exhibe propiedades de interés industrial, como estabilidad a un amplio rango de pH (>90% de actividad a pH = 5.0-8.5) y alta estabilidad térmica a valores menores a 45 °C ($t_{1/2}$ = 103.6 min a 44.8 °C) [Muñoz *et al.*, 2016].

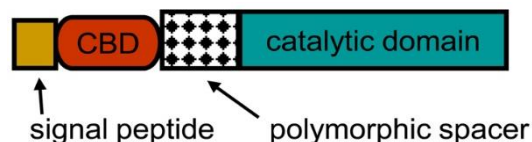


Fig. 2. Representación esquemática de la organización estructural de *Eh*CHT1.

Imagen tomada de Samuelson & Robbins (2011), la cual permanece en su formato original.

1.3. Lpp-OmpA como sistema de expresión en superficie bacteriana

1.3.1. Sistemas de expresión en membrana

Actualmente, existen diversos sistemas de expresión en superficie bacteriana, los cuales se basan primordialmente en el uso de proteínas residentes de membrana citoplasmática (p. ej., lipoproteínas o proteínas de membrana externa) como sistema de acarreo, anclaje, y exposición extracelular de péptidos o proteínas. Para lograr el despliegue en superficie, es necesario realizar la fusión génica de la molécula de interés con la proteína acarreadora; por lo tanto, es deseable que esta última sea un polipéptido robusto que permita un apropiado anclaje y exposición extracelular [van Bloois *et al.*, 2011]. El despliegue en superficie bacteriana ha mostrado un amplio rango de aplicaciones, desde exposición de proteínas con propiedades catalíticas (enzimas), inmunológicas (anticuerpos) o inmunogénicas (vacunas), hasta librerías de péptidos para escrutinio molecular [Georgiou *et al.*, 1993; Benhar, 2001].

1.3.2. Sistema Lpp-OmpA

Uno de los sistemas de expresión en superficie de *E. coli* más conocido y ampliamente utilizado es la fusión Lpp-OmpA, inicialmente utilizada para desplegar la enzima β -lactamasa (Fig. 3A) [Francisco *et al.*, 1992]. La fusión Lpp-OmpA consta de: (i) la secuencia señal (20 residuos) y los primeros 9 residuos del péptido maduro de la lipoproteína principal Lpp, y (ii) un segmento de 114

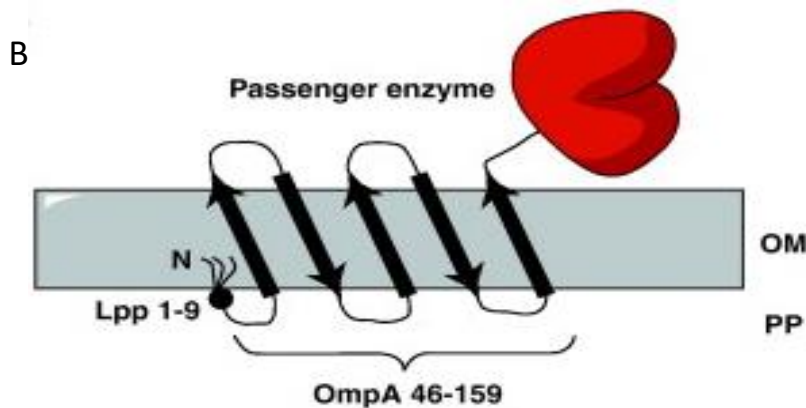
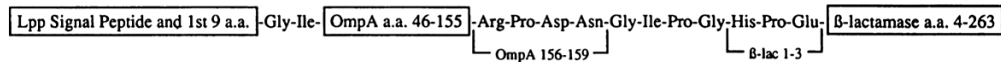


Fig. 3. Representación esquemática de la fusión Lpp-OmpA. (A) Organización estructural de la construcción Lpp-OmpA-β-lactamasa. (B) Modelo propuesto para el despliegue de enzimas y otras proteínas en superficie bacteriana usando a Lpp-OmpA como acarreador.

(A) Imagen tomada de Francisco *et al.* (1992). (B) Imagen tomada de van Bloois *et al.* (2011). Ambas permanecen en su formato original.

residuos (⁴⁶Asn-Asn¹⁵⁹) del péptido maduro de la proteína de membrana externa OmpA, que comprende 5 pasos transmembranales. Con esta fusión, se ha propuesto un modelo de alta eficiencia para el despliegue de enzimas y otras proteínas (Fig. 3B), donde el residuo N-terminal (Cys, correspondiente al residuo 1 del péptido maduro de Lpp) se encuentra anclado a la membrana externa mediante unión covalente con lípidos [Hantke & Braun, 1973], mientras que el residuo C-terminal (Asn, correspondiente al residuo 159 del péptido maduro de OmpA) se encuentra expuesto al espacio extracelular [Francisco *et al.*, 1992; Georgiou *et al.*, 1996; van Bloois *et al.*, 2011]. Sin embargo, se ha reportado que la sobre-expresión de proteínas desplegadas usando este sistema conduce a una severa inhibición del crecimiento bacteriano y una reducción de la viabilidad celular, por lo que se ha recomendado utilizar alternativas de expresión que permitan una regulación génica más estrecha [Francisco *et al.*, 1992; Daugherty *et al.* 1999].

1.3.3. Aplicaciones del sistema Lpp-OmpA

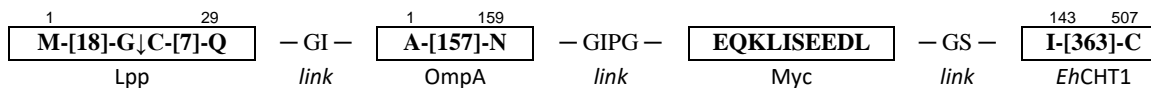
Como primer candidato, la enzima β-lactamasa fue expresada exitosamente en la superficie de *E. coli* usando el sistema acarreador Lpp-OmpA [Francisco *et al.*, 1992]. Con este hecho, se

vislumbró una nueva vertiente en la catálisis enzimática: uso de la superficie celular como sistema de presentación de enzimas y aplicación de células vivas como biocatalizadores. Gracias a esto, a la fecha, se ha expresado activamente varias enzimas con potencial biotecnológico: fosfatasa alcalina [Stathopoulos *et al.*, 1996], organofosforo hidrolasa [Richins *et al.*, 1997; Karami *et al.*, 2014], metalotioneína [Valls *et al.*, 1998], lipasa [Jo *et al.*, 2014], y xilanasa [Qu *et al.*, 2015], entre otras.

Por otro lado, con el sistema Lpp-OmpA, también se ha logrado desplegar dominios de proteínas; específicamente, el dominio de unión de quitina (CBD) de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans*, el cual fue eficientemente expresado y, además, mostró una alta especificidad a sustrato y estabilidad a un amplio rango de pH y temperatura [Wang & Chao, 2006].

1.4. Expresión de *Eh*CHT1c en superficie de *E. coli*

Con el fin de expresar el dominio catalítico de la quitinasa amibiana (*Eh*CHT1c) en la superficie de *E. coli*, se propuso la siguiente fusión Lpp-OmpA-*Eh*CHT1c:



donde el extremo N-terminal contiene la secuencia señal (20 residuos) y los primeros 9 residuos del péptido maduro de Lpp, seguido de un segmento de 159 residuos del péptido maduro de OmpA (que comprende 7 pasos transmembranales) y la secuencia del epítipo Myc (como etiqueta molecular para inmuno-reconocimiento), y en el extremo C-terminal un fragmento de 365 residuos del péptido maduro de *Eh*CHT1 (que incluye el dominio catalítico).

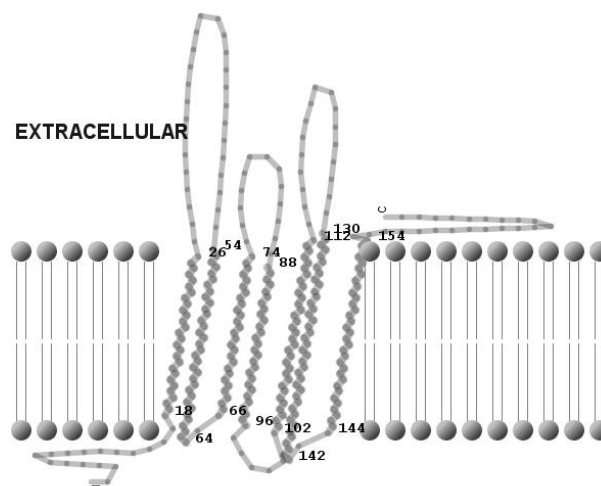


Fig. 4. Representación esquemática de la fusión Lpp-OmpA, de 7 pasos transmembranales (β_1 - β_7).

Modelo propuesto para la fusión Lpp-OmpA(β_1 - β_7) anclada en la membrana externa de *E. coli*. Obtenido usando el algoritmo del servidor PRED-TMBB (<http://biophysics.biol.uoa.gr//PRED-TMBB>) y representado con el programa TMRPres2D (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D>).

Cabe destacar que la fusión Lpp-OmpA propuesta para desplegar *Eh*CHT1c es ligeramente más extensa (Fig. 4), comparado con la desarrollada por Francisco *et al.* (1992), ya que el péptido de anclaje consta de 7 pasos transmembranales (β_1 - β_7), dos más que el polipéptido típicamente usado (β_3 - β_7). En consideración a que la estructura de OmpA es barril β (conformado por 8 pasos transmembranales) que brinda estabilidad a la membrana bacteriana [Pautsch & Schulz, 1998; Arora *et al.*, 2001], es razonable suponer que la similitud estructural favorecerá un plegamiento semejante a la conformación nativa y que, por ende, se espera que muestre una reducida perturbación al entorno celular. Además, siendo una proteína con alta representatividad en la membrana celular (aprox. 10^5 copias por célula), ofrece la posibilidad de tener numerosos sitios de anclaje y despliegue de *Eh*CHT1c en la superficie de *E. coli*.

2. JUSTIFICACIÓN

Quitina es generada en grandes cantidades como un subproducto de algunas actividades económicas importantes en nuestro país; p. ej. cultivo y comercialización de camarón. Actualmente, este polímero natural y sus derivados (quitosán y quito-oligosacáridos) han tomado relevancia económica *per se*, debido al impacto de sus aplicaciones en diferentes sectores industriales; p. ej. farmacéutico, biomédico, alimentario, y medioambiental. Tradicionalmente, los procesos de extracción de quitina y obtención de sus derivados involucran condiciones fisicoquímicas extremas (pH y temperatura). Además, se han reportado bajos rendimientos en los procesos de obtención de quito-oligosacáridos. Por tal motivo, se ha sugerido la utilización de enzimas (p. ej., quitinasas) de diversos microorganismos como sistemas de producción de quito-oligosacáridos de interés biomédico y farmacéutico. En el presente trabajo, se propone la utilización del dominio catalítico de la quitinasa amibiana (*Eh*CHT1), desplegada en la superficie de una bacteria, ya que exhibe alta termoestabilidad y tolerancia a cambios de pH, características que la hacen atractiva para su aplicación como una alternativa en la biodegradación de quitina.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El dominio catalítico de la quitinasa amibiana *Eh*CHT1 exhibe actividad endoquitinolítica cuando se expresa en la superficie de *Escherichia coli*.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

Utilizar la superficie celular de la bacteria *Escherichia coli* como sistema de despliegue del dominio catalítico de la quitinasa amibiana (*Eh*CHT1c), mediante una estrategia de clonación y expresión funcional *in vivo* (en membrana externa), para determinar su potencial como alternativa para la biodegradación de quitina.

