

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Clonación y expresión de la conotoxina recombinante cal26a
de *Conus californicus* en *Escherichia coli***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jahaziel Gasperin Bulbarela

Ensenada, Baja California, México

2015

Tesis defendida por

Jahaziel Gasperin Bulbarela

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Edna Sánchez Castrejón
Directora del Comité

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Jahaziel Gasperin Bulbarela © 2015
Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el debido permiso del autor

Resumen de la tesis de **Jahaziel Gasperin Bulbarela**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Clonación y expresión de la conotoxina recombinante cal26a de *Conus californicus* en *Escherichia coli*

Resumen aprobado por:

Dra. Edna Sánchez Castrejón
Directora de tesis

Las conotoxinas son péptidos de longitud menor a 50 aminoácidos, ricos en enlaces disulfuro, las cuales son producidas por los caracoles del género *Conus* y empleados para paralizar a sus presas como estrategia de defensa y/o alimentación. Estos péptidos son ligandos de diferentes blancos moleculares, entre los que se encuentran canales iónicos y receptores membranales. Como consecuencia de su gran afinidad y especificidad a su blanco molecular, estas toxinas representan una fuente potencial para el desarrollo de nuevos fármacos. El estudio de las conotoxinas se ve limitado por la dificultad que representa su obtención por vías naturales, ya que se requiere de la disección de una gran cantidad de especímenes para recabar suficiente material biológico para su análisis. Una alternativa a esto es la producción de proteínas recombinantes, la cual se basa en la clonación del gen que codifica para la conotoxina y su producción en sistema de expresión así como su posterior purificación. En este proyecto se plantea como objetivo obtener la conotoxina cal26a de manera recombinante en *E. coli* para su análisis de actividad, así como para su posterior empleo en estudios de estructura y caracterización de blancos moleculares, entre otros. Para lo cual se diseñaron cinco construcciones empleando el vector pET-22b (+), cal26a-His, His-cal26a¹⁻² y His-SP-cal26a¹⁻², para su expresión con la cepa BL21 (DE3). Solo cal26a-His fue expresado en cantidades suficientes para su evaluación, pero permaneció unido al péptido señal (*pe/B*) y formó cuerpos de inclusión. Los agregados fueron aislados y cal26a-His_r purificada en condiciones desnaturalizantes, obteniendo un rendimiento de 1.19 mg/L. La proteína recombinante fue replegada en columna de Ni-NTA mediante dos soluciones renaturalizantes, Tris-HCl 20 mM y Tris-HCl 20mM adicionado con glicina 10 mM. Un ensayo preliminar de actividad contra *M. tuberculosis* mostró una tendencia de inhibición del crecimiento, donde cal26a-His_r renaturalizado con glicina [8 µg/mL] redujo la actividad en un 20 % en comparación con el control, sin embargo estudios posteriores deben ser realizados para corroborar su actividad.

Palabras clave: Conotoxina, expresión, proteína recombinante, *Escherichia coli*.

Abstract of the thesis presented by **Jahaziel Gasperin Bulbarela** as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Cloning and expression of recombinant conotoxin cal26a from *Conus californicus* in *Escherichia coli*

Abstract by:

Dra. Edna Sánchez Castrejón
Thesis director

Conotoxins are peptides rich in disulfide bonds with less than 50 amino acids in length. These are produced by snails of the *Conus* genus which employ them to paralyze their prey as a feeding/defensive strategy. These peptides are ligands of different molecular targets, among which are ion channels and membrane receptors. Because of their high affinity and specificity to their molecular targets, these toxins represent a potential source for developing new drugs. Conotoxins research is limited by the difficulty of obtaining them the native way, as it requires dissection of a large number of specimens to obtain sufficient biological material for analysis. An alternative to this is the production of recombinant proteins, which is based on the cloning of the gene encoding the conotoxin and its expression in a protein production system and further purification. This project therefore seeks to obtain the conotoxin cal26a recombinantly in *E. coli* for analysis of activity as well as for subsequent use in studies of structure and characterization of molecular targets, among others. For this purpose five constructs were designed using the vector pET-22b(+), cal26a-His, His-cal26a¹⁻² and His-SP-cal26a¹⁻², for expression in the BL21 (DE3) strain. Only cal26a-His was expressed in quantities sufficient for evaluation, but remained attached to the signal peptide (*pe/B*) and formed inclusion bodies. The aggregates were isolated and cal26a-His_r purified in denaturing conditions, obtaining a yield of 1.19 mg/L. The recombinant protein was refolded on Ni-NTA column through two renaturing solution, 20 mM Tris-HCl and 20 mM Tris-HCl supplemented with 10 mM glycine. A preliminary test of activity against *M. tuberculosis* showed a trend of growth inhibition, where cal26a-His_r renatured with glycine [8 µg/mL] reduced the activity by 20 % compared to control, but further studies must be performed to corroborate its activity.

Keywords: Conotoxin, expression, recombinant protein, *Escherichia coli*.

Dedicatoria

A todos ustedes que de alguna forma apoyaron y facilitaron la realización de este proyecto.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por la oportunidad de incorporarme al posgrado, el apoyo y facilidades prestadas.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por aceptar ser parte de este proyecto, su dedicación, apoyo y todas sus enseñanzas.

A mi comité de tesis, al Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, a la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia y al Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez, por su tiempo y aportaciones.

A todos los que forman y/o formaron parte del Departamento de Innovación Biomédica.

A mi madre, padre y hermanos por su apoyo y confianza.

Y en especial a ti Eli por ser parte de mi vida y brindarme tu cariño y amor. ¡Te Amo!

Tabla de contenido

Página

Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
 Capítulo 1. Introducción	 1
 Capítulo 2. Antecedentes.....	 3
2.1. Conotoxinas.....	5
2.2. Blancos moleculares.....	8
2.2.1. Canales de calcio dependientes de voltaje	9
2.2.2. Canales de potasio dependientes de voltaje	9
2.2.3. Canales de sodio dependientes de voltaje	9
2.3. El estudio de las conotoxinas en México	10
2.4. Aplicación farmacológica de cal26a.....	11
2.5. Conotoxinas recombinantes	13
 Capítulo 3. Justificación	 16
 Capítulo 4. Hipótesis.....	 17
 Capítulo 5. Objetivo general	 18
5.1. Objetivos particulares	18
 Capítulo 6. Materiales y métodos.....	 19
6.1. Vector de expresión pET22b(+)	19
6.2. Clonación y expresión de cal26a	20
6.2.1. Construcción del plásmido recombinante	21

6.2.2. Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	24
6.2.3. Expresión a pequeña escala de cal26a	25
6.2.4. Análisis de la expresión a pequeña escala de cal26a	26
6.3. Clonación y expresión de cal26a con sitio de proteólisis	28
6.4. Purificación por cromatografía de afinidad a metales de la proteína recombinante cal26a-His.....	30
6.4.1. Purificación en condiciones nativas	30
6.4.2. Purificación en condiciones desnaturalizantes	31
6.4.3. Aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión	31
6.5. Renaturalización de la proteína recombinante cal26a-His.....	33
6.6. Ensayo de actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
Capítulo 7. Resultados.....	36
7.1. Construcción del plásmido pET22b-cal26a.....	36
7.1.1. Amplificación de los fragmentos cal26a.....	37
7.1.2. Digestión y ligación de pET-22b(+) y cal26a.....	38
7.1.3. Transformación del producto de ligación	39
7.1.4. Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	40
7.2. Análisis de la expresión a pequeña escala de cal26a	41
7.2.1. Electroforesis desnaturalizantes en tricina (Tricina-SDS-PAGE)	41
7.2.2. Inmunodetección	42
7.3. Clonación y expresión de cal26a con sitio de proteólisis	45
7.4. Purificación por cromatografía de afinidad a metales de la proteína recombinante cal26a-His.....	48
7.4.1. Purificación en condiciones nativas	48
7.4.2. Purificación en condiciones desnaturalizantes	49
7.4.3. Aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión	50
7.5. Renaturalización	52
7.6. Análisis de la actividad biológica	54
Capítulo 8. Discusión.....	55
Capítulo 9. Conclusiones.....	66

Lista de referencias bibliográficas	67
Anexos	79
A 1. Análisis del gen cal26a.....	79
A 2. Construcciones cal26a	80
A 3. Alineamiento de nucleótidos.....	82
A 4. Carga neta cal26a	83
A 5. Cuantificación por Micro-BCA	84
A 6. Evaluación de la estabilidad del plásmido.	86

Lista de figuras

Figura		Página
1	Diagrama del aparato venenoso de un caracol marino.....	4
2	Estructura del RNA mensajero y el gen codificante para el precursor peptídico de una conotoxina.....	6
3	Diagrama que muestra la clasificación de los conopeptidos.....	7
4	Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la conotoxina cal26a....	11
5	Mapa del vector de expresión pET-22b(+)......	19
6	Construcción del gen para la expresión en <i>E. coli</i> de la conotoxina cal26a y su secuencia de aminoácidos.....	20
7	Tratamientos para evaluar la expresión a pequeña escala de BL21(D3)-pET22b-cal26a-His.....	25
8	Construcción y secuencia de aminoácidos del gen para la expresión en <i>E. coli</i> de la conotoxina cal26a con sitio de proteólisis.....	29
9	Esquema de la distribución del ensayo en microplaca, para evaluar la actividad de cal26a-His recombinante sobre <i>M. tuberculosis</i>	35
10	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del plásmido pET-22b(+) purificado.....	36
11	Análisis electroforético de la temperatura de alineamiento óptima para cada par de oligonucleótidos.....	37
12	Análisis electroforético en gel de agarosa de los productos de digestión purificados.....	39
13	Análisis electroforético de las colonias evaluadas mediante PCR correspondientes a las tres construcciones.....	39
14	Análisis de secuencias traducidas de los plásmidos pET22b-His-cal26a ¹ , pET22b-His-cal26a ² y pET22b-cal26a-His.....	40
15	Electroforesis del PCR de colonia de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas con los respectivos plásmidos recombinantes.....	41

16	Análisis electroforético de BL21(DE3)-pET22b-cal26a-His con 0, 10 y 1000 μ M de IPTG.....	42
17	Inmunodetección de la expresión a pequeña escala.....	43
18	Evaluación de las condiciones de expresión de las construcciones His-cal26a ¹ y His-cal26a ²	44
19	Inmunodetección de las tres construcciones de cal26a expresadas con 1000 μ M a 21 °C durante 12 h.....	44
20	Análisis electroforético de la temperatura de alineamiento óptima para el oligonucleótido His-SP-cal26a _{For}	45
21	Análisis electroforético de las colonias evaluadas mediante PCR correspondientes a las dos construcciones.....	46
22	Análisis de las secuencias de aminoácidos de los plásmidos pET22b-His-SP-cal26a ¹ y pET22b-His-SP-cal26a ²	47
23	Inmunodetección de las condiciones de inducción de His-Sp-cal26a ² durante 12 h.....	48
24	Inmunodetección de los productos de la purificación por cromatografía de afinidad a metales en condiciones nativas.....	49
25	Análisis de la purificación por cromatografía de afinidad a metales en condiciones desnaturalizantes.....	49
26	Purificación desnaturalizante de cuerpos de inclusión.....	50
27	Estandarización de la purificación desnaturalizante de cuerpos de inclusión.....	51
28	Eluciones obtenidas de la purificación de cuerpos de inclusión.....	52
29	Plegamiento en columna utilizando Tris-HCl 20 mM pH 8.0 como agente renaturalizante (A) y adicionado con glicina 10mM (B).....	53
30	Evaluación de la actividad de cal26a-His _r contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
31	Análisis de frecuencia de codones de TxCC-KD en <i>E. coli</i>	79
32	Alineamiento de secuencia nucleotídica de las construcciones para la expresión de cal26a recombinante.....	82

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Familias farmacológicas de las conotoxinas.....	8
2	Conotoxinas recombinantes expresadas en diferentes sistemas de expresión.....	15
3	Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de la conotoxina cal26a.....	21
4	Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa.....	22
5	Cuantificación del vector pET-22b(+) a 260 nm.....	37
6	Análisis espectrofotométrico de los fragmentos purificados antes y después de su digestión.....	38
7	Glosario de las construcciones de cal26a _r	80
8	Tabla 7 Alcance obtenido para cada una de las construcciones de cal26a _r	81
9	Cuadro comparativo de la carga de las diferentes construcciones de cal26a y de las conotoxinas expresadas por Gao et al.....	83
10	Diluciones para la construcción de la curva estándar.....	84
11	Placas para la evaluación de la estabilidad del plásmido y su interpretación.....	86
12	Colonias obtenidas del ensayo de estabilidad del plásmido en cepas de E. coli BL21 (DE3).....	87

Capítulo 1. Introducción

El veneno de los caracoles del género *Conus* está constituido por una gran variedad de proteínas y elementos no proteicos como carbohidratos, compuestos cuaternarios de amonio y posiblemente aminos (Kohn, Saunders and Wiener, 1960), el cual es empleado por estos organismos como estrategia de defensa y/o alimentación. Uno de los componentes proteicos mayoritarios de esta mezcla, son las conotoxinas, con un peso menor a 5 kDa, un arreglo rico en cisteínas y enlaces disulfuro, las cuales se ha demostrado tienen un amplio potencial como herramientas para la investigación biomédica y farmacológica (Olivera and Teichert, 2007). Las conotoxinas afectan la función de moléculas señalizadoras ubicadas en la membrana plasmática, siendo los canales iónicos localizados en neuronas sus principales blancos moleculares (Buczek, Bulaj and Olivera, 2005).