3.2.2. Objetivos Específicos

1. Obtener una cepa bacteriana que exprese *Eh*CHT1c en su superficie, mediante protocolos estándar de clonación molecular y expresión heteróloga.
2. Evaluar el efecto de la expresión de *Eh*CHT1c en la superficie bacteriana sobre la fisiología celular, mediante el análisis de crecimiento y viabilidad celular.
3. Evaluar la actividad endoquitinolítica de *Eh*CHT1c desplegada en superficie bacteriana, mediante un ensayo de biodegradación de un sustrato fluorogénico estándar.
4. Examinar el potencial quitinolítico del sistema bacteriano que despliega *Eh*CHT1c, mediante ensayos preliminares de biodegradación de sustratos complejos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales: reactivos, soluciones, y estuches comerciales

Todos los materiales empleados fueron obtenidos de diferentes proveedores y distintas casas comerciales. Los reactivos y soluciones fueron de grado reactivo o grado biología molecular, y se utilizaron tal como el proveedor los entregó. La procedencia de cada reactivo será indicada en el protocolo correspondiente. La purificación de productos de PCR fue realizada utilizando el estuche *QIAprep™ PCR Purification Kit* y la purificación de ADN plasmídico fue realizada usando el estuche *QIAprep™ Spin Miniprep Kit*, ambos de Qiagen. El revelado de la inmuno-detección tipo *western blot* fue realizado utilizando el estuche *AP Conjugate Substrate Kit* (Biorad).

4.2. Plásmidos, bacterias, y medios de cultivo

El plásmido recombinante pQSE (Anexo 1) fue utilizado como molde para la amplificación de la fusión Lpp-OmpA. El plásmido comercial pET22b(+) (*Novagen*) (Anexo2) fue utilizado para la construcción del vector de expresión de la fusión Lpp-OmpA. El plásmido recombinante pET22-*EhCHIT82* (Anexo 3) fue utilizado como molde para la amplificación del dominio catalítico de *EhCHT1*. Las características moleculares de cada plásmido se describen como nota al pie en los respectivos anexos. Los plásmidos fueron obtenidos de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la FCQI- UABC.

Las cepas bacterianas ER2738 y BL21 (DE3) de *Escherichia coli* fueron utilizadas durante el presente trabajo. El genotipo y el proveedor de cada cepa se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el presente estudio.

Cepa	Genotipo	Proveedor	Aplicación
ER2738	<i>fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5 /F'[proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzz::Tn10(Tet^R)]</i>	New England Biolabs	Clonación molecular
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS; where λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	Novagen	Expresión proteica

Todas las cepas fueron obtenidas de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la FCQI-UABC.

Los medios de cultivo LB y 2X YT fueron preparados siguiendo las formulaciones y procedimientos estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989]. A menos que se indique diferente, todos los componentes fueron de la marca *BD Bacto™*. Medio LB (Luria Berthani): 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, y 10 g/L de NaCl (*Amresco*). Medio 2X YT: 10 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl. Los medios sólidos fueron suplementados con 17 g/L de agar bacteriológico. Cuando fue requerido, LB fue suplementado con ampicilina [0.15 mg/mL] (LB-Amp).

4.3. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados como iniciadores en las reacciones de amplificación fueron obtenidos de la casa comercial *Eurofins MWG Operon LLG*. La secuencia nucleotídica correspondiente y algunas de sus características específicas se muestran en la Tabla 2.

4.4. Protocolos estándar

4.4.1. Preparación de un cultivo bacteriano semilla

Un cultivo semilla fue preparado mediante inoculación de 0.02 mL de una suspensión celular de bacterias (*E. coli* ER2738 o BL21 (DE3); silvestres o portadoras del plásmido de interés) en 2 mL de medio LB (sin o con antibiótico). La proliferación celular fue permitida mediante incubación a 37 °C durante una noche, con agitación constante (300 rpm).

En condiciones de almacenamiento adecuadas, este cultivo fue considerado viable por un periodo no mayor a 2 semanas.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

Nombre	Secuencia (5'→3')*	Tm (°C)	Endonucleasa
LPPF2	CATCAT <u>TCTAGAA</u> TAAAGAGGAGAAATTA <u>ACTATGAAAGCTACT</u>	65.5	XbaI
OMPAR2	CATCATAAGCTTGAATTCGGATCC <u>CAGATCCTCTTCAGA</u>	70.0	HindIII, EcoRI, BamHI
EhCHT1CF	CATCATGGATCCATCCCAAAGAAAACAGTTGCTTATTATAC	67.7	BamHI
T7_RV	CCCCTCAAGACCCGTTTAGAG	64.5	No Existe

*Las secuencias de reconocimiento por la endonucleasas se muestran subrayadas.

4.4.2.Preparación de células bacterianas competentes

Un cultivo fresco de la cepa de *E. coli* requerida para la transformación fue preparado diluyendo 0.02 mL de un cultivo semilla en 2 mL de medio LB. Después de 2-3 h de incubación (37 °C, 300 rpm), alícuotas de 1 mL fueron transferidas a microtubos y la pastilla celular fue separada mediante centrifugación (2 min a 13,000 rpm, 4 °C). Posteriormente, la pastilla fue resuspendida en 0.5 mL de agua fría (estéril), mantenida durante 5 min en hielo y separada mediante centrifugación. Enseguida, la pastilla fue resuspendida en 0.5 mL de una solución 100 mM de CaCl₂ (fría, estéril), mantenida durante 5 min en hielo y separada mediante centrifugación. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 0.05 mL de una solución 50 mM de CaCl₂ 50 mM (fría, estéril) y mantenida durante 5 min en hielo.

4.4.3.Transformación por choque térmico

Una muestra de ADN (2 µL; plásmido o ligación) fue añadida a un microtubo conteniendo una suspensión de células competentes. Después de 30 min de incubación en hielo, se realizó un choque térmico como sigue: 42 °C durante 1.5 min, inmediatamente seguidos de 5 min en hielo. La recuperación bacteriana fue favorecida mediante la adición de 1 mL de medio 2X YT e incubación a 37 °C durante 1 h. La selección de transformantes fue realizada inoculando 1/10 y 9/10 del volumen de transformación (ya recuperado) sobre la superficie de medio LB-Amp sólido. Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C. Las unidades formadoras de colonias (ufc) resistentes a ampicilina fueron consideradas como transformantes estables.

4.4.4.Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las muestras acuosas conteniendo ADN fueron diluidas con agua destilada estéril a un volumen final de 10 µL y mezcladas con 1 µL de amortiguador de carga 10X [0.25% de azul de bromofenol; 0.25% de xilencianol; 30% de glicerol]. Las mezclas fueron cargadas en gel de agarosa al 1%, preparado en solución amortiguadora TAE 1X [40 mM de Tris; 20 mM de ácido acético; 1 mM de EDTA] suplementada con bromuro de etidio [0.5 µg/mL]. Como marcadores de peso molecular se utilizaron: (i) ADN del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa HindIII, o (ii) 100 bp-Ladder (*New*

England Biolabs). La electroforesis fue corrida durante 30-60 min a 100 V y visualizada utilizando el equipo fotodocumentador *Gel Doc™ EZ (Biorad)*.

4.4.5. Purificación de ADN (plásmidos y productos de PCR) y secuenciación automática

El ADN plasmídico y los productos de PCR fueron purificados siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. La secuencia nucleotídica de los plásmidos recombinantes fue obtenida mediante el servicio de secuenciación automática de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

4.4.6. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

Las muestras (pastillas celulares) fueron resuspendidas (con apoyo de un disruptor celular) en 0.2 mL de solución amortiguadora 1X para carga de proteínas [5% de glicerol; 1.25% de SDS; 2.5% de β -mercaptoetanol; 0.001% de azul de bromofenol; 25 mM de Tris-HCl, pH 6.8] y desnaturalizadas durante 10 min a una temperatura de 95-100 °C. Las proteínas contenidas en 0.01 mL de muestra fueron separadas mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 12%. El gel fue preparado siguiendo el protocolo estándar de laboratorio [Laemmli, 1970]. La separación fue realizada a 80 V durante 15-20 min y, posteriormente, a 120 V durante 60-90 min. Al final de la corrida, el gel fue separado y las proteínas fueron: (i) teñidas con azul de *Coomassie*, siguiendo el procedimiento típico de laboratorio, o (ii) transferidas a nitrocelulosa para inmuno-detección.

4.4.7. Inmuno-detección tipo *western blot*

Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema *Criterion™ Blotter* (Biorad), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La membrana fue tratada durante la noche con solución de bloqueo [5% de leche *Svelty™ (Nestle®)*; 50 mM de NaCl; 0.05% de *Tween® 20*; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0]. Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces (10 min cada lavado) con solución TBST [150 mM de NaCl; 0.05% de *Tween® 20*; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0]. El reconocimiento primario fue realizado mediante tratamiento, durante 1h, con una solución 1:5,000 del anticuerpo policlonal anti-Myc (*Sigma*) (diluido en TBST). Después de 3 lavados, el reconocimiento secundario fue permitido mediante tratamiento, durante 1 h, con una

solución 1:5,000 del anticuerpo policlonal anti-Fc de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (*Rockland*) (diluido en TBST). Enseguida, la membrana fue lavada 3 veces. La inmuno-detección fue revelada utilizando una solución comercial de sustrato para fosfatasa alcalina (BIORAD).

4.5. Construcción del plásmido pESE

4.5.1. Amplificación de Lpp-OmpA

La secuencia codificante para la fusión Lpp-OmpA fue amplificada mediante PCR utilizando a los oligonucleótidos LPPF2 y OMPAR2 como iniciadores y al plásmido pQSE como molde. Además de incorporar los respectivos sitios de reconocimiento para endonucleasas (requeridos para la ligación molecular), los oligonucleótidos contienen secuencias que hibridan específicamente con las regiones flanqueantes a Lpp-OmpA. Es importante mencionar que el producto de PCR esperado (699 pb) incluyó la secuencia *RBS* y los codones de la etiqueta molecular *Myc* en los extremos 5' y 3', respectivamente. La mezcla de reacción fue preparada en un volumen final de 50 µL de solución amortiguadora 1X para la enzima *Pfu* ADN polimerasa (*Agilent*) conteniendo 0.2 mM de deoxirribonucleótidos trifosfatados (*New England Biolabs*), 20 picomoles de cada oligonucleótido (LPPF2 y OMPAR2), 1-2 ng de pQSE, y 1.25 U de *Pfu* ADN polimerasa. La amplificación se realizó en un equipo termociclador *MultiGene™* (*Labnet International, Inc.*) utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2 min a 94 °C), 35 ciclos de amplificación exponencial (20 s a 94 °C; 20 s a 55 °C; 60 s 72 °C), 1 ciclo de extensión final (7 min a 72 °C). Una vez concluido, el producto de PCR fue mantenido a 12 °C hasta retirarlo del equipo.