Uno de los principales obstáculos en el estudio de las conotoxinas es la dificultad que presenta la obtención de estos péptidos de forma natural, es por ello que se han buscado alternativas para su obtención (Gao *et al.*, 2013). La forma más efectiva para su producción es mediante la síntesis química, sin embargo, su elevado costo y la dificultad en la formación de múltiples enlaces disulfuro imponen una desventaja, es por ello que se está optando por su biosíntesis en diversos sistemas de expresión recombinante que permitan generar conotoxinas activas en gran cantidad y alta pureza. Uno de estos sistemas de expresión es la bacteria *Escherichia coli*, que brinda la posibilidad de obtener péptidos ricos en enlaces disulfuro a un costo relativamente bajo en comparación con cualquier otro sistema (Gao *et al.*, 2013; Hernandez-Cuevas and White, 2012; Pi *et al.*, 2007; Spiezia, Chiarabelli and Polticelli, 2012).

Un hito en la historia de los péptidos de *Conus*, fue la aprobación por la FDA en el 2004 del fármaco conocido como ziconotide (Prialt, Elan); es empleado en el tratamiento de dolor crónico y agudo. Prialt es un péptido sintético idéntico a la conotoxina MVIIA procedente del caracol *Conus magus* y el cual también se ha obtenido de forma recombinante a partir de *E. coli* (Xia *et al.*, 2006).

En este trabajo se plantea el uso de un sistema de expresión procariota para la obtención de conotoxinas activas con el propósito de proveer de material suficiente y de manera constante para la investigación desarrollada en el Departamento de Innovación Biomédica del CICESE.

Capítulo 2. Antecedentes

Los caracoles del género *Conus* (cónidos) son gasterópodos marinos que pertenecen a la superfamilia Conoidea. Más de 700 especies de estos caracoles están distribuidas por todo el mundo (Filmer, 2001), principalmente en las costas tropicales de la región central del Indo-Pacífico, pero también en regiones más frías como el sur de California, el norte del golfo de México y el Mediterráneo. La mayoría viven en aguas poco profundas (< 5 m) preferentemente en los arrecifes de coral, sin embargo se han encontrado especies a profundidades mayores a los 150 m (Olivera, 2003; Peters, O'Leary, Hawkins, Carpenter and Roberts, 2013).

Los cónidos son cazadores nocturnos con una visión pobre y desventaja locomotora que compensan con un sistema quimiosensorial para ubicarse y un veneno potente capaz de paralizar instantáneamente a otros organismos, ya sea para alimentarse o para defenderse (Terlau and Olivera, 2004). Estos gasterópodos son clasificados principalmente de acuerdo a su alimentación estricta en: vermívoros, moluscívoros y piscívoros, sin embargo algunas especies pueden tener una dieta mixta (Duda, Kohn and Palumbi, 2001).

Los cónidos poseen un aparato venenoso especializado, constituido por un ducto venenoso donde se sintetiza el veneno y éste es expedido, por la fuerza generada en un bulbo muscular, hacia la probóscide donde un diente radular (formado en el saco radular) funciona de arpón y aguja hipodérmica para la inyección del veneno en el organismo objetivo (Figura 1) (Olivera, 2003).

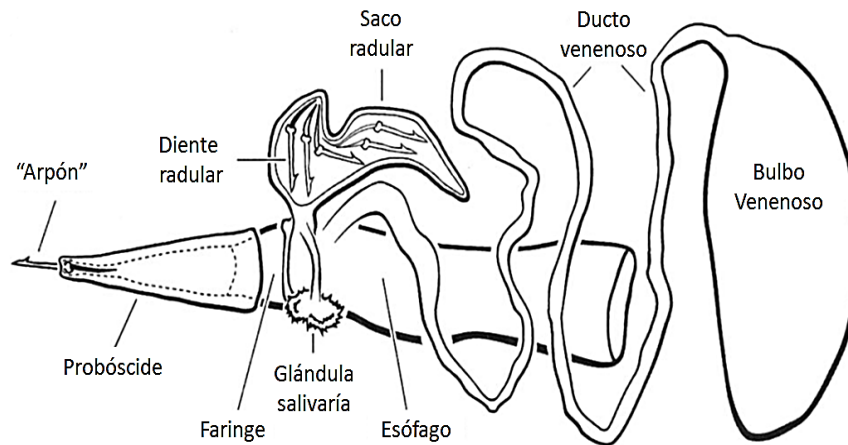


Figura 1 Diagrama del aparato venenoso de un caracol marino del género *Conus*. Editado de Norton and Olivera (2006).

Estudios realizados por Dutertre *et al.* (2014) en el caracol piscívoro *Conus geographus*, que es capaz de envenenar y producir la muerte de personas, demostraron que el veneno utilizado como defensa es producido en la parte proximal del ducto venenoso (fracción cerca del bulbo) y que está conformado principalmente de toxinas paralíticas, mientras que, en la parte distal del ducto (fracción cercana a la probóscide) se producen los péptidos en respuesta a depredación específicos, estos carecen de actividad paralítica y en su lugar producen efectos anestésicos y somníferos. En ese trabajo también se describió que el veneno de *C. geographus* producido como defensa tiene efecto en células humanas, mientras que el de depredación es específico para peces.

El veneno de los cónidos está compuesto mayoritariamente de péptidos menores a 5 kDa, a los que se clasifica en dos grupos: aquellos ricos en enlaces disulfuro conocidos como conotoxinas y péptidos que carecen de enlaces disulfuro (contulacinas, conantocinas y conoformidas) o tienen solo uno (conopresinas y contrifanos), a los que se les denomina de manera general como conopéptidos (Terlau and Olivera, 2004). Sin embargo, también existen reportes de polipéptidos con tamaño mayor a los 13 kDa (Ghomashchi, 1995), lípidos, carbohidratos y en algunos casos de moléculas pequeñas como serotonina reportada en el veneno de *C. imperialis* (McIntosh, Foderaro, Li, Ireland and Olivera, 1993) y ácido araquidónico en *C. textile* (Nakamura, Kobayashi, Ohizumi and Hirata, 1982). La dificultad por describir la composición del veneno de estos caracoles se

debe en gran medida a que cada uno produce de entre 100 a 200 péptidos bioactivos, que no se encuentran en ninguna otra de las más de 700 especies, estimando un posible repertorio de 50,000 a más de 140,000 péptidos diferentes producidos por *Conus spp* (Thapa, Espiritu, Cabalteja and Bingham, 2014).

2.1. Conotoxinas

Las conotoxinas son moléculas de origen proteico que presentan dos o más enlaces disulfuro y con una longitud que varía de 12 a 30 aminoácidos, por lo que se dice que tienen un tamaño pequeño en comparación con toxinas de 40-80 aminoácidos de otros organismos venenosos. Estas conotoxinas tienen la capacidad de reconocer y modular selectivamente un amplio rango de objetivos moleculares, en los que se incluyen canales iónicos, receptores y transportadores membranales (Norton and Olivera, 2006).

Otra característica notable de las conotoxinas, es su alto grado de modificaciones postraduccionales (MPT), entre las que se encuentran proteólisis del amino y carboxilo terminal, amidación, hidroxilación de aminoácidos (prolina, valina y lisina), carboxilación de glutamato, bromación de triptófano, epimerización (L a D- triptófano, leucina y valina), ciclación (N- terminal piroglutamato) y glucosilación (Buczek *et al.*, 2005). Estas modificaciones tienen una influencia considerable en la estructura y actividad biológica de estos péptidos, permitiendo una distinguida afinidad por sus blancos moleculares (canales iónicos en su mayoría) y una especificidad capaz de distinguir entre subtipos de receptores (Thapa *et al.*, 2014). Debido a la diversidad de las MPT presentes en los péptidos de cónidos, estos se han convertido en un modelo potencial para el entendimiento de estas modificaciones, tal es el caso de la bromación de triptófano, que fue descubierta en conotoxinas, o la carboxilación de glutamato, la cual se creía única de mamíferos (Buczek *et al.*, 2005).

Todas las conotoxinas son expresadas como precursores conocidos como “prepropéptidos”, estos se componen de una secuencia señal, “pre”, de aproximadamente 25 aminoácidos en la región N-terminal seguido de una región intermedia de 20 a 40 aminoácidos conocida como región “pro” y en el carboxilo terminal la toxina madura de entre 20 a 50 aminoácidos (Figura 2) (Olivera, 2006).

La región “pre” dirige a la proteína al retículo endoplásmico para su síntesis y maduración, mientras que la sección “pro” provee de un sitio de anclaje para las enzimas encargadas de las modificaciones postraduccionales, como la formación de enlaces disulfuro asistidos por la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la γ -carboxilación de glutamato o la O-glucosilación (Bandyopadhyay *et al.*, 1998; Buczek *et al.*, 2005; Buczek, Olivera and Bulaj, 2004; Terlau and Olivera, 2004).

Con respecto a la estructura genómica de las conotoxinas, esta incluye dos exones separados por un intrón de más de 700 pb. El exón I codifica para el péptido señal y los primeros aminoácidos de la región “pro” y en el exón 2 se encuentran las secuencias para el resto de aminoácidos del propéptido, toda la conotoxina madura y la región no traducida 3' (Figura 2). Esta estructura es probablemente la involucrada en la recombinación genética y evolución de las conotoxinas (Yuan, Han, Wang and Chi, 2007).

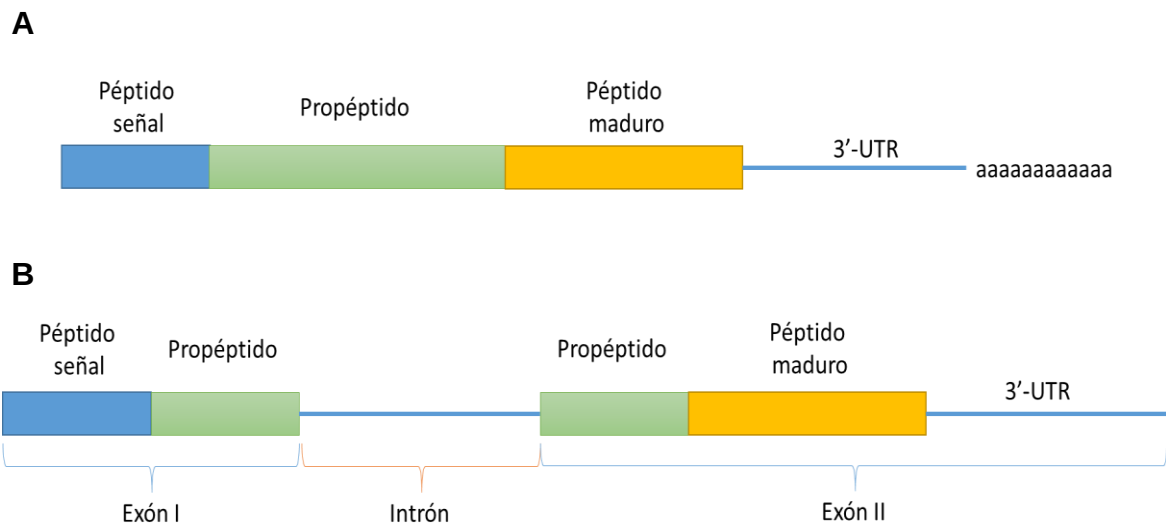


Figura 2 (A) Estructura del RNA mensajero y (B) el gen codificante para el precursor peptídico de una conotoxina. Modificado de Yuan *et al.* (2007).

La clasificación de las conotoxinas se basa en tres criterios, el primero es la agrupación por superfamilias en base a la similitud en el péptido señal presente en su transcrito (McIntosh *et al.*, 1995), el segundo se fundamenta en las diferencias en sus marcos de cisteínas y el motivo de enlaces disulfuro presentes en la toxina madura. El último criterio está relacionado con sus blancos moleculares y se le conoce como familia farmacológica (Cruz, Gray, Yoshikami and Olivera, 1985) (Figura 3).

Una base de datos especializada en la secuencia y estructura de péptidos de *Conus* es 'Conoserver'; donde a la fecha se reportan veintisiete superfamilias (A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, O1, O2, O3, P, Q, S, T, V y Y) y dentro de ellas se subdividen en grupos de acuerdo a 25 diferentes marcos de cisteínas y 11 familias farmacológicas (α , γ , δ , ε , ι , κ , μ , ρ , σ , τ , χ y ω) (Kaas, Westermann and Craik, 2010).

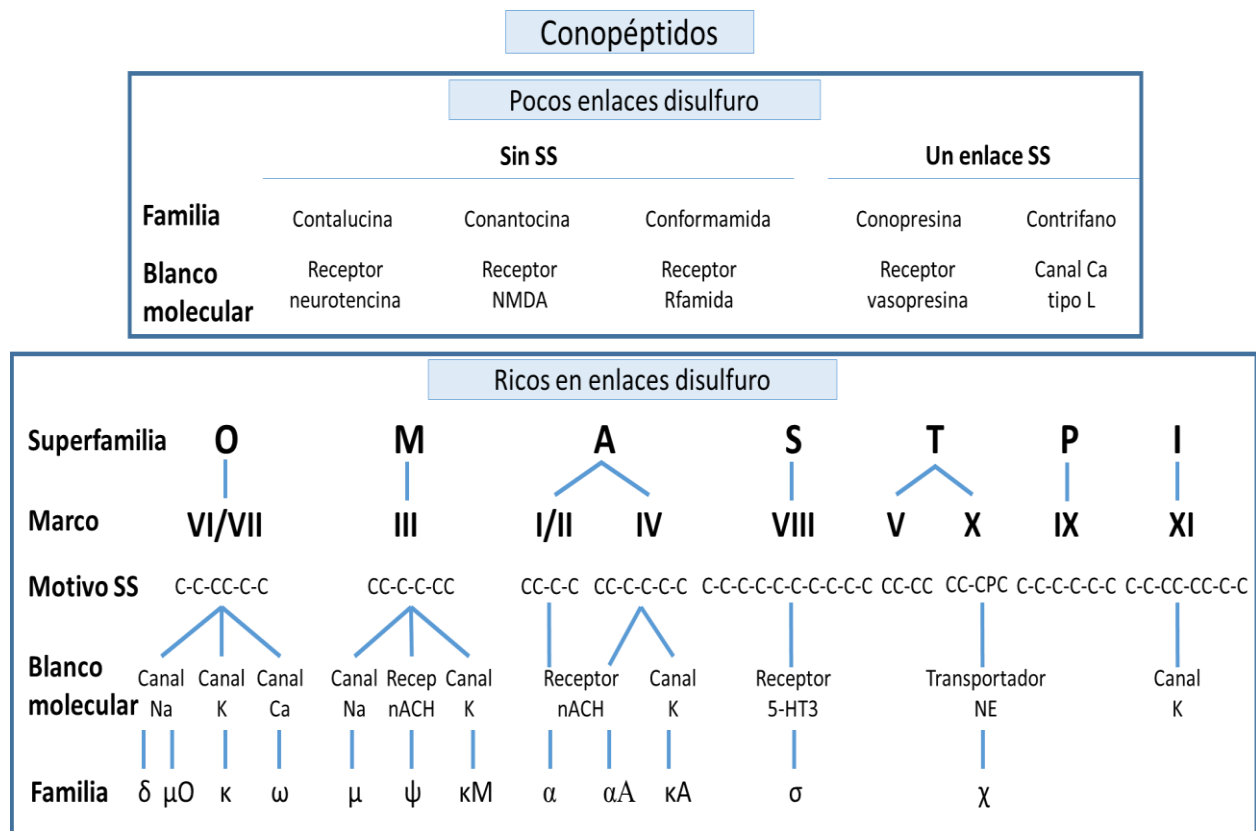


Figura 3 Diagrama que muestra la clasificación de los conopéptidos. Editado de Norton y Olivera (2006).

2.2. Blancos moleculares

Uno de los principales blancos moleculares de las conotoxinas son los canales iónicos, los cuales se pueden diferenciar en: dependientes de voltaje y dependientes de ligando. Los canales iónicos dependientes de voltaje están encargados de la generación y transducción de señales eléctricas, en este grupo se incluyen a los canales de sodio, calcio y potasio, cada uno es blanco de una familia de conotoxinas y cada familia actúa de forma diferente, tal es el caso de las μ -conotoxinas que bloquean los canales de Na, mientras que las μ O-conotoxinas inhiben su conductancia (Terlau and Olivera, 2004). Un resumen con los blancos moleculares de las conotoxinas, la familia correspondiente y ejemplos representativos se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1 Familias farmacológicas de las conotoxinas. Editado de (Kaas et al., 2010).

Familia	Blanco molecular	Toxina(s) representativa	Referencia
α (alfa)	Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)	GI	(Gray, Luque, Olivera, Barrett and Cruz, 1981)
γ (gamma)	Canales marcapasos neuronales (corriente catiónica entrante)	PnVIIA, TxVIIA	(Fainzilber <i>et al.</i> , 1998)
δ (delta)	Canales de Na dependientes de voltaje (agonistas, retraso de inactivación)	TxVIA	(Fainzilber, Gordon, Hasson, Spira and Zlotkin, 1991)
ϵ (épsilon)	canales de Ca presinápticos o receptores presinápticos acoplados a proteínas G	TxVA	(Rigby <i>et al.</i> , 1999)
i (iota)	Canales de Na dependientes de voltaje (agonistas, sin retraso de inactivación)	RXIA	(Buczek <i>et al.</i> , 2007)
κ (kappa)	Canales de K dependientes de voltaje (bloqueadores)	PVIIA	(Terlau <i>et al.</i> , 1996)
μ (mu)	Canales de Na dependientes de voltaje (antagonistas, bloqueadores)	GIIIA	(Cruz <i>et al.</i> , 1985)
ρ (rho)	Receptores adrenérgicos $\alpha 1$ (GPCR)	TIA	(Sharpe <i>et al.</i> , 2001)
σ (sigma)	Canales iónicos activados por Serotonina (GPCR)	GVIIIA	(England <i>et al.</i> , 1998)
τ (tau)	Receptor de somatostatina	CnVA	(Petrel <i>et al.</i> , 2013)
χ (chi)	Transportador neuronal de noradrenalina	MrlIA	(Sharpe <i>et al.</i> , 2001)
ω (omega)	Canales de Ca dependientes de voltaje (bloqueadores)	GVIA	(Kerr and Yoshikami, 1984)

2.2.1. Canales de calcio dependientes de voltaje

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) son los importadores de calcio más importantes en las células excitables (células musculares y neuronas). La función del calcio en estas células es regular una gran variedad de procesos, como la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la modulación de la excitabilidad de la membrana y el crecimiento de neuritas entre muchas otras (Izaguirre y Zavaleta, 1998).

La familia ω son las principales conotoxinas que presentan un efecto en los canales de calcio dependientes de voltaje encontrados en las neuronas, estos canales están descritos como los encargados de la transmisión del dolor. Por lo que estas toxinas son empleadas como potentes fármacos antinociceptivos, tal es el caso de la ω -conotoxina MVIIA conocida también como ziconotide (Prialt, Elan) (Xia *et al.*, 2006).

2.2.2. Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales de potasio dependientes de voltaje (VGPC) no solo tienen una importancia para la repolarización de la membrana, también están involucrados en mantener el potencial de membrana en reposo y su ruptura (Hille, 2001). La primera conotoxina que mostró un efecto en VGPC fue PVIIA, perteneciente a la familia de las κ -conotoxinas, otras familias de conotoxinas involucradas con canales de potasio son las κA y κM -conotoxinas (Terlau and Olivera, 2004).

2.2.3. Canales de sodio dependientes de voltaje

Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC), son los responsables de la despolarización de la membrana mediante la entrada de sodio en las células excitables, por lo que son importantes en la función del tejido cardíaco y nervioso, ya que modulan el potencial de acción en estos tejidos (Denac, Mevissen and Scholtysik, 2000).

Existen dos formas en las que las toxinas modulan la actividad de los VGSC, una de ellas es mediante el bloqueo físico del poro evitando la entrada del ion. Las familias μ y μO -conotoxinas emplean este mecanismo de acción, aunque se desconoce la interacción de las μO -conotoxinas con el canal. La otra forma es mediante la disminución o inhibición

de la inactivación, la cual es llevada a cabo por las δ -conotoxinas (Ekberg, Craik and Adams, 2008).

2.3. El estudio de las conotoxinas en México

Pese a la gran variedad de material científico generado referente a las conotoxinas aún existen muchas incógnitas que resolver, un claro ejemplo es que de los millares de péptidos presentes en el veneno de estos gasterópodos, solo unas centenas de conotoxinas han sido caracterizadas. Es por ello que centros de investigación Mexicanos, como lo son, el Instituto de Neurobiología de la UNAM, el Departamento de Inovacion Biomedica (DIB) del CICESE y el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, se han sumado a la causa, mediante la caracterización del veneno de especies que habitan en la región.

Uno de los objetivos del grupo de trabajo del Dr. Alexei F. Licea Navarro (DIB), es el de desarrollar al máximo las capacidades de aplicación biomédica que tienen las conotoxinas. Y mediante la consecuente transferencia de tecnología, a la industria farmacéutica, lograr la consolidación de estas moléculas como nuevos medicamentos.

En el DIB se han realizado diferentes proyectos de investigación sobre la caracterización y aplicación de conotoxinas, las cuales han tenido resultados prometedores. Jiménez Flores (2011) identificó diferentes conotoxinas obtenidas de *C. ximenes* y *C. regularis* con una actividad analgésica sistémica, aliviando el dolor agudo en modelos murinos. Adicionalmente, se ha evaluado el efecto de las conotoxinas en canales de calcio, potasio y TRPV1 así como del receptor de acetilcolina AChBP y diferentes líneas celulares de cáncer, entre las que se encuentra el cáncer de colon (Bernáldez Sarabia, 2008; Guillén López, 2011; Juárez Moreno, 2005; Medina Elizalde, 2012; Oroz Parra, 2011; Rubio Pitones, 2009).

En el estudio realizado por Bernáldez Sarabia (2013), se describe el aislamiento de la conotoxina cal26a de *C. californicus* con capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* del patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Esta conotoxina constituida por 32 aminoácidos, pertenece a la superfamilia –O, presenta cuatro enlaces disulfuro con un marco de

cisteínas CCC-C-CC-C-C, cuatro prolinas hidroxiladas y amidación en el carboxilo terminal (Figura 4).