4.5.2. Preparación de componentes para ligación: pET22b(+) y Lpp-OmpA

Inicialmente, el plásmido y el inserto fueron purificados usando estuches comerciales. Posteriormente, ambos fueron digeridos con las endonucleasas *XbaI* y *HindIII* (*New England Biolabs*) durante 2 h utilizando el procedimiento recomendado por el proveedor (solución amortiguadora NEB2/BSA 1X, 37 °C). 30 min antes de cumplir el tiempo de digestión, el plásmido fue defosforilado, suplementando 1 µL fosfatasa alcalina (bCIP, *Roche*). Enseguida, ambos productos de digestión fueron purificados y analizados (para verificar la integridad de los fragmentos obtenidos).

4.5.3. Ligación y obtención de pESE

La ligación de los productos de digestión, vector [pET22b(+)/XbaI-HindIII defosforilado] e inserto [producto de PCR Lpp-OmpA/XbaI-HindIII], fue realizada utilizando 400 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (*New England Biolabs*) y siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor. La reacción fue permitida mediante incubación en refrigeración durante una noche. El producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y varias transformantes estables fueron seleccionadas para análisis de plásmidos (mediante liberación de inserto). Aquellas transformantes que portan el inserto, fueron utilizadas para caracterización molecular y extracción de ADN plasmídico de alta pureza. Una transformante con el patrón de restricción esperado fue seleccionada para secuenciación de ADN. Una vez verificada la integridad de la secuencia nucleotídica, el plásmido fue denominado pESE (5,991 pb).

4.6. Construcción del plásmido pESE-*Eh*CHT1c

4.6.1. Amplificación de *Eh*CHT1c

La secuencia codificante para *Eh*CHT1c (Ile¹⁴³ a Cys⁵⁰⁷) fue amplificada mediante PCR utilizando a los oligonucleótidos EhCHT1CF y T7_RV como iniciadores, y al plásmido pET22-*Eh*CHIT82 como molde. Además de incorporar los respectivos sitios de reconocimiento para endonucleasas (requeridos para la ligación molecular), los oligonucleótidos contienen secuencias que hibridan específicamente con las regiones flanqueantes a *Eh*CHT1c. Es importante destacar que el producto de PCR esperado (1,256 pb) incluyó un pequeño segmento del extremo 3', que contiene los codones del hexámero de histidinas y una porción del terminador T7, que no interfieren en la estrategia de clonación. La mezcla de reacción fue preparada en un volumen final de 50 µL de solución amortiguadora 1X para la enzima *Pfu* ADN polimerasa (*Agilent*) conteniendo 0.2 mM de deoxirribonucleótidos trifosfatados (*New England Biolabs*), 20 picomoles de cada oligonucleótido (EhCHT1CF y T7_RV), 1-2 ng de pET22-*Eh*CHIT82, y 1.25 U de *Pfu* ADN polimerasa. La amplificación se realizó en un equipo termociclador *MultiGene*[™] (*Labnet International, Inc.*) utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2 min a 94 °C), 35 ciclos de amplificación exponencial (20 s a 94 °C; 20 s a 55 °C; 60 s a 72 °C), 1 ciclo de extensión final (7 min a 72 °C). Una vez concluido, el producto de PCR fue mantenido a 12 °C hasta retirarlo del equipo.

4.6.2. Preparación de componentes para ligación: pESE y *Eh*CHT1c

Inicialmente, el plásmido y el inserto fueron purificados usando estuches comerciales. Posteriormente, ambos fueron digeridos con las endonucleasas BamHI y HindIII (*New England Biolabs*) durante 2 h utilizando el procedimiento recomendado por el proveedor (solución amortiguadora NEB2/BSA 1X, 37 °C). 30 min antes de cumplir el tiempo de digestión, el plásmido fue defosforilado, suplementando 1 μ L fosfatasa alcalina de becerro recombinante (bCIP, *Roche*). Enseguida, ambos productos de digestión fueron purificados y analizados (para verificar la integridad de los fragmentos obtenidos).

4.6.3. Ligación y obtención de pESE-*Eh*CHT1c

La ligación de los productos de digestión, vector [pESE/BamHI-HindIII defosforilado] e inserto [producto de PCR *Eh*CHT1c/BamHI-HindIII], fue realizada utilizando 400 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (*New England Biolabs*) y siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor. La reacción fue permitida mediante incubación en refrigeración durante una noche. El producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y varias transformantes estables fueron seleccionadas para análisis de plásmidos (mediante liberación de inserto). Las transformantes que portan el inserto, fueron utilizadas para caracterización molecular y extracción de ADN plasmídico de alta pureza. Una transformante con el patrón de restricción esperado fue seleccionada para secuenciación de ADN. Una vez verificada la integridad de la secuencia nucleotídica, el plásmido fue denominado pESE-*Eh*CHT1c (7,083 pb).

4.7. Análisis de parámetros fisiológicos

4.7.1. Curvas de crecimiento bacteriano

Los cultivos independientes de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos pET22b(+), pESE, o pESE-*Eh*CHT1c fueron preparados y tratados en dos condiciones, sin y con 1 mM de IPTG (inductor). Las cinéticas del crecimiento fueron obtenidas registrando la densidad óptica a 600 nanómetros (DO₆₀₀) con respecto al tiempo de cultivo. Brevemente, 3 mL de medio LB-Amp fueron inoculados con el volumen necesario de un cultivo semilla para obtener 0.05-0.10 UDO. Después de 5 min de

incubación (37 °C, 300 rpm), se realizó el primer registro (t = 0). Los cultivos fueron posteriormente incubados durante 6 h, realizando registros cada 30 min. Cabe destacar que los cultivos inducidos fueron suplementados con IPTG a las 2 h de incubación. A partir de las curvas de crecimiento bacteriano, se determinó la rapidez específica (μ) y el tiempo de duplicación (t_d). Para esto, se graficó el logaritmo natural de la DO_{600} contra el tiempo (min) y se ajustaron los datos a una regresión lineal, aplicando la siguiente ecuación:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

donde μ corresponde a la pendiente de la fase exponencial de crecimiento. Por otro lado, t_d fue calculada considerando la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\ln[2]}{\mu}$$

4.7.2. Análisis viabilidad bacteriana

Los cultivos independientes de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos pET22b(+), pESE, o pESE-EhCHT1c fueron preparados y tratados en dos condiciones, sin y con 1 mM de IPTG (inductor). Brevemente, 1 mL de medio LB-Amp fue inoculado con 0.02 mL de un cultivo semilla. Después de 2 h de incubación (37 °C, 300 rpm), los cultivos inducidos fueron suplementados con IPTG. La sobre-expresión fue permitida durante 2 h adicionales de incubación. Inmediatamente después, los cultivos fueron colocados en hielo, para arrestar crecimiento bacteriano y disminuir la expresión de proteínas, y la DO_{650} fue determinada. Conociendo esta, 1 mL de una suspensión celular fue preparado conteniendo 0.1 UDO (dilución 10^{-1}) en medio LB. Después, se prepararon 5 diluciones decimales seriadas (10^{-2} - 10^{-6}) a partir de la dilución 10^{-1} . Enseguida, 0.01 mL de cada dilución fueron inoculados en la superficie de medio LB-Amp y, posteriormente, incubados durante la noche a 37 °C. Las colonias desarrolladas fueron contadas y la dilución con registro de 10 a 100 ufc fue utilizada para calcular la densidad celular, utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{ufc/mL}] = \frac{(\text{ufc} \cdot \text{FD})}{0.01 \text{ mL}}$$

donde ufc corresponde al número de colonias contadas y FD el factor de dilución. Además, el porcentaje de sobrevivencia (viabilidad) fue determinado considerando la siguiente ecuación:

$$\text{viabilidad (\%)} = \frac{\text{Log}[\text{ufc/mL}]_1}{\text{Log}[\text{ufc/mL}]_0} \cdot 100$$

donde los subíndices 0 y 1 representan las condiciones sin y con inductor, respectivamente.

4.8. Fraccionamiento subcelular

La localización subcelular de las proteínas de fusión Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-EhCHT1c fue determinada siguiendo un protocolo reportado [Yang *et al.*, 2008], con pequeñas modificaciones. Este procedimiento, utilizado para identificar proteínas de membrana en *E. coli*, se basa en la utilización de N-lauroilsarcosina para solubilizar y separar la membrana interna, dejando intacta a la membrana externa [Filip *et al.*, 1973].

4.8.1. Obtención de fracciones subcelulares

Los cultivos independientes de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos pESE o pESE-EhCHT1c fueron preparados y tratados con 1 mM de IPTG (inductor). Brevemente, 5 mL de medio LB-Amp fueron inoculados con 0.05 mL de un cultivo semilla. Después de 2 h de incubación (37 °C, 300 rpm), los cultivos fueron suplementados con IPTG. La sobre-expresión fue permitida durante 2 h adicionales de incubación. Posteriormente, las pastillas celulares fueron separadas mediante centrifugación (2 min a 12,000 rpm) y resuspendidas en 1 mL de solución amortiguadora DPBS 1X (*Sigma*). Después de determinar la DO₆₅₀ de las suspensiones celulares, el volumen correspondiente a 2 UDO fue transferido a un microtubo y la pastilla celular fue separada mediante centrifugación. Enseguida, cada pastilla fue lavada 3 veces con 1 mL de DPBS 1X (2 min, 10,000 rpm) y resuspendida en 1 mL de solución de lisis [50 mM de NaCl; 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0]. La lisis celular fue favorecida mediante 5 min de ultra-sonicación (10 ciclos: 30 s x 30 s; potencia 15) usando un equipo *Misonix*[®] *Microson*[™] *XL-2000* (*Qsonica, LLC.*). Una muestra de 25 µL fue tomada como control de lisado bacteriano total (LBT). Posteriormente, los lisados fueron clarificados mediante centrifugación a 5,000 Xg durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a un microtubo y fraccionado mediante centrifugación a 16,060 Xg durante 1.5 h (4 °C). El sobrenadante fue transferido a un microtubo y conservado como la fracción citosólica-periplásmica (C/P). El precipitado (membranas celulares) fue solubilizado en 0.1 mL de solución amortiguadora LSS-HEPES [1% de N-lauroilsarcosina de sodio; 50 mM HEPES, pH 7.0] e incubado a temperatura ambiente durante 30 min. La suspensión membranosa solubilizada fue fraccionada mediante centrifugación a 16,060 Xg durante 1.5 h (4 °C). El sobrenadante fue transferido a un microtubo y conservado como la fracción de membrana Interna (MI). El precipitado fue lavado con 0.4 mL de solución amortiguadora LSS-HEPES, mediante resuspensión y centrifugación (16,060 Xg, 30 min, 4 °C). Finalmente, el precipitado fue resuspendido

en 0.1 mL de solución de lisis-urea [8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0] y conservado como la fracción de membrana externa (ME).

4.8.2. Análisis de las fracciones subcelulares

Las muestras para electroforesis fueron preparadas mezclando 0.025 mL de cada fracción (LBT, C/P, MI, y ME) con 0.025 mL de solución amortiguadora 2X para carga de proteínas. El mezclado fue favorecido mediante agitación en disruptor celular (3,000 rpm, 3 min). Las muestras fueron desnaturalizadas durante 10 min a una temperatura de 95-100 °C. Las proteínas contenidas en 0.01 mL de muestra fueron separadas mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 12% y, posteriormente, transferidas a nitrocelulosa para inmuno-detección tipo *western blot*.

4.9. Análisis de actividad endoquitinolítica en membrana celular

4.9.1. Expresión de *Eh*CHT1c en superficie de *E. coli*

Los cultivos obtenidos de manera independiente de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos pET22b(+), pESE, o pESE-*Eh*CHT1c fueron preparados y tratados con 1 mM de IPTG (inductor). Brevemente, 5 mL de medio LB-Amp fueron inoculados con 0.05 mL de un cultivo semilla. Después de 2 h de incubación (37 °C, 300 rpm), los cultivos fueron suplementados con IPTG. La sobre-expresión fue permitida durante 1 h adicional de incubación. Posteriormente, las pastillas celulares fueron separadas mediante centrifugación (2 min a 12,000 rpm) y resuspendidas en 1 mL de solución amortiguadora DPBS 1X (Sigma). Después de determinar la DO₆₅₀ de las suspensiones celulares, el volumen correspondiente a 5 UDO fue transferido a un microtubo y la pastilla celular fue separada mediante centrifugación. Enseguida, cada pastilla fue resuspendida en 0.5 mL de una solución amortiguadora 50 mM de citratos-fosfatos pH 5.0.

4.9.2. Ensayo típico de actividad

La actividad endoquitinolítica de *Eh*CHT1c desplegada en la superficie de *E. coli* fue determinada mediante la adaptación de un microensayo fluorogénico, usando a 4-metilumbeliferil- β -D-triacetilquitotriósido como sustrato. La hidrólisis del sustrato rinde la liberación de 4-

metilumbeliferona (4MUF), el cual emite fluorescencia azul cuando se excita con luz UV. Las mezclas de reacción (0.1 mL) fueron preparadas añadiendo 0.5 UDO a microtubos conteniendo una solución amortiguadora de citratos-fosfatos (50 mM, pH 5.0). Una mezcla carente de células fue utilizada como control negativo y otra suplementada con quitinasa de la bacteria *Serratia marcescens* (*Sigma*) fue control considerada como positivo. Después de 5 min de incubación (37 °C, 300 rpm), las mezclas fueron suplementadas con 0.5 nanomoles de sustrato fluorogénico y continuaron incubándose durante 1 h. Enseguida, los sobrenadantes fueron separados mediante centrifugación (14,500 rpm, 2 min) y mezclados con 0.1 mL de una solución 0.5 M de Gly-NaOH (pH 10.3). La fluorescencia emitida por 4MUF fue comprobada mediante observación en un transiluminador UV y registrada usando un fotodocumentador *GelDoc EZ* (*Biorad*).

4.9.3. Análisis cinético de la actividad

La cinética de la actividad enzimática de *Eh*CHT1 desplegada en la superficie de *E. coli* fue examinada mediante el ensayo fluorogénico, analizando la cantidad de 4MUF liberada y acumulada con respecto al tiempo de incubación. Las mezclas de reacción (0.5 mL) fueron preparadas añadiendo 1 UDO a microtubos conteniendo una solución amortiguadora de citratos-fosfatos (50 mM, pH 5.0). Una mezcla carente de sustrato y células fue utilizada como blanco; en tanto, otra carente de células fue considerada como control de sustrato (hidrólisis espontánea). Después de 5 min de incubación (37 °C, 300 rpm), las mezclas fueron suplementadas con 2.5 nanomoles de sustrato fluorogénico. Inmediatamente, una alícuota de 0.1 mL fue colectada ($t = 0$) y las mezclas continuaron incubándose durante 4 h. Alícuotas de 0.1 mL fueron colectadas cada hora y tratadas de la siguiente manera: los sobrenadantes fueron separados mediante centrifugación (14,500 rpm, 2 min) y una muestra de 0.075 mL fue mezclada con 0.075 mL de una solución 0.5 M de Gly-NaOH (pH 10.3). La fluorescencia emitida por acumulación de 4MUF fue evidenciada y registrada como se mencionó anteriormente.

4.10. Análisis preliminar de la actividad quitinolítica sobre sustratos complejos

4.10.1. Preparación de quitina coloidal

La quitina coloidal fue preparada siguiendo un protocolo reportado [Gómez Ramírez *et al.*, 2004]. Brevemente, 5 g de quitina de cangrejo (pulverizada en mortero) fueron resuspendidos en 100

mL de ácido fosfórico al 85% y mezclados durante 6 h, con apoyo de un agitador magnético. Posteriormente, la mezcla fue refrigerada (12-16 °C) durante 24 h. Enseguida, fue agregada lentamente a un litro de agua corriente (estéril, fría), favoreciendo la formación de un precipitado blanco. La quitina coloidal (QC) fue recuperada mediante filtración por vacío, y transferida a un tubo cónico. Posteriormente, la QC fue lavada con suficiente agua corriente (estéril, fría), mediante centrifugación (9500 rpm, 5 min), hasta obtener un valor de pH = 6.5 en el sobrenadante. Finalmente, la QC fue esterilizada en autoclave (121 °C, 15 min). Los ensayos fueron realizados utilizando dos soluciones de QC: (i) 1% en solución 0.1 M de acetato de sodio (pH 5.0), y (ii) 1% en solución 174 mM de ácido acético.

4.10.2. Expresión y ensayo de actividad

Los cultivos independientes de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos pET22b(+), pESE, o pESE-*Eh*CHT1c fueron preparados como se describió anteriormente (ver sección 4.9.1.), con la excepción de que la pastilla celular fue resuspendida en 0.5 mL de una solución 0.1 M de acetato de sodio (pH 5.0) o 174 mM de ácido acético, dependiendo de la solución de sustrato. La actividad quitinolítica de *Eh*CHT1c desplegada en la superficie de *E. coli* fue determinada mediante la adaptación de un microensayo cromogénico, usando QC como sustrato. La hidrólisis del sustrato rinde quito-oligosacáridos con extremos reductores, los cuales determinados fueron valorados mediante dos micro-ensayos típicos. Las mezclas de reacción (0.1 mL) fueron preparadas añadiendo 0.5 UDO a microtubos conteniendo una solución 1% de QC. Una mezcla carente de células fue utilizada como control negativo y otra suplementada con quitinasa de la bacteria *Serratia marcescens* (*Sigma*) fue control considerada como positivo. Después de 1 h de incubación (37 °C, 300 rpm), los sobrenadantes fueron separados mediante centrifugación (14,500 rpm, 2 m) y utilizados para analizar el contenido de azúcares reductores totales por uno de los siguientes métodos.

4.10.3. Determinación de azúcares reductores mediante reducción de DNSA

En presencia de azúcares reductores (AR), el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (ANSA), el cual en condiciones alcalinas exhibe una absorbancia máxima a 540 nanómetros. La cuantificación de AR fue determinada mezclando 0.08 mL del sobrenadante con 0.2 mL de la solución alcalina de DNSA [1% de DNSA; 30% de tartrato de sodio y

potasio; 0.4 M de NaOH]. Enseguida, la reacción fue favorecida a 100 °C durante 15 min. Después de 1 min en hielo, la mezcla fue centrifugada (14,500 rpm, 2 min) y 0.2 mL del sobrenadante fueron transferidos a una microplaca. Los registros de A_{540} fueron obtenidos utilizando el lector *Microplate Reader 680 (Biorad)*.

4.10.4. Determinación de azúcares reductores mediante reducción de ferricianuro

En presencia de azúcares reductores (AR), el ion ferricianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ se reduce a ion ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. En condiciones alcalinas, el ion ferricianuro exhibe una absorbancia máxima a 405-415 nm, la cual disminuye cuando se reduce a ion ferrocianuro. La cuantificación de AR fue determinada mezclando 0.08 mL del sobrenadante con 0.2 mL de la solución alcalina de ferricianuro de potasio [15 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 0.5 M de Na_2CO_3]. Enseguida, la reacción fue favorecida a 100 °C durante 15 min. Después de 1 min en hielo, la mezcla fue centrifugada (14,500 rpm, 2 min) y 0.2 mL del sobrenadante fueron transferidos a una microplaca. Los registros de A_{415} fueron obtenidos como antes.

4.11. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los experimentos fueron reproducidos al menos tres veces. Los datos o resultados que mostraron evidencias de un sesgo no asociado a la hipótesis; p. ej. error experimental, técnico, o humano, fueron eliminados sin consideración alguna. Los resultados de cada experimento fueron expresados como media \pm desviación estándar y su significancia fue analizada mediante ANOVA y, de ser necesario, con una prueba t. La significancia estadística fue considerada cuando $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete computacional *GraphPad™ Prism®* v 4.0.

4.12. Bioservidores y biocomputo

El servidor del Centro Nacional de Información en Biotecnología (*NCBI*) de los Estados Unidos de Norteamérica fue consultado periódicamente para obtención y análisis de secuencias nucleotídicas y polipeptídica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Adicionalmente, algunos análisis proteómicos fueron realizados usando los bioservidores del portal de recursos bioinformáticos

ExPASy (<https://www.expasy.org>). Los plásmidos fueron construidos *in silico* usando los paquetes computacionales del dominio público *Serial Cloner* (<http://serialbasics.free.fr>) y *SnapGene® Viewer* (<http://www.snapgene.com>). Los análisis densitométricos fueron realizados usando el programa computacional del dominio público *ImageJ®* (<http://imagej.net>).

5. RESULTADOS

5.1. Obtención del plásmido pESE

Inicialmente, se construyó un plásmido de expresión de proteínas en la superficie de *E. coli*, basado en la fusión Lpp-OmpA y usando el sistema de expresión pET (*Novagen*). La secuencia codificante para la fusión Lpp-OmpA fue amplificada a partir del plásmido pQSE (Anexo 1). Como se observa en la Fig. 5A, un producto del tamaño esperado (669 pb) fue amplificado. Enseguida, fue

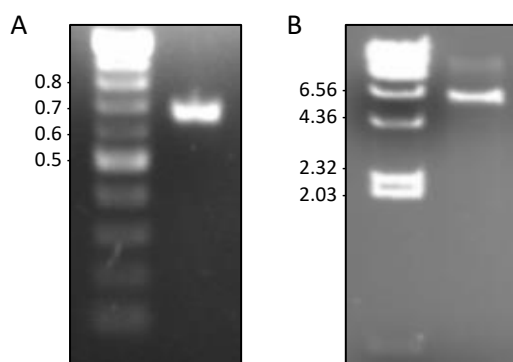


Fig. 5. Separación de fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio: (A) Producto de PCR Lpp-OmpA, y (B) plásmido pESE lineal (digerido con HindIII).

En cada gel, el carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular (Kb).

insertado en el vector pET22b(+) (Anexo 2), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7-ARNpol). Como se muestra en la Fig. 5B, un plásmido del tamaño esperado (5991 pb) fue obtenido y denominado pESE (Fig. 6). La autenticidad del fragmento clonado fue verificada mediante secuenciación de ADN.