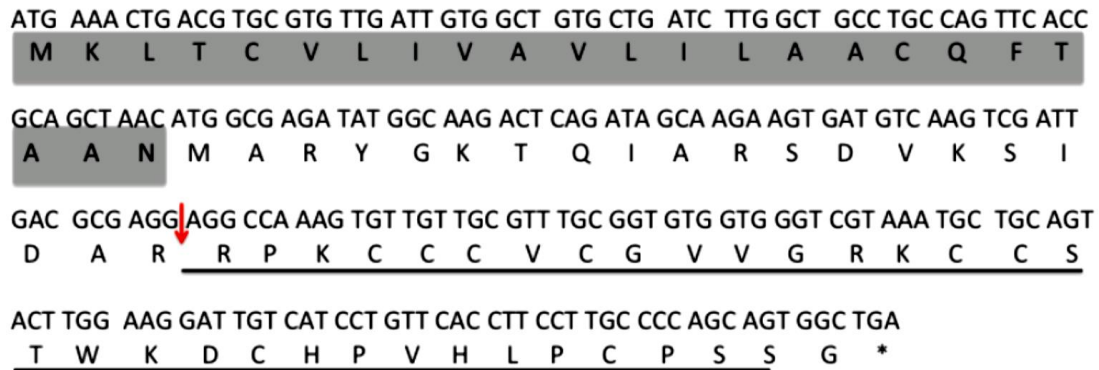


Figura 4 Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la conotoxina cal26a. Resaltado en gris se muestra la región “pre”, seguido de la región “pro” y la toxina madura se muestra subrayado, la flecha muestra el sitio de corte para la maduración. Obtenido de Bernáldez Sarabia (2013).

2.4. Aplicación farmacológica de cal26a

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad, a lo largo de su historia, y hasta el momento, continua siendo una importante causa de enfermedad y muerte, reportándose en el 2013, a nivel mundial, un estimado de 1.5 millones de defunciones y 9 millones de personas que padecen la enfermedad, de los que, el 64 % corresponde a casos nuevos (Barrios-Payán, *et al.*, 2010; OMS, 2014). Considerándose como la segunda principal causa de muerte ocasionada por un solo agente, después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Bozzano, Marras and De Maria, 2014).

Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria alcohol-acido resistente, de lento crecimiento (se duplica cada 16 a 20 h), que infecta principalmente a los pulmones. El tratamiento de la tuberculosis se basa en la administración combinada de fármacos específicos contra el patógeno, durante un periodo prolongado (6 a 12 meses). El procedimiento recomendado por la OMS incluye: isoniacida (INH), rifampicina

(RIF), etambutol (ETB) y pirazinamida (PZA) durante los primeros dos meses y posteriormente INH y RIF, hasta completar seis meses (Coll, 2009).

Este tratamiento posee una tasa de éxito del 95 %, si se completa. Sin embargo a causa de la larga duración del tratamiento, muchas personas tienden a abandonarlo, ocasionando la aparición de cepas resistentes a múltiples drogas (MDR, por sus siglas en inglés). El incremento en la resistencia de esta bacteria por INH y RIF, los antibióticos principales, ha motivado el interés científico, para el estudio de estas cepas, junto con la consecuente investigación de nuevos fármacos capaces de inhibir su crecimiento.

En 2013, Bernáldez Sarabia caracterizó bioquímica y biológicamente, a dos conotoxinas capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Rv), a las que nombró cal26a (proveniente de *Conus californicus*) y xm1a (*Conus ximenes*). Para evaluar la actividad sobre la micobacteria, se empleó un método colorimétrico, que evalúa la actividad metabólica de la bacteria, al convertir el anillo de tetrazolio del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (MTT) a formazán, ocurriendo un cambio de coloración de amarillo a púrpura, el cual es directamente proporcional con el número de células viables.

Los resultados de este ensayo mostraron que cal26a logró inhibir a la cepa H37Rv con una concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de 4.08 µg/mL, en comparación xm1b tuvo un efecto ~ 11 veces menor, con una MIC de 44.12 µg/mL. Sin embargo, debido a la dificultad por sintetizar químicamente a cal26a, su estudio quedó suspendido, colocando a xm1a como el mejor candidato para su evaluación *in vivo*, ya que esta presenta una estructura menos compleja, permitiendo su síntesis química.

Dada la complejidad que representa la síntesis química de cal26a, aunado a su potente capacidad para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*, el empleo de sistemas de expresión recombinantes, se convierten en la alternativa viable para la obtención de esta proteína en forma activa, lo que permitiría evaluar su actividad en ensayos *in vivo*, entre otros posibles estudios de caracterización bioquímica y biológica.

2.5. Conotoxinas recombinantes

Las proteínas recombinantes juegan un papel importante como herramientas en la biología celular y molecular, debido a la posibilidad de producir grandes cantidades de estas moléculas a un bajo costo, esto gracias a la capacidad de manipular genéticamente organismos como fuente de expresión (Palomares, Estrada-Mondaca and Ramírez, 2004).

La dificultad que representa obtener conotoxinas de fuentes naturales, ya que se requiere coleccionar y disectar centenares de especímenes para obtener cantidades de material suficiente para realizar diferentes estudios, surge la necesidad de utilizar otras alternativas para la obtención de este recurso de manera más sencilla, económica y con alta pureza, una vez que los péptidos nativos han sido caracterizados bioquímicamente (Becker and Terlau, 2008).

Una de las opciones empleadas para la obtención de conotoxinas, es la síntesis química con el método de Fmoc (Becker and Terlau, 2008; Buczek *et al.*, 2007; Craig *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010). La síntesis química es una estrategia rápida, automatizada y escalable, proporcionando cantidades significativas de péptidos nativos, también permite la incorporación de una gama de modificaciones postraduccionales, como aminoácidos inusuales, amidación y ciclación (Akondi *et al.*, 2014). Sin embargo, la producción de péptidos por esta vía es altamente costosa. Como ejemplo, el laboratorio de biopolímeros (UCLA, 2014) cotiza la síntesis de una proteína simple (100 μ mol) en \$60 dólares por aminoácido más \$300 dólares por uso de equipo, un péptido de 32 aminoácidos costaría \$2,220 dls, y este costo aumenta con el número de enlaces disulfuro y otras modificaciones presentes en la molécula, ya que estos reducen el rendimiento obtenido al dificultar la adición de aminoácidos y fragmentando el péptido producido (Thermo Fisher Scientific, 2015).

Pero la verdadera limitante en la producción de una conotoxina es el número de enlaces disulfuro, ya que empresas dedicadas a la síntesis química de péptidos, aunque llegan a ofrecer hasta 400 diferentes modificaciones, se restringen a un máximo de tres enlaces disulfuro (Eton Bioscience, 2015; GenScript, 2015b; GL Biochem, 2009; LifeTein, 2015;

Thermo Fisher Scientific, 2015). Por lo que péptidos como cal26a (cuatro enlaces disulfuro) requieren de otras alternativas para su obtención.

Existen diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes entre los que se encuentran, bacterias, levaduras, células de insecto, plantas o células de mamífero. Cada uno de estos sistemas tiene sus ventajas y desventajas, como su costo, rendimiento, eficiencia y posibilidad de modificaciones postraduccionales.

Escherichia coli fue el primer organismo utilizado como sistema de expresión de proteínas, pero en la actualidad está siendo remplazado por sistemas basados en células eucariotas debido, a que *E. coli* no tiene la capacidad de producir modificaciones postraduccionales, y la baja eficiencia en la formación de enlaces disulfuro (Andersen and Krummen, 2002). No obstante, *E. coli* sigue siendo uno de los principales sistemas de expresión, gracias a su bajo costo y al respaldo científico que continúa en la búsqueda de mejorar la eficiencia de expresión, generando mutantes genéticas que brinden un mejor potencial de formación de enlaces disulfuro (Baneyx, 1999).

A la fecha, se han expresado conotoxinas de diferentes géneros de *Conus* con tamaños y enlaces disulfuro que fluctúan entre 13-42 aa y 2-3 enlaces, respectivamente (Tabla 2). Para la expresión en *E. coli*, el común denominador de estos trabajos es el empleo de vectores en los que las conotoxinas se expresan como proteína de fusión, es decir, unida a otra proteína como tiorredoxina (trx) o glutatión-S-transferasa (GST), entre otras. La ventaja de utilizar una proteína de fusión es que esta puede aumentar la solubilidad y estabilidad de la proteína de interés (Esposito and Chatterjee, 2006). Aparentemente, en estos estudios la producción de proteína soluble y activa no estuvo relacionada con el vector utilizado, por lo que su elección podría ser indistinta. Xia y colaboradores (2006) describieron el procedimiento para la obtención de la conotoxina ω -MVIIA en *E. coli* (ziconotide), aun cuando el rendimiento fue bajo, el péptido tuvo actividad analgésica. Por otro lado, Bruce y colaboradores (2001) reportaron la biosíntesis de la conotoxina, con actividad insecticida, δ -TxVIA procedente de *Conus textile* en *P. pastoris*, sin embargo, cuando emplearon *E. coli* como sistema de expresión esta no fue activa. Estudios recientes describen la obtención de la conotoxina μ O-MrVIB en *E. coli* correctamente

plegada y de forma soluble mediante la inducción a bajas concentraciones de IPTG y a una temperatura de 21 °C (Gao *et al.*, 2013).

Tabla 2 Conotoxinas recombinantes expresadas en diferentes sistemas de expresión. Modificado de Gao *et al.* (2013).

Conotoxina	Origen	No. Aa, Cys	Secuencia nativa	Proteína de fusión	Célula de expresión	Rendimiento (mg/L)	Referencia
ω-MVIIA	<i>C. magus</i>	25, 6	CKGKGAKCSRLMYDCCT GSCRSGKC	TRX	<i>E. coli</i>	40	Zhan <i>et al.</i> (2003)
ω-MVIIA	<i>C. magus</i>	25, 6	CKGKGAKCSRLMYDCCT GSCRSGKC	GST	<i>E. coli</i>		Xia <i>et al.</i> (2006)
κ-Mol659	<i>C. monile</i>	13	FHGGSWYRFPWGY	Citocromo b5	<i>E. coli</i>	6-8	Kumar <i>et al.</i> (2005)
μO-I7a	<i>C. litteratus</i>	27, 6	CLGWSNYCTSHSICCSG ECILSYCDIW	TRX	<i>E. coli</i>	6	Pi <i>et al.</i> (2007)
μO-I6c	<i>C. litteratus</i>	28, 6	WPCKVAGSPCGLVSECC GTCNVLRNRCV	TRX	<i>E. coli</i>	12	Wang <i>et al.</i> (2008)
ψ-PrIIIE	<i>C. parius</i>	23, 6	AARCCTYHGSCLEKCR RKYCCG	SUMO	<i>E. coli</i>	1.5	Hernandez-Cuevas and White (2012)
ω-Vn2	<i>C. ventricosus</i>	33, 6	EDCIAVGQLCVFWNIGR PCCSGLCVFACTVKLP	GST	<i>E. coli</i>		Spiezia <i>et al.</i> (2012)
GeXIVAWT	<i>C. generalis</i>	28, 5	TCRSSGRYCRSPYDCRR RYCRRITDACV	PelB	<i>E. coli</i>	61.6	Gao <i>et al.</i> (2013)
μO-MrVIB	<i>C. marmoreus</i>	31, 6	ACSKKWEYCIVPILGFV YCCPGLICGPFVCV	PelB	<i>E. coli</i>	5.9	Gao <i>et al.</i> (2013)
δ-TxVIA	<i>C. textile</i>	27, 6	WCKQSGEMCNLLDQNC DGYCIVLVCT	Factor alfa	<i>Pichia</i>	10	Bruce <i>et al.</i> (2011)
α-M1	<i>C. magus</i>	14, 4	GRCCHPACGKNYSC	MBP	<i>E. coli</i>	0.05	Papineni <i>et al.</i> (2001)
Lt15a	<i>C. litteratus</i>	37, 8	ECTTKHRRCEKDEECCP NLECKCLTSPDCQSGYK CKP	TRX	<i>E. coli</i>	5	Wu <i>et al.</i> (2014)
im23a	<i>C. imperialis</i>	42, 6	IPYCGQTGAECYSWCIK QDLKDWCCDFVKDIRM NPPADKCP	GST	<i>E. coli</i>	10	Ye <i>et al.</i> (2012)
Lt16a	<i>C. litteratus</i>	21, 4	TGEDFLEECMGGCAFD CCKR	TRX	<i>E. coli</i>		Zhou <i>et al.</i> (2015)

Capítulo 3. Justificación

Existen tres opciones para la obtención de conotoxinas, la primera y más utilizada es la extracción y purificación de material a partir de caracoles, la segunda es por la obtención directa mediante síntesis química; y la tercera es mediante la obtención de conotoxinas recombinantes empleando diferentes sistemas de expresión. La obtención de estos péptidos de fuentes naturales se ve limitada a la dificultad de coleccionar material suficiente para su purificación. La síntesis química directa se ve afectada por el bajo rendimiento obtenido ya que es difícil de generar las condiciones para la formación de la gran cantidad de enlaces disulfuro que estas moléculas presentan, además de su alto costo de producción. Es por esto que el empleo de los diferentes sistemas de expresión recombinantes, ya sean eucariotas como procariotas, se convierte en una alternativa viable para la obtención de estas conotoxinas a bajo costo y con rendimientos más altos que los otros métodos (Gao *et al.*, 2013).