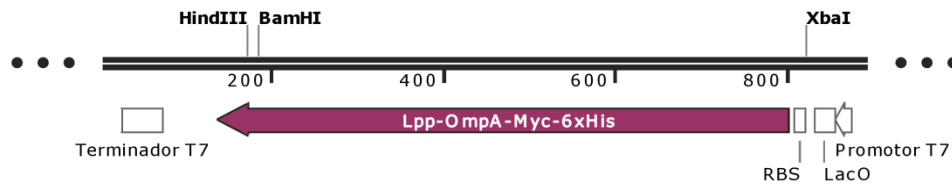
5.2. Obtención del plásmido pESE-*Eh*CHT1c

Posteriormente, se construyó el plásmido para la expresión de *Eh*CHT1c en la superficie de *E. coli* usando el sistema de expresión pESE (obtenido en este estudio y reserva del Laboratorio de



Fig. 6. Representación esquemática del plásmido pESE.

Este vector contiene los orígenes de replicación ColE1 (bacteriano) y f1 (bacteriófago), el promotor y terminador del gen codificante para la ARN polimerasa del bacteriófago T7, la secuencia codificante para la fusión proteica Lpp-OmpA en fase con la etiqueta molecular Myc y un hexámero de histidinas (6xHis). Además, contiene los genes codificantes para la β -lactamasa (resistencia a ampicilina) y el represor de lactosa (*lacI*). En el panel inferior se denotan los sitios de restricción utilizados para la clonación molecular.



Biología de la FCQI-UABC). La secuencia codificante para el péptido maduro de *Eh*CHT1 fue amplificada a partir del plásmido pET22-*Eh*CHT82 (Anexo 3). Como se observa en la Fig. 7A, un producto del tamaño esperado (1,256 pb) fue amplificado. Después, fue insertado en el plásmido pESE, en fase con la fusión Lpp-OmpA. Como se muestra en la Fig. 7B, un plásmido del tamaño

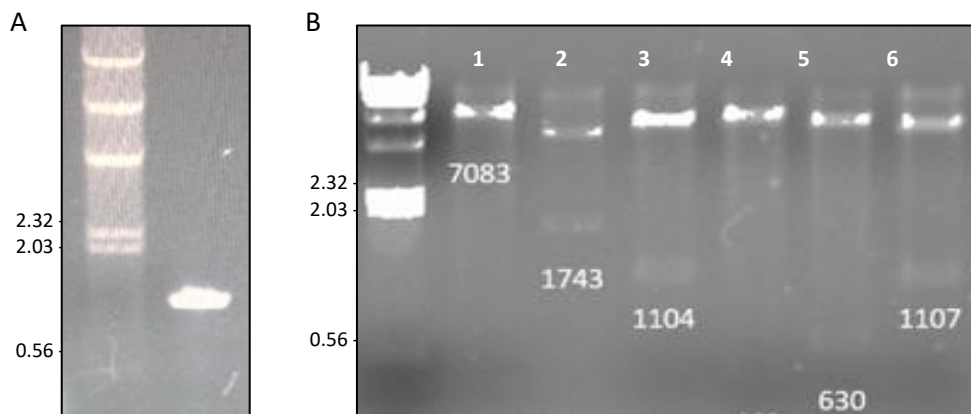


Fig. 7. Separación de fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio: (A) Producto de PCR *Eh*CHT1c, y (B) plásmido pESE-*Eh*CHT1c digerido con diferentes endonucleasas.

A la izquierda se indica el marcador de peso molecular (Kb). En (B), al pie de cada carril se muestra la talla esperada para cada fragmento. 1, EcoRI; 2, HindIII/XbaI; 3, BamHI/HindIII; 4, BamHI/EcoRI; 5, EcoRI/HindIII; 6, EcoRI/XbaI.

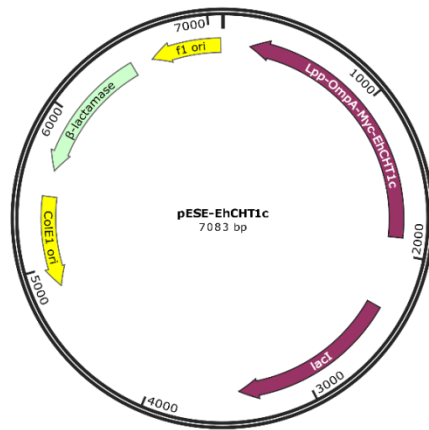
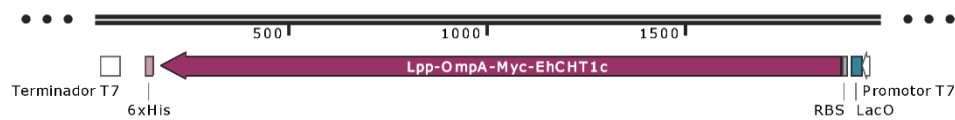


Fig. 8. Representación esquemática del plásmido pESE-*EhCht1c*.

Este vector conserva las características moleculares de su parental (pESE), con la diferencia de que se ha insertado la secuencia codificante *EhCht1c* en fase con la fusión Lpp-OmpA y la etiqueta molecular Myc, generando la fusión Lpp-OmpA-Myc-*EhCht1c* (panel inferior). Cabe destacar que la inserción ocasionó que el hexámero de histidinas (6xHis) quede después del codón de paro.



esperado (7,083 pb) fue obtenido; aún más, la caracterización molecular mostró el patrón de fragmentos de restricción esperados. La autenticidad del segmento insertado fue verificada mediante secuenciación de ADN. El plásmido obtenido fue nombrado pESE-*EhCht1c* (Fig. 8).

5.3. Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-*EhCht1c* se localizan en la membrana externa de *E. coli*

Primeramente, la expresión de las proteínas de fusión, Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-*EhCht1c*, fue verificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de lisados totales de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos correspondientes. Como se indica en la Fig. 9, los cultivos inducidos muestran la presencia de una proteína del tamaño esperado para cada fusión, 23.9 kDa para Lpp-OmpA (pESE, carril [+]) y 63.5 kDa para Lpp-OmpA-*EhCht1c* (pESE-*EhCht1c*, carril [+]) (señaladas con flechas blancas). Además, aparentemente, no se presentó fuga en la expresión, ya que no se observaron las proteínas correspondientes en los cultivos no inducidos (carriles denotados como [-]).

Enseguida, la citolocalización de ambas fusiones fue determinada mediante inmunodetección. Cabe mencionar el plásmido pESE permite el etiquetado de proteínas con el epítopo Myc, presente en el C-terminal de OmpA y antes del sitio de clonaciones múltiples. Para esto, lisados bacterianos totales fueron preparados y fraccionados siguiendo un protocolo estándar [Yang *et al.*, 2008]. Las fracciones subcelulares colectadas, citosólica-periplásmica (C/P), membrana interna (MI), y membrana externa (ME), fueron analizadas mediante inmunodetección tipo *western blot*. Como se

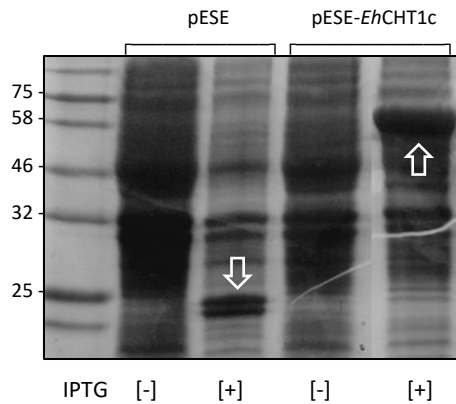


Fig. 10. Análisis de expresión de las fusiones proteicas Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-EhCht1c en lisados bacterianos de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos respectivos.

Separación de proteínas en gel de poliacrilamida al 12%, teñido con azul de Coomassie. El carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular (kDa). Los plásmidos utilizados se muestran en la parte superior, en tanto las condiciones de inducción en la parte inferior. Las flechas indican la fusión proteica correspondiente.

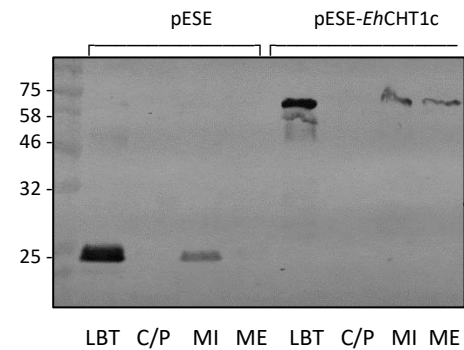


Fig. 10. Análisis de la localización celular de las fusiones proteicas Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-EhCht1c en fracciones subcelulares de *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los plásmidos respectivos.

Inmuno-reconocimiento tipo *western blot* de proteínas separadas en gel de poliacrilamida al 12% y electro-transferidas a nitrocelulosa. El reconocimiento específico se realizó utilizando anticuerpos anti-Myc. En la izquierda se denota el marcador de peso molecular (kDa). Los plásmidos utilizados se muestran en la parte superior, en tanto las condiciones de inducción en la parte inferior.

muestra en la Fig. 10, la fusión Lpp-OmpA fue localizada en la fracción MI, con restringida exportación hacia ME, lo que sugiere una aparente acumulación en el primer compartimiento de la vía de secreción bacteriana. Por otro lado, la fusión Lpp-OmpA-EhCht1c fue localizada en las fracciones MI y ME, en proporciones muy similares, lo que presume su expresión en la superficie celular, tal como se esperaba. Además, cabe destacar que ninguna de las dos fusiones analizadas fue detectada en la fracción C/P, lo que hace evidente su localización exclusiva en membrana celular.

5.4. La sobre-expresión de proteínas afecta la fisiología bacteriana

En condiciones basales de expresión proteica (sin inductor), los tres cultivos (*E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET22 b(+), pESE, o pESE-EhCht1c) mostraron cinéticas de crecimiento con tendencia típica ($t_d = 33.7$ min) (resultados no mostrados), lo que supone una fisiología bacteriana estable en esas condiciones. Por el contrario, las cinéticas de cultivo en condiciones de sobre-expresión proteica (con inductor) exhibieron diversas tendencias, particularmente después de suplementado el inductor, como se distingue en la Fig. 11. Durante la etapa de pre-inducción (0-120 min), los cultivos describieron una tendencia similar, con un t_d (35.4 min) comparable con el valor

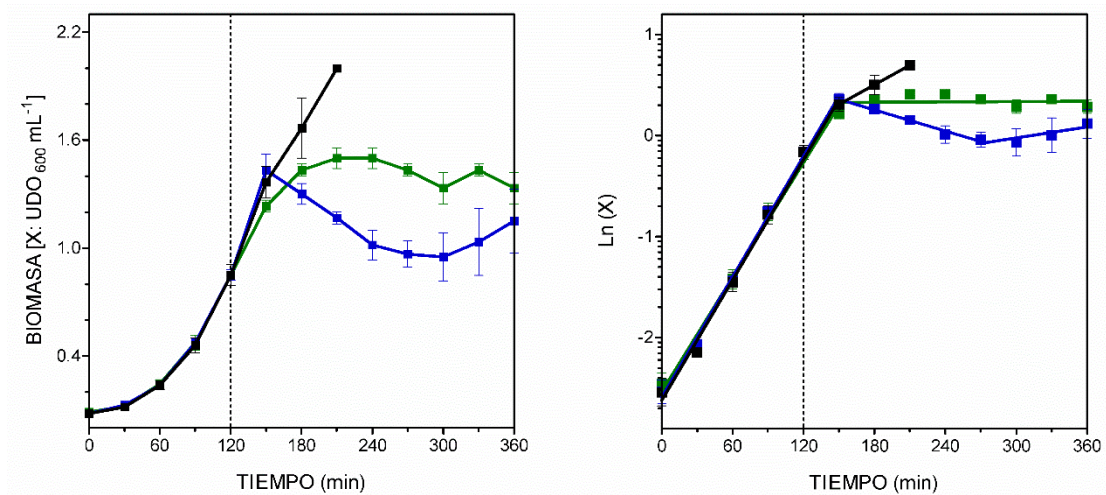


Fig. 11. Análisis de crecimiento de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) que despliega las fusiones proteicas Lpp-OmpA o Lpp-OmpA-EhCht1c.

Cinética de crecimiento bacteriano en medio LB-Amp: verde, pET22b(+); azul, pESE; negro, pESE-EhCht1c. Cada punto representa la media \pm E.E.M. La línea punteada indica el tiempo donde el inductor fue suplementado. Paneles: izquierdo, biomasa con respecto al tiempo; derecho, logaritmo natural de la biomasa con respecto al tiempo.

calculado en condiciones basales. Sin embargo, 30 min después de suplementado el inductor, cada cultivo desarrolló una tendencia completamente distinta: (i) el cultivo que sobre-expresa T7-RNapol, portador de pET22b(+), alcanzó tempranamente la fase estacionaria y se mantuvo en ella hasta el final de la cinética, (ii) el cultivo que sobre-expresa Lpp-OmpA, portador de pESE, entró súbitamente a fase de muerte celular y se mantuvo en ella durante 120 min, inmediatamente después, mostró una leve recuperación (últimos 90 min), y (iii) el cultivo que sobre-expresa Lpp-OmpA-EhCht1c, portador de pESE-EhCht1c, se mantuvo en la fase exponencial pero con

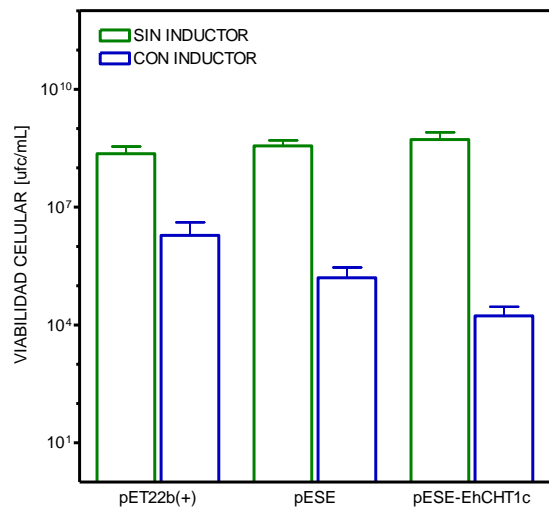


Fig. 12. Análisis de viabilidad de *E. coli* BL21 (DE3) que despliega la fusión Lpp-OmpA o Lpp-OmpA-EhCht1c.

Para cada cultivo, en el eje X se indica el plásmido correspondiente; en tanto, en el eje Y se muestran los valores logarítmicos de la densidad celular.

una reducción en su tasa de crecimiento ($t_d = 108$ min).

Por otro lado, el análisis de viabilidad celular reveló resultados contrastantes, como se denota en la Fig. 12. En condiciones fisiológicas basales (sin inductor), los cultivos no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), lo que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente. Sin embargo, en condiciones de sobre-expresión proteica (con inductor), las diferencias son significativas ($p < 0.05$), y menores al comparar cada cultivo con su respectiva condición basal ($p < 0.01$). Específicamente, el cultivo que sobre-expresa a T7-ARNpol, portador de pET22b(+), registró una disminución de su viabilidad en 28%, lo cual es atribuible a la sobre-expresión citosólica de esa proteína. Además, la sobre-expresión y localización en membrana de las proteínas Lpp-OmpA y Lpp-OmpA-EhCHT1c extendió el efecto negativo, ya que los cultivos que portan los correspondientes plásmidos, pESE y pESE-EhCHT1c, exhibieron un decremento de su viabilidad en 39 y 49%, respectivamente.

En conjunto, ambos resultados demuestran que la co-sobre-expresión de las proteínas (T7-ARNpol/Lpp-OmpA o T7-ARNpol/Lpp-OpA-EhCHT1c) localizadas en diferentes compartimientos subcelulares (citósol y membrana externa), afectan la negativamente fisiología bacteriana, alterando la cinética de crecimiento y reduciendo la viabilidad celular. La Tabla 3 conjunta los resultados de ambos análisis.

5.5. EhCHT1c desplegada en superficie de *E. coli* exhibe actividad endoquitinolítica

Inicialmente, se confirmó la expresión funcional de EhCHT1c desplegada en la superficie bacteriana mediante la hidrólisis del 4-metilumbeliferil- β -D-triacetilquitotriósido (4MUF-TAQT), el cual es un sustrato fluorogénico típicamente utilizado para evaluar la actividad endoquitinolítica. Brevemente, en condiciones estándar de reacción, una quitinasa activa debe ser capaz de hidrolizar el sustrato y liberar 4-metilumbeliferona (4MUF, grupo saliente), el cual emite

Tabla 3. Resultados de análisis de curvas de crecimiento y sobrevivencia ($n = 3$; media \pm E.E.M).

Curvas de crecimiento (post-inducción)		
Plásmido	t_d (min)	μ ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)
pET22b(+)	ND	ND
pESE	ND	ND
pESE-EhCHT1c	108	6.418 ± 0.014
Viabilidad celular		
Plásmido	SI ($\times 10^8$ ufc/mL)	CI ($\times 10^4$ ufc/mL)
pET22b(+)	4.33 ± 0.33	173.33 ± 67.41
pESE	7.00 ± 1.15	22.67 ± 9.33
pESE-EhCHT1c	7.33 ± 2.03	3.00 ± 2.00

ND, no determinado; SI, sin inductor; CI, con inductor.

fluorescencia (visible) cuando se excita con luz ultravioleta.

Como se observa en la Fig. 13, los pocillos de las reacciones blanco (sin enzima) y control (con quitinasa bacteriana) emitieron la mínima y máxima fluorescencia, respectivamente, lo que demostró que las condiciones del ensayo eran favorables para evaluar la actividad enzimática. Además, se verificó que los cultivos portadores de plásmidos testigo (pET22b(+)) y pESE) no emiten señal fluorescente, lo que indicó que no existe actividad quitinolítica endógena en el fondo bioquímico-fisiológico de estudio. Con estos resultados como antecedentes, se comprobó que el cultivo portador del plásmido pESE-*Eh*CHT1c emite una señal fluorescente moderada, lo que demuestra que la quitinasa amibiana (*Eh*CHT1c) desplegada en la superficie bacteriana es funcionalmente activa.

Adicionalmente, para obtener una aproximación semi-cuantitativa de la actividad catalítica, se realizó una cinética de hidrólisis del sustrato, utilizando células completas como sistema de despliegue de *Eh*CHT1c, y se analizó la fluorescencia mediante densitometría digital. Como se denota

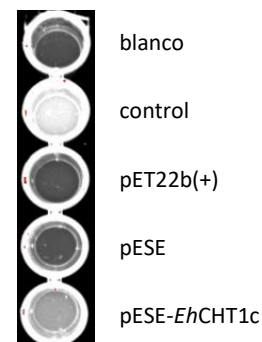


Fig. 14. Análisis cualitativo de la actividad endoquitinolítica de *Eh*CHT1c desplegada en la superficie de *E. coli* BL21 (DE3).

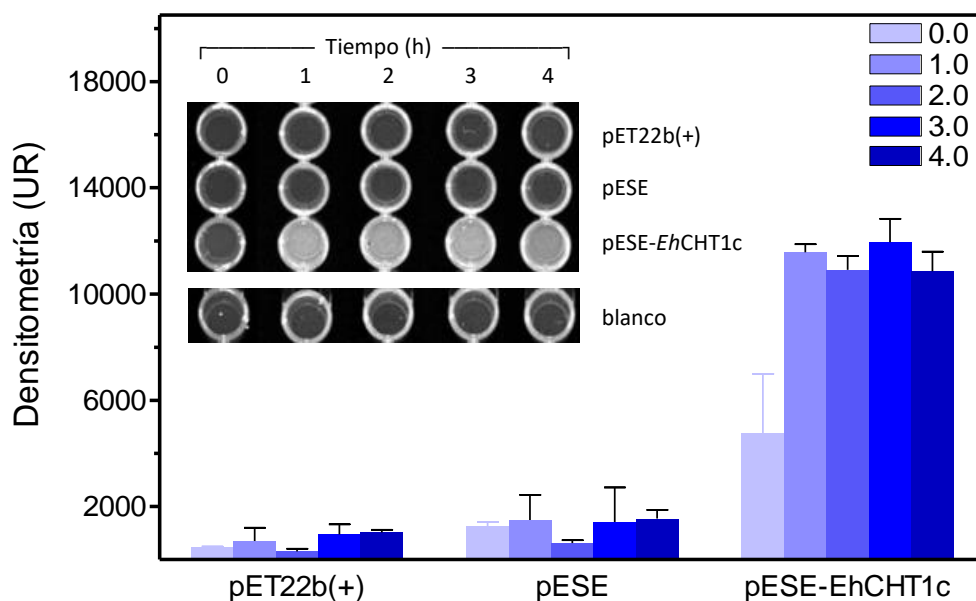


Fig. 13. Análisis semi-cuantitativo de la cinética (0-4 h) de actividad endoquitinolítica de *Eh*CHT1c desplegada en superficie de *E. coli* BL21 (DE3).

en la Fig. 14, los resultados presumen que la enzima activa alcanza niveles máximos en un tiempo relativamente corto (1 h o menos), lo que sugiere que *Eh*CHT1c es funcionalmente eficiente en las condiciones analizadas.

5.6. La solubilidad del sustrato es una limitante de la actividad quitinolítica de *Eh*CHT1c desplegada en superficie de *E. coli*

Finalmente, para valorar el potencial biotecnológico de *Eh*CHT1c desplegada en superficie bacteriana, se realizaron ensayos utilizando como sustrato una preparación “*in-house*” de quitina coloidal (QC). La actividad quitinolítica fue determinada usando diferentes condiciones de pH, concentración de QC, y cantidad de células. Por otro lado, la determinación de azúcares reductores fue realizada usando dos ensayos de reducción: (i) DNSA, y (i) ferricianuro. Empleando las condiciones previamente descritas para actividad endoquitinolítica (sustrato 4MUF-TAQT), los ensayos mostraron resultados no consistentes ni reproducibles, lo que sugiere una baja disponibilidad del sustrato (QC). Aún más, este hecho fue más notorio en la reacción control (con quitinasa de *S. marcescens*), donde también se observó ineficiencia catalítica, fortaleciendo la noción que presume una baja solubilidad del sustrato.

6. DISCUSIÓN

El despliegue de proteínas en superficie celular es una herramienta poderosa con amplio rango de aplicaciones biotecnológicas e industriales; p. ej. desarrollo de vacunas, tamizado de librerías de péptidos, catálisis en membrana celular, desarrollo de biosensores, y bioadsorción de metales [Park *et al.*, 2013]. Para un despliegue eficiente, se han desarrollado diferentes sistemas de expresión, consistentes de una proteína de anclaje a membrana (que funciona como acarreadora de una proteína efectora, que a la vez actúa como pasajera) y una célula hospedera [Han & Lee, 2014].