En este proyecto se plantea obtener la conotoxina cal26a recombinante activa, mediante un sistema de expresión procariota para facilitar su disponibilidad como material de trabajo, y así prescindir, en la medida de lo posible, de la colecta y manipulación de organismos vivos, mejorando la relación costo/beneficio de los productos obtenidos.

Capítulo 4. Hipótesis

Mediante la utilización de un sistema de expresión procariota con *E. coli*, es posible la expresión de conotoxinas recombinantes con propiedades efectoras similares a las que presentan las obtenidas de fuentes naturales (nativas).

Capítulo 5. Objetivo general

Producir la conotoxina recombinante cal26a de *Conus californicus* mediante un sistema de expresión procariota.

5.1. Objetivos particulares

- Generar un vector de expresión procariota que contenga el gen que codifica para el péptido maduro de cal26a.
- Estandarizar la expresión de la conotoxina cal26a recombinante en *E. coli*.
- Obtener de manera pura la conotoxina cal26a recombinante.
- Evaluar la actividad de la conotoxina cal26a recombinante en ensayos *in vitro*.

Capítulo 6. Materiales y métodos

6.1. Vector de expresión pET22b(+)

Para la producción de la conotoxina recombinante cal26a (cal26ar) en *E. coli*, se utilizó el vector de expresión pET22b(+) (Novagen). Este vector se caracteriza por presentar la secuencia señal *pelB* que dirige la proteína de interés al espacio periplásmico de la bacteria, donde se promueve su plegamiento mediante la formación de los enlaces disulfuro. Adicionalmente, presenta un promotor T7 inducible por IPTG, un origen de replicación pBR322, un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), un sitio de clonación múltiple y una secuencia específica para su purificación (etiqueta 6xHis) (Figura 5).

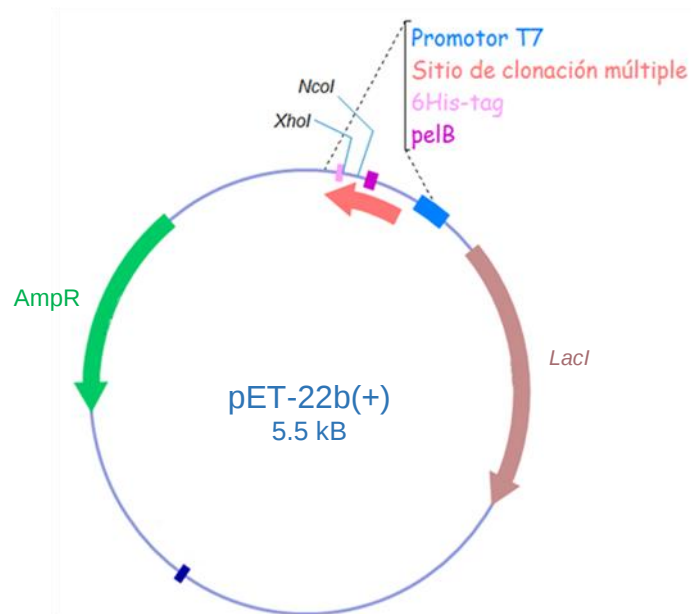


Figura 5 Mapa del vector de expresión pET-22b(+). Modificado de (Everett-Patriquin, 1998).

El vector pET-22b(+) utilizado en este trabajo fue purificado a partir de una clona de *E. coli* DH5α que contenían al vector. La clona fue sembrada en medio líquido Luria Bertani (LB) con carbenicilina (triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.5 %, carbenicilina 100 µg/ml) e incubada a 37 °C y 250 rpm por 12 h. La extracción del plásmido se realizó empleando el kit comercial Mobius 200 (Novagen) y la técnica de lisis alcalina a baja

escala (Sambrook and Russell, 2001). El plásmido purificado fue resuspendido en 50 μL de agua destilada estéril y fue evaluado en gel de agarosa (1 %), cuantificado y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su empleo posterior.

6.2. Clonación y expresión de cal26a

La secuencia del gen que codifica para la conotoxina cal26a fue obtenida mediante la técnica de amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE por sus siglas en inglés) a partir de ARN extraído del ducto venenoso del caracol *Conus californicus* (Bernáldez Sarabia 2013). Con el propósito de expresarlo de manera recombinante, los codones que codifican para el péptido maduro fueron optimizados y la secuencia resultante (TxCC-KD) fue sintetizada por la empresa GenScript (Piscataway, NJ).

Para la expresión de cal26a_r se siguieron tres estrategias en el diseño del péptido recombinante. En la primera, la etiqueta de histidinas (6xHis) se ubicó en el extremo N-terminal del péptido (His-cal26a¹), la segunda conformación se basó en la anterior, pero con la adición de una glicina en el extremo C-terminal, con lo cual quedaría lista para su potencial amidación *in vitro* (His-cal26a²). En la tercera, la etiqueta de histidinas se localizó en el extremo C-terminal del péptido (cal26a-His). Las representaciones esquemáticas de las estrategias propuestas, así como la secuencia de aminoácidos de cal26a_r como proteínas de fusión se presentan en la Figura 6.

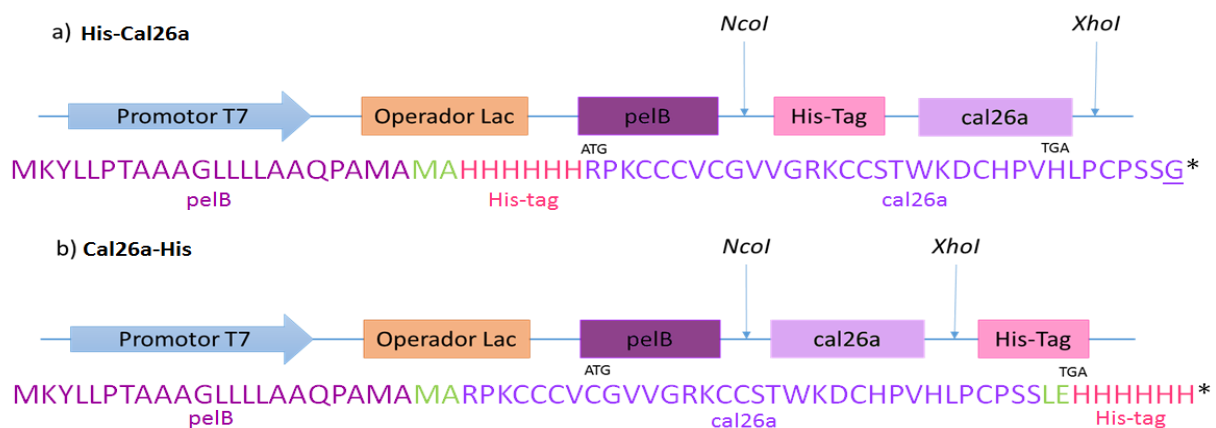


Figura 6 Construcción del gen para la expresión en *E. coli* de la conotoxina cal26a y su secuencia de aminoácidos. a) His-cal26a¹⁻², b) cal26a-His. G solo está presente en His-cal26a².

6.2.1. Construcción del plásmido recombinante

6.2.1.1. Amplificación y digestión de los fragmentos cal26a

La secuencia que codifica para el péptido maduro cal26a fue amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir del gen sintético TxCC-KD y oligonucleótidos específicos. Para cada estrategia de clonación propuesta fue necesario diseñar oligonucleótidos, los cuales incluyeron sitios de restricción para las enzimas *Nco* I y *Xho* I (Tabla 3).

Tabla 3 Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de la conotoxina cal26a. Los sitios de restricción para las enzimas *Nco* I y *Xho* I están subrayados

Nombre	Secuencia (5' - 3')
His-cal26a_{For}	CATG <u>CCATGG</u> CACACCACCACCACCACAGACCAAAATGTTGCTG
His-cal26a¹_{Rev}	CCG <u>CTCGAG</u> TCATGATGAAGGGCAAGGCAAGTGAACAGGATG
His-cal26a²_{Rev}	CCG <u>CTCGAG</u> TCAACCTGATGAAGGGCAAGGCAAGTGAACAGGATG
cal26a-His_{For}	CATG <u>CCATGG</u> CAAGACCAAAATGTTGCTGTGTCTGC
cal26a-His_{Rev}	CCG <u>CTCGAG</u> TGATGAAGGGCAAGGCAAGTGAAC

La temperatura óptima de alineamiento para cada par de oligonucleótidos se estableció mediante un gradiente de temperatura, que comprendió de 50 °C a 60 °C con incrementos de 2 °C. La reacción de PCR (25 µL) estuvo conformada de solución tampón Green GoTaq Flexi 1X, MgCl₂ 3 mM, cada nucleótido (0.2 mM), el par de oligonucleótido (0.4 µM), GoTaq DNA Flexi polimerasa (1 U) (Promega) y el gen sintético TxCC-KD (50 ng), como templado. Se incluyó como control negativo de la amplificación una reacción sin templado para cada juego de oligonucleótidos. Las condiciones de amplificación para cada ciclo térmico se describen en la Tabla 4. Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y fotodocumentados.

Tabla 4 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	50-60 Δ 2 °C	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1
Conservación	4	∞	

Una vez establecida la temperatura de alineamiento óptima para cada par de oligonucleótidos, y con el propósito de contar con material suficiente para los procedimientos subsecuentes, se realizaron seis reacciones adicionales de PCR. El total de los productos amplificados de cada fragmento fueron mezclados y purificados empleando el kit 'QIAquick PCR purification' (QIAGEN) recuperándolos en 30 μ L de agua destilada estéril. Los fragmentos purificados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa (2 %), cuantificados por espectrofotometría con un Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific) y almacenados -20 °C hasta su empleo posterior. El nombre de los fragmentos amplificados es acorde a la estrategia de expresión del péptido recombinante.

Los fragmentos purificados (His-cal26a¹, His-cal26a² y cal26a-His) fueron digeridos empleando las enzimas de restricción *Nco* I y *Xho* I (Promega) mediante una reacción de 40 μ L que contenían solución tampón de enzima de restricción 1X, BSA acetilado (4 μ g), las enzimas de restricción (10 U) y cada fragmento (~2.3 μ g). Las reacciones de digestión se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Una vez concluida, los productos de la digestión fueron purificados con el kit 'QIAquick PCR purification' (QIAGEN) recuperándolos en 30 μ L de agua destilada estéril, evaluados en un gel de agarosa (2 %) y cuantificados por espectrofotometría.

6.2.1.2. Digestión del vector pET-22b(+)

Se llevó a cabo la doble digestión del vector pET-22b(+) con las enzimas de restricción *Nco* I y *Xho* I (Promega) como se describe en el apartado 6.2.1, excepto porque esta ocasión se prepararon cuatro reacciones utilizando al vector pET-22b(+) (1.5 µg). Una vez concluida la digestión, a cada reacción se adicionó la enzima fosfatasa alcalina intestinal de ternero (1.5 U) (Fermentas) y se incubó a 37 °C durante 1 hora, lo anterior con el propósito de remover los fosfatos libres 3' y 5' generados por la digestión enzimática y evitar la recircularización del plásmido. Posteriormente el vector fue purificado mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa al 0.8 %. La banda de interés fue escindida y purificada utilizando el kit 'QIAquick Gel extraction' (QIAGEN) recuperándola en 30 µL de agua destilada estéril. Finalmente, el vector purificado fue evaluado en un gel de agarosa (2 %) y cuantificados con por espectrofotometría.

6.2.1.3. Ligación del vector pET-22b(+) con los fragmentos cal26a

La ligación de los productos de la digestión His-cal26a¹, His-cal26a², cal26a-His y pET-22b(+) se llevó a cabo mediante la enzima T4 DNA ligasa (Promega) la cual une las regiones complementarias de los sitios de corte de las enzimas de restricción. Los componentes de la reacción fueron: solución tampón de ligación 1X, T4 DNA ligasa (3 U) (Promega), vector digerido (100 ng) e inserto (~10 ng) (relación molar 1:5 (vector:inserto)) en un volumen final de 10 µL. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 12 h.

El producto de la ligación fue utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 mediante un electroporador MicroPulser (Bio-Rad Laboratories). Para lo cual 3 µL de la reacción de ligación y 50 µL de células electrocompetentes se mezclaron y transfirieron a una celda para electroporar (2mm) pre-enfriada. Las condiciones de electroporación fueron 200 Ω, 2.5 kV y 25 µF por 4 ms. Posteriormente las células fueron recuperadas con 3 mL de medio SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.05 %, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM) en un tubo cónico de 50 mL e incubadas durante 1.5 h con agitación constante (250 rpm) a 37 °C. Finalmente se sembraron 50, 100 y 200 µL de la suspensión en placas con medio LB agar 1.5 % y

carbenicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C hasta que se observaron colonias (15-18 hrs).

Las colonias obtenidas fueron resemebradas en el mismo medio selectivo y se seleccionaron cinco al azar para su análisis mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para el promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y terminador T7 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') para corroborar la presencia de los fragmentos que codifican para cal26a-His y His-cal26a¹⁻². La reacción de PCR se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto 6.1.1 excepto por el templado que en esta ocasión fue un fragmento de colonia. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C, y un ciclo final de 72 °C por 5 min. De las clonas que presentaron los respectivos insertos se seleccionaron dos y se cultivaron en 3 mL de medio LB para la purificación del plásmido mediante lisis alcalina a baja escala (Sambrook and Russell, 2001).

Los plásmidos purificados fueron evaluados por electroforesis en agarosa al 1 %, cuantificados y enviados al laboratorio Seqxcel, Inc. (San Diego, CA) para su secuenciación empleando el oligonucleótido para el promotor T7. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa CLC Main Work Bench 7 (CLC bio, QIAGEN). Una vez que se corroboró la correcta clonación de los diferentes insertos de cal26a en pET-22b(+) estos fueron nombrados: pET22b-His-cal26a¹, pET22b-His-cal26a² y pET22b-cal26a-His.

6.2.2. Transformación de *E. coli* BL21 (DE3)

A partir de los plásmidos con el inserto correctamente clonado, se eligió uno de cada construcción para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión. La transformación se realizó como se describe en el apartado anterior, excepto porque se empleó 1 µL de plásmido purificado (~600 µg). La cepa BL21 (DE3) está modificada para la expresión de proteínas recombinantes en grandes cantidades ya que al presentar el gen RNaseE mutado, permite mantener cantidades abundantes de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para su transcripción (Invitrogen, 2003). De las clonas obtenidas por electroporación se eligieron cinco para su análisis mediante PCR para corroborar la

presencia del inserto. La reacción y condiciones del PCR fueron como se describen en el punto 6.2.1.3. De las colonias que mostraron contener al vector se seleccionó una para la expresión y se crio-preservó en glicerol al 15 % (Sambrook and Russell, 2001). Las clonas resultantes fueron nombradas: BL21(D3)-pET22b-His-cal26a¹, BL21(D3)-pET22b-His-cal26a² y BL21(D3)-pET22b-cal26a-His.

6.2.3. Expresión a pequeña escala de cal26a

Con el propósito de establecer las condiciones óptimas de expresión de cal26a_r, se realizó un ensayo de inducción a pequeña escala con la cepa BL21(D3)-pET22b-cal26a-His la cual incluyó 16 tratamientos con diferentes temperaturas (21 y 37 °C), tiempo de incubación (6 y 12 h) y cantidad de IPTG adicionada (0, 10, 100 y 1000 µM) (Figura 7).

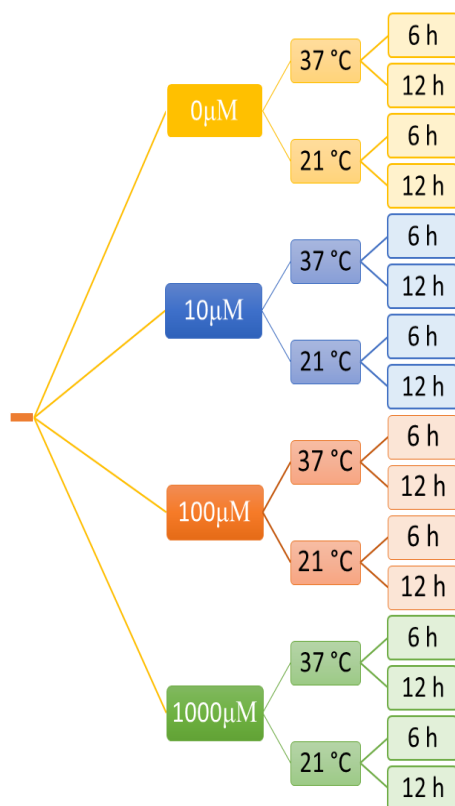


Figura 7 Tratamientos para evaluar la expresión a pequeña escala de BL21(D3)-pET22b-cal26a-His. Las condiciones evaluadas fueron temperatura (21 y 37 °C), tiempo de inducción (6 y 12 h) y concentración final de IPTG (0, 10, 100 y 1000 µM).

Para este ensayo se preparó un pre-inóculo con una colonia de la cepa BL21(D3)-pET22b-cal26a-His en 6 mL de medio LB y carbenicilina (100 µg/mL) incubado a 37 °C en agitación constante durante 12 h el cual fue transferido a 600 mL de medio LB con carbenicilina (100 µg/mL) e incubado nuevamente en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 ($\pm$ 0.1) a 600 nm. Una vez que el cultivo alcanzó la densidad óptica establecida, se repartieron 50 ml en 16 matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se procedió con la inducción de acuerdo a los tratamientos previamente establecidos. Terminado el tiempo de inducción las células de cada tratamiento fueron cosechadas por centrifugación (4,000 x *g* a 4 °C, 15 min) y almacenadas a -80 °C hasta su empleo posterior.

Para la inducción de BL21(D3)-pET22b-His-cal26a¹ y BL21(D3)-pET22b-His-cal26a², se realizó un ensayo de expresión como lo definido para cal26a-His, pero con las siguientes modificaciones: solo se evaluaron las concentraciones de IPTG 100 y 1000 µM y el inóculo para cada uno de los tratamientos fue de 25 mL en lugar de 50 mL.

6.2.4. Análisis de la expresión a pequeña escala de cal26a

Previo al análisis de la expresión de cal26a, fue necesario llevar a cabo la extracción de la proteína recombinante a partir de los botones celulares obtenidos del ensayo de inducción a pequeña escala, para lo cual se siguieron dos estrategias: en el caso de la cepa BL21(D3)-pET22b-cal26a-His fue mediante extracción periplásmica, mientras que para BL21(D3)-pET22b-His-cal26a¹ y BL21(D3)-pET22b-His-cal26a² fue lisis celular.

Para la extracción periplásmica, los botones celulares de BL21(D3)-pET22b-cal26a-His fueron descongelados en hielo y resuspendidos en 10 mL de solución de Tris-HCl 30 mM y sacarosa al 20 % a los que se adicionaron 20 µL de EDTA 0.5 M. La mezcla se incubó en hielo con agitación suave por 10 min y se centrifugó (8,000 x *g*, 4 °C, 20 min). El sobrenadante fue descartado y el botón celular resuspendido con 10 mL de MgSO₄ 5 mM e incubado nuevamente en hielo y agitación suave durante 10 min, posteriormente fue centrifugado bajo las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a un tubo cónico y al igual que el detrito celular fueron almacenados a -20 °C para su análisis posterior.

En el caso de lisis celular, los pellets se resuspendieron en 1 mL de solución que contenía Tris 1 M, EDTA 0.5 M y urea 8 M, se incubaron en hielo durante 1 hora en agitación suave y se almacenaron a -20 °C para su análisis posterior.

6.2.4.1. Electroforesis desnaturalizante en tricina (Tricina-SDS-PAGE)

Para el análisis del péptido recombinante, éste fue separado de acuerdo a su movilidad electroforética en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 16 % con dodecilsulfato sódico (SDS) y tricina (Schägger and von Jagow, 1987).

Con el propósito de concentrar las muestras de cada uno de los sobrenadantes obtenidos de la extracción periplásmica, estos fueron precipitados con ácido tricloroacético (TCA). Para ello se adicionó 150 µL de TCA al 100 % a 1 mL de muestra, se incubó a 4 °C por 20 min y se centrifugó (16,000 x g, 15 min, 4 °C). Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 200 µL de acetona fría y centrifugado nuevamente. Los pellets obtenidos fueron secados a temperatura ambiente y resuspendidos en 30 µL de solución de carga (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, β-mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0.004 %). Adicionalmente se incluyeron los detritos celulares obtenidos de la extracción, para lo cual una fracción de ellos fue resuspendida en 30 µL de la solución de carga. Estos fueron incubados por 10 min a 95 °C para la completa desnaturalización de las proteínas. Las condiciones de corrida fueron 50 mA constantes sin sobrepasar los 150 V hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzara la base del gel. Terminada la electroforesis el gel fue teñido con azul de coomassie G-250 de acuerdo a lo descrito por Candiano *et al.* (2004).

Para el caso de BL21(D3)-pET22b-His-cal26a¹ y BL21(D3)-pET22b-His-cal26a² donde la muestra fue obtenida por lisis celular con urea 8M, se analizaron 20 µL los cuales fueron mezclados con un volumen igual de solución de carga y se prosiguió con la electroforesis de acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior.

6.2.4.2. Inmunodetección

La presencia de la cal26a_r fue confirmada utilizando la técnica de western blot, para lo cual un gel de acrilamida, preparado de acuerdo a lo descrito anteriormente, fue transferido a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 µm (Bio-Rad Laboratories) mediante la técnica de transferencia semiseca (Harlow and Lane, 1988) en la que se utilizó una cámara de electrotransferencia Semi-Dry Electroblotter (CLP) y solución Towbin 1x (tris base 250 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % (v/v), pH 8.3). Las condiciones de transferencia fueron 200 mA sin exceder de 20 V durante 1 h. Una vez concluida la transferencia, la membrana fue lavada con PBST (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM y Tween-20 0.05 %, pH 7.4) e incubada con agitación en una solución de 5 % de leche descremada en PBST a temperatura ambiente por dos horas. Posteriormente la membrana se enjuagó con PBST para eliminar los restos de leche y se incubó con agitación dos horas con el anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa de rábano (Roche®) diluido a una concentración de 100 mU en una solución de leche al 1 % en PBST, finalmente se hicieron cinco lavados con PBST de 5 min cada uno. La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia, utilizando el sustrato Fast Western Kit, SuperSignal West Pico (Pierce), el fotodocumentador ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories) y el software Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories).