La elección de la proteína de anclaje es particularmente importante, ya que una elección incorrecta puede ocasionar una desestabilización de la membrana celular y ocasionar defectos de crecimiento [Francisco *et al.*, 1992; Daugherty *et al.* 1999]. Muchos polipéptidos han sido utilizados para desarrollar sistemas de anclaje y expresión, donde figuran las proteínas de membrana externa, lipoproteínas, y auto-transportadores. Las proteínas de membrana externa, como FadL, LamB, OmpA, OmpC, OmpF, OmpS, OprFm y PhoE, han sido utilizadas ampliamente para desplegar péptidos y proteínas, incluyendo polipéptidos de bajo peso molecular, dominios proteicos, enzimas, receptores, y anticuerpos [Park *et al.*, 2013; van Bloois *et al.*, 2011].

Un sistema tradicionalmente dócil para la sobre-expresión de proteínas lo integran los vectores de expresión pET, que portan el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, y la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli*, que contiene una copia genómica de la secuencia codificante para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor lacUV5 (una variante del promotor lac, el cual es insensible a represión catabólica y sólo es regulado por el represor LacI). La mayoría de los vectores pET emplean el promotor híbrido T7lacO, que combina la fuerza del promotor T7 y la regulación LacO-LacI para reducir la fuga de expresión en ausencia de inductor [Wagner *et al.*, 2008].

En el presente estudio, se expresó activamente el dominio catalítico de la quitinasa amibiana (*Eh*CHT1) en la superficie de *E. coli* BL21(DE3), utilizando la fusión Lpp-OmpA como polipéptido de anclaje en la membrana externa y el plásmido pET22b(+) como vector de expresión. A diferencia de otros estudios reportados, se utilizó un polipéptido Lpp-OmpA con 7 pasos transmembranales (β_1 - β_7), con el fin de brindar estabilidad estructural a la fusión completa, el cual fue diseñado exclusivamente para los fines de este trabajo.

Inicialmente, el plásmido pESE fue obtenido mediante procedimientos de clonación molecular. Este plásmido porta la fusión Lpp-OmpA-Myc-6xHis bajo el control del promotor T7lacO.

Un par de etiquetas moleculares, Myc y 6xHis, fueron incluidas para fines de verificación de la expresión. La habilidad de conducir la sobre-expresión del polipéptido de fusión y su inserción en membrana fue comprobada mediante inmuno-detección con anticuerpos anti-Myc; en tanto, su efecto sobre la fisiología bacteriana fue analizada mediante ensayos de crecimiento bacteriano y viabilidad celular.

Como se esperaba, Lpp-OmpA fue expresada eficientemente (Fig. 9) y fue localizada como destino final en membrana externa (Fig. 10). Sin embargo, aparentemente se retiene en membrana interna, hecho que puede ser explicado como: (i) un artefacto del protocolo de fraccionamiento subcelular, o bien (ii) una saturación mediada por la sobre-expresión y la modificación post-traducciona que sufre el primer residuo de la fusión, correspondiente a la cisteína N-terminal del péptido maduro Lpp, el cual se ancla a lípidos de membrana [Hantke & Braun, 1973]. Por otro lado, la sobre-expresión de Lpp-OmpA mostró un efecto negativo sobre la fisiología bacteriana; específicamente, afectando la rapidez de crecimiento (Fig. 11) y disminuyendo la viabilidad (Fig. 12), lo que sugiere un efecto deletéreo por alteración de la integridad de la membrana celular [Georgiou *et al.*, 1996].

Teniendo en consideración lo anterior, se comprobó que Lpp-OmpA-EhCht1c se expresa adecuadamente (Fig. 9) y localiza en su destino final, la membrana externa (Fig. 10). Aún más, fue muy notoria la disminución (aparente) de la retención en membrana interna, hecho que puede ser explicado considerando que la biosíntesis de un polipéptido de alto peso molecular puede condicionar a un retraso en el mecanismo de secreción, lo cual ofrece la temporalidad para alcanzar el destino final con una reducida acumulación en compartimientos previos. Sin embargo, prevalece la posibilidad de que tales resultados sean el producto de un artefacto del procedimiento técnico. Por otro lado, la sobre-expresión de Lpp-OmpA-EhCht1c también presentó un efecto deletéreo sobre la fisiología bacteriana, como era esperado; sin embargo, aunque causó una reducción de la viabilidad (Fig. 12), mostró una ligera recuperación de la rapidez de crecimiento (Fig. 11), lo que apoya (parcialmente) la noción que asocia la temporalidad que brinda la biosíntesis de un polipéptido de alto peso molecular y la rapidez del transporte de proteínas a través de la vía de secreción.

No obstante, los estudios de funcionalidad enzimática en membrana bacteriana demostraron que EhCht1c desplegada en la superficie de *E. coli* exhibe actividad endoquitinolítica sobre un sustrato estándar (un triacetilquitotriósido fluorogénico) (Figuras 13 y 14), lo que indica el sistema Lpp-OmpA (β_1 - β_7) fue exitosamente adaptado para los fines del presente estudio. Sin embargo, existen algunos detalles que demandan ser atendidos para mejorar este sistema de expresión y

extender su aplicabilidad a otras enzimas o proteínas. Específicamente, para reducir el efecto negativo de Lpp-OmpA sobre la fisiología bacteriana, se recomienda utilizar:

- (i) un plásmido con un promotor nativo; p. ej. Lpp o OmpA, el cual promoverá niveles de expresión similares a los funcionales *in vivo*;
- (ii) una cepa de *E. coli* tolerante a toxicidad proteica; p. ej., C41(DE3) o C43(DE3) de *Lucigen*, las cuales ha demostrado soportar adecuadamente la sobre-expresión de proteínas;
- (iii) una cepa de *E. coli* con expresión modulable de manera endógena; p. ej., Tuner (DE3) de *Novagen*, la cual mediante el control estricto de la entrada del IPTG (inductor) es posible regular la expresión de la T7-ARNpol;
- (iv) una cepa de *E. coli* con expresión modulable de manera exógena (episomal); p. ej., Lemo21 (DE3) de *New England Biolabs*, la cual porta un plásmido que expresa a la T7-lisozima (inhibidor natural de T7-ARNpol) bajo el control del promotor de ramnosa (el cual es estrictamente regulado por ramnosa); y
- (v) un plásmido para co-expresión basal de la T7-lisozima; p. ej. pLysS de *Novagen*, el cual ha sido utilizado apropiadamente para sobre-expresión de proteínas en las cepas BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), y Tuner (DE3).

Adicionalmente, para establecer la factibilidad del sistema propuesto, *Eh*CHT1c desplegada en superficie de *E. coli*, como biocatalizador con potencial biotecnológico es imperante demostrar su capacidad de hidrolizar un sustrato complejo (p. ej. quitina). Basado en la experiencia generada en el presente estudio, es importante garantizar la disponibilidad del sustrato; es decir, desarrollar un protocolo que asegure un alto grado de quitina soluble. Finalmente, existen otras ideas que prevalecen como posibles aplicaciones de la función ya comprobada (actividad endoquitinolítica); p. ej., la biodegradación de sustratos solubles de bajo peso molecular, obtenidos por métodos químicos, para generar quito-oligosacáridos de interés médico-farmacéutico.

7. CONCLUSIÓN

El dominio catalítico de la quitinasa amibiana (*Eh*CHT1c) fue expresado activamente en la superficie de la bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3), utilizando un sistema acarreador Lpp-OmpA regulado por la ARN polimerasa del bacteriófago T7, demostrando su funcionalidad catalítica (mediante la hidrólisis de sustratos soluble de bajo peso molecular) y vislumbrando su potencial como alternativa biotecnológica para la biodegradación de quitina.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., *et al.* (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs*, 8(5), 1482-1517.
- Arora, A., Abildgaard, F., Bushweller, J. H., & Tamm, L. K. (2001). Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8(4), 334–338.
- Barikani, M., Oliaei, E., Seddiqi, H., & Honarkar, H. (2014). Preparation and application of chitin and its derivatives: A review. *Iranian Polymer Journal*, 23(4), 307-326.
- Begum, S., Quach, J., & Chadee, K. (2015). Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1394.
- Benhar, I. (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, 19(1), 1-33.
- Bonfim, S. M., Cruz, A. H., Jesuino, R. S., *et al.* (2006). Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: Molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(2), 269-283.
- Cheung, R., Ng, T., Wong, J., & Chan, W. (2015). Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 13(8), 5156-5186.
- Choi, M.-H., Sajed, D., Poole, L., *et al.* (2005). An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143(1), 80–89.
- Croisier, F., & Jerome, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Das, S., Van Dellen, K., Bulik, *et al.* (2006). The cyst wall of *Entamoeba invadens* contains chitosan (deacetylated chitin). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 148(1), 86–92.
- Daugherty, P., Olsen, M., Iverson, B., & Georgiou, G. (1999). Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein engineering*, 12(7), 613–621.
- Duttagupta, D., Jadhav, V., & Kadam, V. (2015). Chitosan: A Propitious Biopolymer for Drug Delivery. *Current Drug Delivery CDD*, 12(4), 369-381.
- Faust, D. M., & Guillen, N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and Infection*, 14(15), 1428–1441.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L., & Earhart, C. F. (1973). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *Journal of Bacteriology*, 115(3), 717–722.
- Francisco, J. A., Earhart, C. F., & Georgiou, G. (1992). Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2713–2717.
- Fransen, M., Agaliotis, M., Nairn, L., *et al.* (2014). Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens. *Annals of the Rheumatic Diseases Ann Rheum Dis*, 74(5), 851-858.
- Georgiou, G., Poetschke, H., Stathopoulos, C., & Francisco, J. (1993). Practical applications of engineering gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends in biotechnology*, 11(1), 6–10.
- Georgiou, G., Stephens, D. L., Stathopoulos, C., *et al.* (1996). Display of β -lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'–OmpA'– β -lactamase fusions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 9(2), 239–247.