6.3. Clonación y expresión de cal26a con sitio de proteólisis

Para la clonación y expresión de cal26a con sitio de proteólisis, se diseñó un péptido recombinante con la etiqueta de histidinas en el lado amino-terminal pero con la inserción de un sitio de proteólisis para la enzima enteropeptidasa entre la etiqueta de histidinas y el inicio de la conotoxina. El propósito de incluir el sitio de proteólisis fue eliminar mediante la digestión enzimática los aminoácidos adicionales correspondientes a la secuencia señal *pe/B*. Con respecto al extremo carboxilo-terminal, se manejaron dos versiones sin glicina (His-SP-cal26a¹) y con glicina (His-SP-cal26a²) para su potencial amidación *in vitro* (Figura 8).

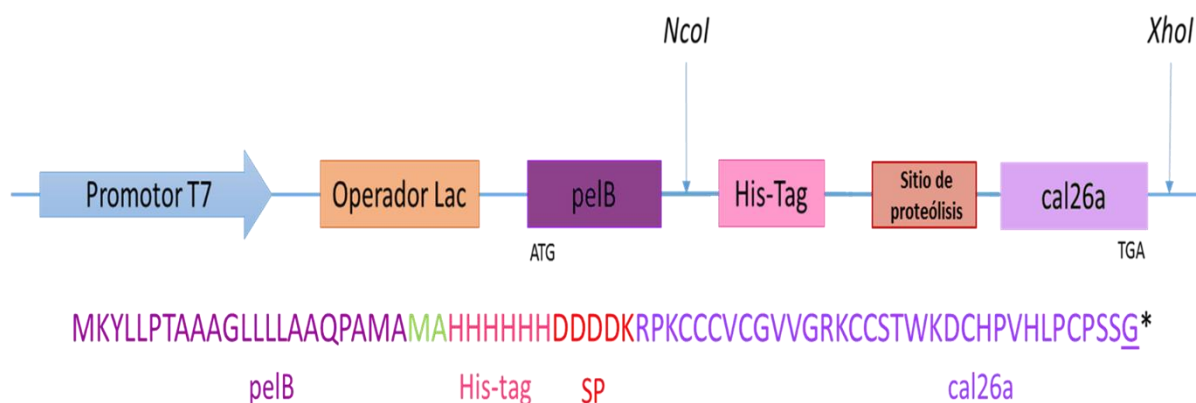


Figura 8 Construcción y secuencia de aminoácidos del gen para la expresión en *E. coli* de la conotoxina cal26a con sitio de proteólisis. G solo está presente en His-SP-cal26a².

Para la amplificación de los dos fragmentos se diseñó un nuevo oligonucleótido sentido (5'-CATGCCATGGCACACCACCACCACCACGACGACGACGACAAGAGACCAAAATGTTGCTG-3') que incluyera la secuencia que codifica para el sitio de proteólisis (subrayado) y como oligonucleótidos anti-sentido se utilizaron los mismos que los diseñados para las construcciones His-cal26a.

El detalle de la clonación de los fragmentos His-SP-cal26a¹⁻² así como su posterior inducción a pequeña escala se describen en el apartado 6.2. Los insertos y el vector pET-22b(+) fueron digeridos con las enzimas *Nco* I y *Xho* I, ligados mediante la enzima T4 DNA ligasa y posteriormente el producto de esta última utilizado para transformar células de *E. coli* TOP10. Las colonias obtenidas se evaluaron por PCR con los oligonucleótidos específicos para el promotor y terminador T7 (sentido y anti-sentido, respectivamente), se purificó el plásmido de las colonias que mostraran tener el tamaño de fragmento esperado y el producto de PCR fue enviado para su secuenciación.

Una vez que se corroboró que las construcciones estaban en marco correcto de lectura, células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los vectores pET22b-His-SP-cal26a¹⁻² para su expresión basados en lo descrito en el apartado 6.2.3. Las condiciones evaluadas fueron: 10, 100 y 1000 μ M de IPTG a 37 y 21 °C durante 12 h.

Concluida la inducción, los cultivos fueron transferidos a un tubo cónico de 50 mL y centrifugado a $4,000 \times g$ durante 20 min a 4°C , los pellets obtenidos se lisaron con Tris 1 M, EDTA 0.5 M y urea 8 M. El análisis de expresión se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.2.4.

6.4. Purificación por cromatografía de afinidad a metales de la proteína recombinante cal26a-His.

Con el objetivo de purificar la proteína recombinante cal26a-His, se utilizó la metodología de cromatografía por afinidad a metales inmovilizados (IMAC) utilizando la resina de Agarosa Ni-NTA (QIAGEN) la cual tiene afinidad por los anillos de imidazol que conforman a las histidinas presentes en la conotoxina recombinante. Para el ensayo 1 mL de resina fue transferido a una columna de plástico con capacidad de 10 mL y se procedió a su preparación como lo describe el fabricante.

6.4.1. Purificación en condiciones nativas

La purificación en condiciones nativas se llevó a cabo a partir de los sobrenadantes obtenidos de la extracción periplásmica en los que se corroboró la presencia de la proteína recombinante (cal26a-His), a los cuales se les adicionó imidazol a una concentración final de 20 mM y se ajustó el pH a 8. Previo equilibrio de la columna con 15 mL de solución de equilibrio (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, pH 8.0). Posteriormente fue lavada con 20 mL de solución de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 50 mM, pH 8.) y la proteína eluída con 500 μL de una solución que contenía NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 50 mM a pH 8, con incubación de 5 min antes de ser colectada en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL. Este proceso se realizó cinco veces nombrando a cada una de ellas en números secuenciales. Las eluciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.2.4.

6.4.2. Purificación en condiciones desnaturalizantes

En la purificación de la proteína recombinante en condiciones desnaturalizantes se empleó el precipitado celular generado en la extracción periplásmica de cal26a-His. Los pellets fueron resuspendidos en 3 mL de solución de equilibrado desnaturalizante (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y urea 8 M, pH 8.0) e incubados con agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó (10,000 x *g*, 30 min, temperatura ambiente), el sobrenadante se transfirió en un tubo y se centrifugó nuevamente (14,000 x *g*, 10 min) con el objetivo de sedimentar los agregados insolubles.

Una columna que contenía un mililitro de resina agarosa NI-NTA fue equilibrada previamente con 2 mL de solución de equilibrado desnaturalizante. Posteriormente, para eliminar restos celulares que pudieran bloquear la columna, el sobrenadante se filtró empleando una membrana de 0.2 μm y se dejó pasar a través de la columna por gravedad dos veces. La columna se lavó con 8 mL de solución de lavado desnaturalizante (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y urea 8 M, pH 6.3) y se realizaron cuatro eluciones de 500 μL con solución de elución desnaturalizante (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y urea 8 M, pH 5.9), cada elución fue colectada en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL. Las cuales fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección como se describe en los apartados 6.2.4.1 y 6.2.4.2 respectivamente.

6.4.3. Aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión

Debido a que la muestra obtenida en la purificación desnaturalizante (apartado 6.4.2) presentó una gran cantidad de impurezas, se optó por aislar los agregados citoplasmáticos de proteína recombinante, conocidos como cuerpos de inclusión, para su posterior solubilización en urea y purificación mediante IMAC en condiciones desnaturalizantes de acuerdo a lo descrito por Macherey-Nagel (2013).

En esta estrategia se utilizó un 1 L de cultivo de BL21(D3)-pET22b-cal26a-His inducido en las condiciones óptimas establecidas (1000 μM de IPTG a 21 °C durante 12 h), el cual fue centrifugado (4,000 x *g*, 20 min, 4 °C) en 10 tubos cónicos de 50 mL para obtener el pellet correspondiente a 100 mL de cultivo en cada uno.

El pellet celular fue resuspendido en 5 mL de solución de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM, pH 8.0) y 5 mg de lisozima (Sigma-Aldrich), se incubó en hielo durante 30 min con agitación suave y se sonicó empleando un sonicador q125 (Qsonica) con una punta de 2 mm. Las condiciones empleadas fueron diez ciclos con periodos de 15 s encendido y 15 s apagado a una amplitud del 70 %.

El lisado se centrifugó ($10,000 \times g$, 30 min y 4°C), se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 10 mL de solución de lisis. El pellet fue resuspendido en 2 mL de solución de desnaturalización (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM y urea 8 M, pH 8.0) e incubado en hielo durante 1 h con agitación suave, posteriormente se centrifugó a $10,000 \times g$ por 30 min a 20°C , se transfirió el sobrenadante a un tubo cónico, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente se filtró empleando una membrana de $0.2 \mu\text{m}$ para eliminar restos insolubles.

El sobrenadante fue cargado a una columna de Ni-NTA, previamente equilibrada con solución de desnaturalización. Se realizó un lavado de 20 mL con una solución que contenía NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y urea 8 M a pH 8.0, se realizaron 5 eluciones de 500 μL con NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM y urea 8 M, pH 8.0, las cuales se colectaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.

Con el propósito de mejorar la pureza de la proteína recombinante purificada, se hicieron cambios en las condiciones de lavado, por un lado se aumentó el volumen de solución de lavado de 20 mL a 40 mL y por otra parte se incrementó la concentración de imidazol de 20 mM a 50mM de la misma solución. Para verificar el mejor tratamiento las eluciones se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie (6.2.4.1) y se confirmó por inmunodetección (6.2.4.2).

Seleccionada la mejor condición, se procedió a purificar el resto del producto inducido (700 mL), 100 mL de pellet a la vez para evitar sobrecargar la columna de proteína recombinante. Se mezclaron cada una de las eluciones correspondientes (~ 5 ml) y se analizaron por electroforesis e inmunodetección.

6.5. Renaturalización de la proteína recombinante cal26a-His

Con el objetivo de replegar la proteína mediante la formación de los enlaces disulfuro se utilizó el método de renaturalización en columna empleando las soluciones de renaturalización Tris-HCl 20 mM a pH 8.0 y Tris-HCl adicionado con glicina 10 mM a pH 8.0, descritos por Gao *et al.* (2013).

Previo a la renaturalización, se mezclaron las eluciones obtenidas de la purificación de la proteína recombinante cal26a-His a partir de los cuerpos de inclusión y se dializaron contra agua para eliminar las sales presentes en la solución de elución. Se utilizó la membrana SnakeSkin (Thermo Scientific™) con un corte de 3.5 kDa y se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Una vez dializada y previo a su repliegue la proteína se desnaturalizó completamente con una solución que contenía DTT 10 mM, urea 8 M y Tris-HCl 20 mM a pH 8.0, incubándose con agitación suave en hielo durante 1 h. La muestra fue pasada por gravedad dos veces a través de una columna de Ni-NTA previamente equilibrada con 10 mL de solución de equilibrio desnaturalizante (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM y urea 8 M, pH 8.0) y se lavó con 10 mL de solución de lavado desnaturalizante (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y urea 8 M, pH 8.0). Para su replegado se realizaron 6 lavados con la solución de renaturalización en los que se fue reduciendo gradualmente la concentración de urea (6, 5, 4, 3, 2, 1 M) hasta terminar en un último lavado sin el desnaturalizante, finalmente se realizaron cinco eluciones nativas de 500 μL (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 250 mM, pH 8.0) con un tiempo de incubación de 5 min previo a su colecta. Por último se realizaron dos eluciones desnaturalizantes de 1 mL (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM y urea 8 M, pH 8.0) para obtener a las proteínas que permanecieron insolubles. Las eluciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie e inmunodetección tal y como se describe en el apartado 6.2.4.

La concentración de la proteína presente en las eluciones fue determinada mediante el método de ácido bicinconínico empleando Micro-BCA (Thermo Scientific™) (ver A 4) previa diálisis de las mismas contra PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 8.0), y a las que se nombró posteriormente como: a) cal26a-1, a la muestra procedente de la renaturalización con Tris-HCl, y b) cal26a-2, a la renaturalizada con Tris-HCl y glicina.