- Gómez Ramírez, M., Rojas Avelizapa, L. I., Rojas Avelizapa, N. G., & Cruz Camarillo, R. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol brilliant blue R®, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 213–219.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., *et al.* (2013). Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 5(1), 21–29.
- Han, M., & Lee, S. H. (2014). An efficient bacterial surface display system based on a novel outer membrane anchoring element from the *Escherichia coli* protein YiaT. *FEMS Microbiology Letters*, 362(1), 1–7.
- Hantke, K., & Braun, V. (1973). Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *European journal of biochemistry*, 34(2), 284–96.
- Henrotin, Y., Mobasher, A., & Marty, M. (2012). Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis? *Arthritis Research & Therapy*, 14(1), 201.
- Itoh, T., Hibi, T., Fujii, Y., *et al.* (2013). Cooperative degradation of chitin by extracellular and cell surface-expressed chitinases from *Paenibacillus sp.* strain FPU-7. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7482–7490.
- Jeelani, G., & Nozaki, T. (2014). Metabolomic analysis of *Entamoeba*: Applications and implications. *Current Opinion in Microbiology*, 20, 118–124.
- Jeelani, G., Sato, D., Husain, A., *et al.* (2012). Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba invadens* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. *PLoS ONE*, 7(5), e37740.
- Jo, J.-H., Han, C.-W., Kim, S.-H., *et al.* (2014). Surface display expression of *Bacillus licheniformis* lipase in *Escherichia coli* using Lpp'OmpA chimera. *Journal of Microbiology*, 52(10), 856–862.
- Karami, A., Latifi, A. M., & Khodi, S. (2014). Comparison of the organophosphorus hydrolase surface display using InaVN and Lpp-OmpA systems in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 379–385.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Luo, Z., Dong, X., Ke, Q., *et al.* (2014). Downregulation of CD147 by chitooligosaccharide inhibits MMP-2 expression and suppresses the metastatic potential of human gastric cancer. *Oncology Letters*, 8(1), 361–366.
- Mei, Y., Dai, X., Yang, W., Xu, X., & Liang, Y. (2015). Antifungal activity of chitooligosaccharides against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 330–335.
- Mourya, V. K., Inamdar, N. N., & Choudhari, Y. M. (2011). Chitooligosaccharides: synthesis, characterization and applications. *Polymer Science Series A*, 53(7), 583–612.
- Muñoz, P. L. A., Minchaca, A. Z., Mares, R. E., & Ramos, M. A. (2016). Activity, stability and folding analysis of the chitinase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 65(1), 70–77.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5th ed.). New York: Freeman, W. H. & Company.
- Park, B. K., & Kim, M.-M. (2010). Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5152–5164.
- Park, T. J., Heo, N. S., Yim, S. S., *et al.* (2013). Surface display of recombinant proteins on *Escherichia coli* by BclA exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbial Cell Factories*, 12, 81.
- Pautsch, A., & Schulz, G. E. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nature Structural Biology*, 5(11), 1013–1017.
- Qu, W., Xue, Y., & Ding, Q. (2015). Display of fungi xylanase on *Escherichia coli* cell surface and use of the enzyme in Xylan Biodegradation. *Current Microbiology*, 70(6), 779–785.
- Ralston, K. S., & Petri, W. A. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*, 27(6), 254–263.
- Richins, R. D., Kaneva, I., Mulchandani, A., & Chen, W. (1997). Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nature Biotechnology*, 15(10), 984–987.

- SAGARPA (2009). Estudio de la infraestructura logística para la exportación del camarón blanco a algunas ciudades de Estados Unidos y Canadá. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/camaroncongelado.pdf. (Obtenido el 16/09/2016).
- Saha, A., Gaurav, A. K., Bhattacharya, S., & Bhattacharya, A. (2015). Molecular basis of pathogenesis in Amoebiasis. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(4), 143–154.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuelson, J., & Robbins, P. (2011). A simple fibril and lectin model for cyst walls of *Entamoeba* and perhaps *Giardia*. *Trends in Parasitology*, 27(1), 17–22.
- Stathopoulos, C., Georgiou, G., & Earhart, C. F. (1996). Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp'OmpA(46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1-2), 112–119.
- Swiontek Brzezinska, M., Jankiewicz, U., Burkowska, A., & Walczak, M. (2014). Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology*, 68(1), 71–81.
- Tayel, A. A., Gharieb, M. M., Zaki, H. R., & Elguindy, N. M. (2016). Bio-clarification of water from heavy metals and microbial effluence using fungal chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 277–281.
- Valls, M., González-Duarte, R., Atrian, S., & De Lorenzo, V. (1998). Bioaccumulation of heavy metals with protein fusions of metallothionein to bacterial OMPs. *Biochimie*, 80(10), 855–861.
- van Bloois, E., Winter, R. T., Kolmar, H., & Fraaije, M. W. (2011). Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 29(2), 79–86.
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., *et al.* (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14371–14376.
- Wang, J., & Chao, Y. (2006). Immobilization of cells with surface-displayed chitin-binding domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 927–931.
- Yandigeri, M. S., Malviya, N., Solanki, M. K., *et al.* (2015). Chitinolytic *Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1217–1225.
- Yang, Z., Liu, Q., Wang, Q., & Zhang, Y. (2008). Novel bacterial surface display systems based on outer membrane anchoring elements from the marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4359–4365.
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174.
- Zakaria, A., Al-Share, B., & Al Asad, K. (2016). Primary pulmonary amebiasis complicated with multicystic empyema. *Case Reports in Pulmonology*, 2016, 8709347.
- Dey, T., Basu, R., & Ghosh, S. K. (2009). *Entamoeba invadens*: Cloning and molecular characterization of chitinases. *Experimental Parasitology*, 123(3), 244–249. doi:10.1016/j.exppara.2009.07.008

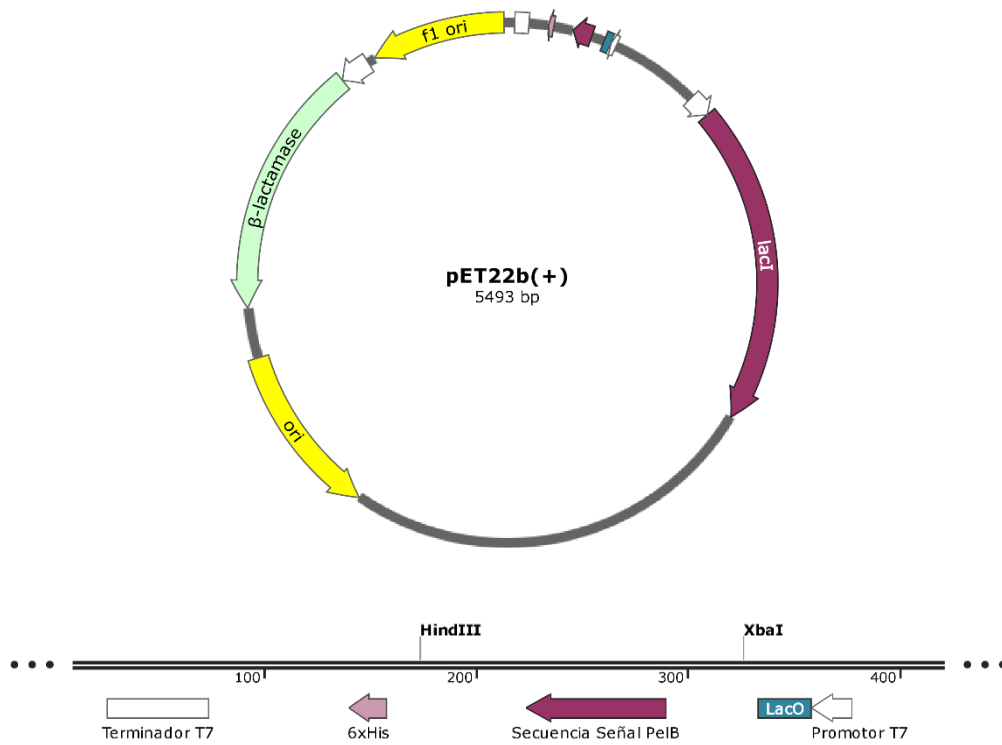
ANEXOS

Anexo 1. Representación esquemática del plásmido pQSE.



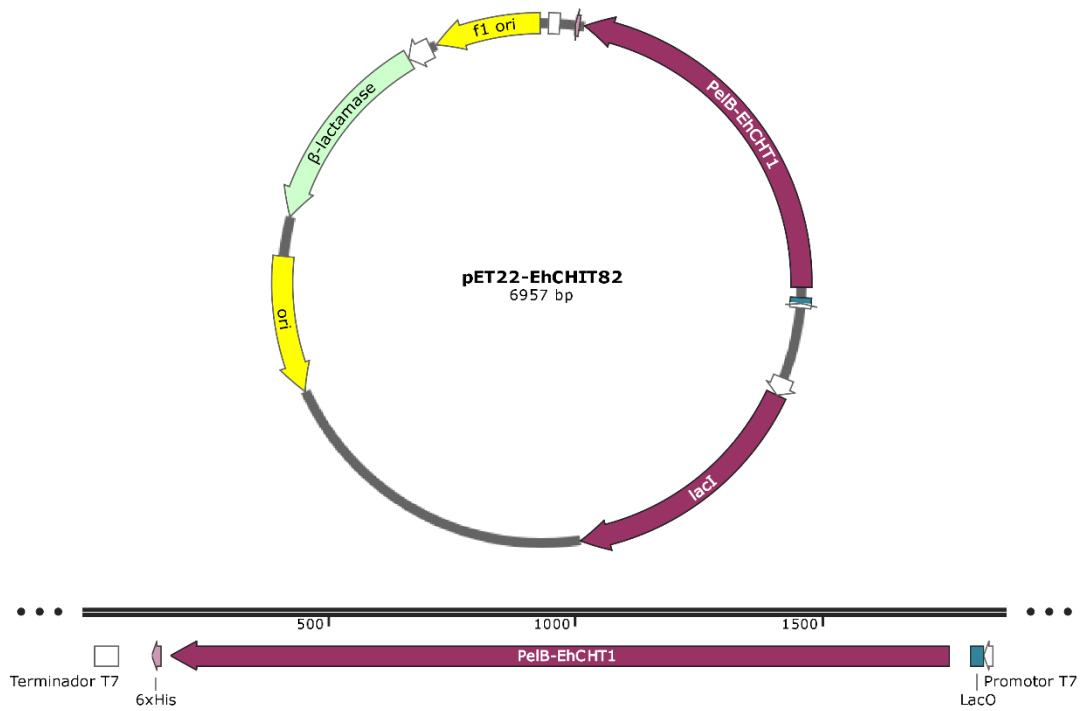
Este vector contiene el origen de replicación ColE1 (bacteriano), el promotor del bacteriófago T5, el operador LacO, y terminador t0 del bacteriófago λ, la secuencia codificante para la fusión Lpp-OmpA, un sitio de clonaciones múltiples, y el gen codificante para β-lactamasa (resistencia a ampicilina). Cabe destacar que contiene el gen inactivo para la cloramfenicol acetiltransferasa (resistencia a Cm). En el panel inferior se muestran las características moleculares importantes para el proceso de subclonación.

Anexo 2. Representación esquemática del plásmido pET22b(+).



Este vector contiene los orígenes de replicación ColE1 (bacteriano) y f1 (bacteriófago), el promotor y terminador del gen codificante para la ARN polimerasa del bacteriófago T7, la secuencia codificante para el péptido líder PelB (exportación al periplasma), un sitio de clonaciones múltiples, y la secuencia codificante para un hexámero de histidinas. Además, contiene los genes codificantes para la β-lactamasa (resistencia a ampicilina) y el represor de lactosa (*lacI*). En el panel inferior se denotan los sitios de restricción utilizados para la clonación molecular.

Anexo 3. Representación esquemática del plásmido pET22-EhCHIT82.



Este vector contiene los orígenes de replicación ColE1 (bacteriano) y f1 (bacteriófago), el promotor y terminador del gen codificante para la ARN polimerasa del bacteriófago T7, la secuencia codificante para la fusión PelB-EhCHIT (exportación al periplasma del péptido maduro EhCHIT1 nativo), y la secuencia codificante para un hexámero de histidinas. Además, contiene los genes codificantes para la β -lactamasa (resistencia a ampicilina) y el represor de lactosa (*lacI*). En el panel inferior se denotan las características importantes para la expresión proteica.