6.6. Ensayo de actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*

Debido a que la conotoxina cal26a nativa tiene la capacidad de inhibir la viabilidad celular de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, se evaluó si la conotoxina recombinante purificada previamente cal26a-His presentaba dicha actividad. Se realizó un ensayo colorimétrico en el que se determinó la actividad celular mediante el cambio de coloración de una solución reveladora al reaccionar con las condiciones reductoras generadas por la actividad celular, por lo que sólo las bacterias que se encuentren vivas podrán generar el cambio de coloración (Porras et al, 2005).

Se evaluó el efecto de cal26a-His en las siguientes condiciones, 2.5 µg/mL para la muestra cal26a-1 y cal26a-2 en concentraciones de 2.5 y 8 µg/mL. Para cada una se emplearon cuatro pozos a los que se agregaron 50 µL de medio, 100 µL de suspensión bacilar y 50 µL de la proteína recombinante a la concentración requerida. Debido a que la proteína recombinante fue dializada previamente contra PBS 1X, a cuatro pozos se les agregó 50 µL de PBS 1X, 50 µL de medio y 100 µL de suspensión bacilar, para evaluar el efecto de esta solución sobre la micobacteria. Debido al crecimiento lento que presenta la bacteria, cinco pozos se emplearon como control de crecimiento (7, 9, 11, 13 y 15 días), a los cuales se agregaron 100 µL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y 100 µL de una suspensión de *M. tuberculosis* H37Rv (1.5×10^7 células/ml); como control de esterilidad, a un pozo se adicionaron 100 µL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido y como control de inhibición se empleó isoniácida (1 µg/mL). A los pozos de la periferia de la placa de 96 pozos se les agregó 100 µL agua destilada estéril para evitar la evaporación de la muestra. El esquema de la distribución de la placa de este ensayo se muestra en la Figura 9.

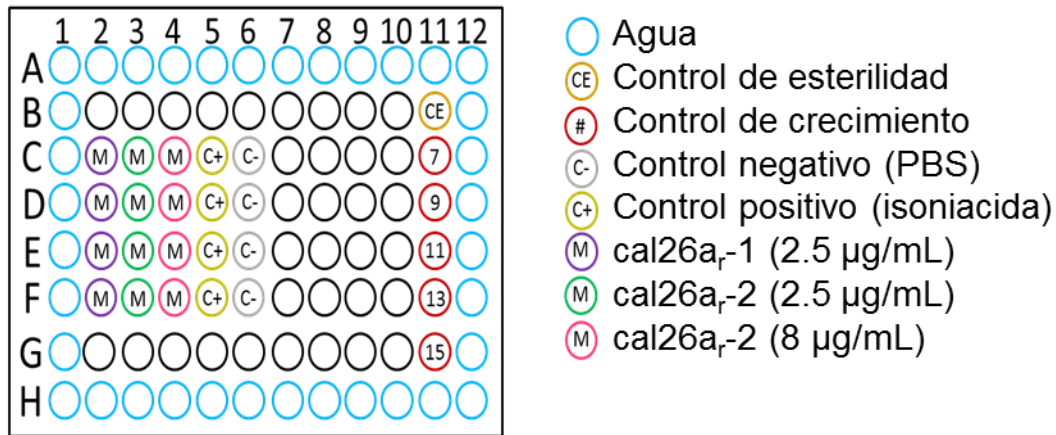


Figura 9 Esquema de la distribución del ensayo en microplaca de 96 pozos, para evaluar la actividad de cal26a-His recombinante sobre *M. tuberculosis*.

Una vez que se montó el ensayo, la placa se incubó a 37 °C, hasta su revelado para lo cual se utilizó el reactivo MTS (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) de la marca Promega. A los 7 días de incubación, el primer pozo control de crecimiento fue revelado adicionando 20 µL de MTS (5 mg/L) e incubado 2 h, si se presenta un cambio de coloración se procede a revelar el resto de los pozos, si no es visible un cambio de coloración, el revelado se pospone durante dos días en los que se revela el siguiente pozo control de crecimiento, hasta que alguno de un cambio de coloración. Con esto se determina cual es el día óptimo de crecimiento celular para garantizar un resultado fiable.

Capítulo 7. Resultados

7.1. Construcción del plásmido pET22b-cal26a

El plásmido pET-22b(+) fue purificado de células de *E. coli* DH5 α -pET22b mediante lisis alcalina a baja escala, al que se nombró como 'pET 1', mientras que los plásmidos obtenidos con el kit comercial Mobius 200 (Novagen) se nombraron como 'pET 2 y pET 3', respectivamente. Posteriormente 3 μ L de cada plásmido purificado fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8 %, para evaluar su integridad.

En la Figura 10, se muestra la electroforesis de los plásmidos purificados, donde se observan bandas con una mayor intensidad para los purificados con kit (carriles 2 y 3), siendo pET 2 (carril 2) el de mayor intensidad, sugiriendo la mayor concentración. Las tres bandas presentes en cada muestra corresponden (en orden superior a inferior) a la versión relajada, linealizada y superenrollada del plásmido.

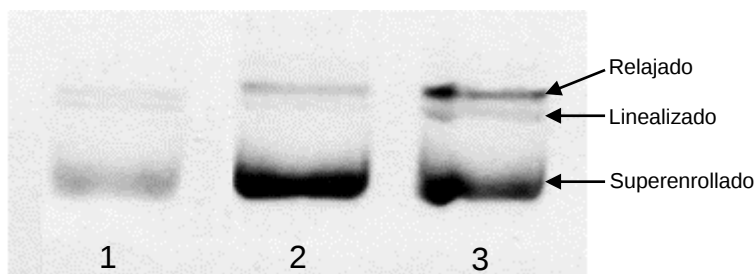


Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del plásmido pET-22b(+) purificado. En la imagen de izquierda a derecha se muestran los plásmidos purificados pET 1, pET 2 y pET 3.

La concentración y pureza de cada plásmido purificado fue analizada por espectrofotometría y los resultados se muestran en la Tabla 5. Si bien 'pET 1' presentó la mayor concentración, se seleccionó el plásmido 'pET 2' obtenido con el kit Mobius 200 para el procedimiento de clonación posterior. Lo anterior debido a que presentó el mayor rendimiento y una alta pureza.

Tabla 5 Cuantificación del vector pET-22b(+) a 260 nm.

	ng/ μ L	A260	A260/A280	Rendimiento
pET 1	1747.7	34.955	0.40	5.8 μ g/mL
pET 2	449.7	8.994	1.89	642 ng/mL
pET 3	298.4	5.968	1.86	426 ng/mL

7.1.1. Amplificación de los fragmentos cal26a

La temperatura óptima de alineamiento para la amplificación de los fragmentos cal26a, en sus diferentes versiones se determinó mediante un PCR en gradiente y los fragmentos amplificados evaluados por electroforesis en agarosa al 2 %. El tamaño de bandas observadas correspondió con el tamaño teórico esperado para cada fragmento, siendo de 135-138 pb para His-cal26a¹⁻² y de 117 pb para cal26-His. En la Figura 11 se presenta el análisis electroforético donde se observa el tamaño de las bandas así como la ausencia de bandas adicionales que evidenciarían inespecificidad de los oligonucleótidos.

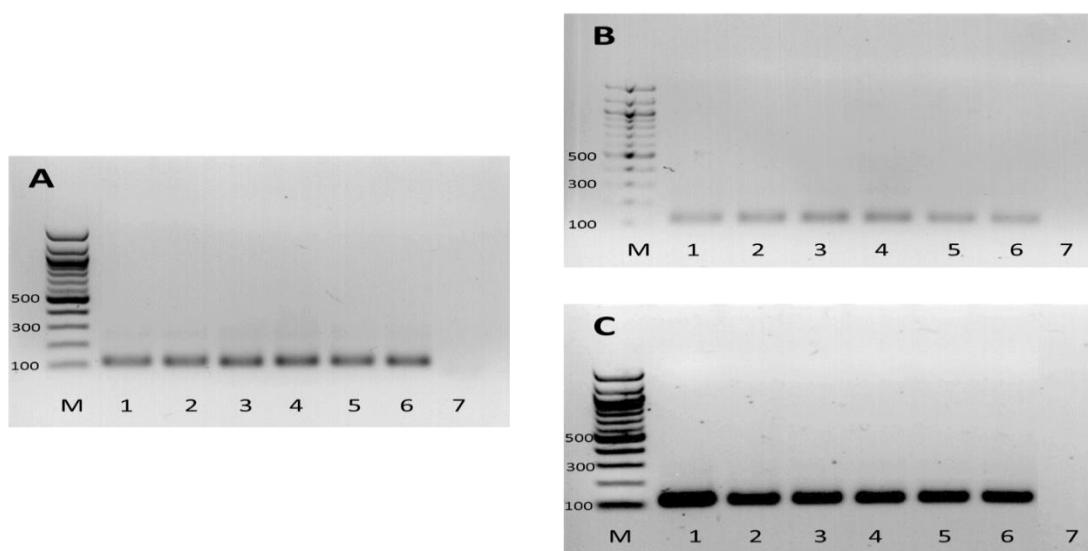


Figura 11 Análisis electroforético de la temperatura de alineamiento óptima para cada par de oligonucleótidos. M marcador molecular de 100 pb (NEB), los carriles 1-6 corresponden a las diferentes temperaturas de alineamiento (50, 52, 54, 56, 58 y 60 °C) respectivamente y el carril 7 corresponde al control negativo. A) His-cal26a¹ B) His-cal26a² y C) cal26a-His.

Tomando en cuenta que la intensidad de las bandas fue similar a todo lo largo del gradiente en los tres casos, se sugiere que cualquiera de las temperaturas de alineamiento es adecuada para amplificar los fragmentos, sin embargo se decidió utilizar la temperatura intermedia (55 °C) como la óptima para posteriores amplificaciones.

7.1.2. Digestión y ligación de pET-22b(+) y cal26a

Se realizó una doble digestión del vector pET-22b(+) y los fragmentos His-cal26a¹⁻² y cal26-His empleando las enzimas *Nco* I y *Xho* I, los productos se purificaron y cuantificaron, obteniendo un rendimiento de recuperación de 74.6 % para el vector pET-22b(+), 72.8 % y 67.6 % para His-cal26a¹⁻² y 52.5 % para cal26a-His (Tabla 6). A pesar de la pérdida registrada, la cantidad de material purificado fue suficiente para proceder con la ligación de los mismos.

Tabla 6 *Análisis espectrofotométrico de los fragmentos purificados antes y después de su digestión.*

	Sin Digerir		Digerido	
	ng/μL	A260/A280	ng/μL	A260/A280
His-cal26a ¹	91.7	1.75	66.8	1.79
His-cal26a ²	78.2	1.88	52.9	1.76
cal26a-His	61.3	1.85	32.2	1.81
pET-22b(+)	449.7	1.89	37.3	1.83

La integridad de los productos de la digestión fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (Figura 12). A partir de este análisis se determinó que la digestión del vector pET-22b(+) (carril 2) fue completa ya que no se observó la presencia de bandas adicionales correspondientes a las tres conformaciones como en la versión sin digerir (carril 1). En ninguna de las muestras se observó indicios de degradación.

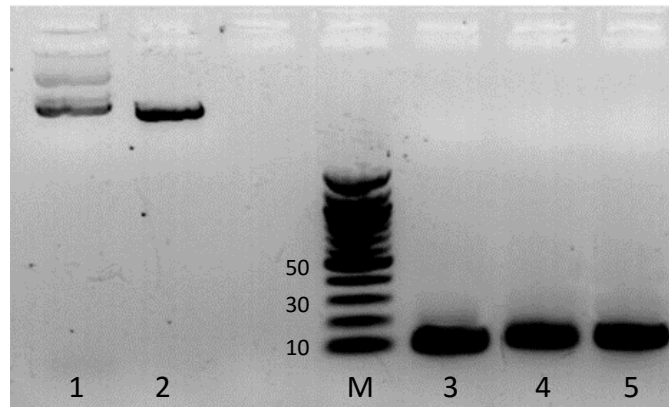


Figura 12 Análisis electroforético en gel de agarosa de los productos de digestión purificados. Se muestra al vector pET-22b(+) antes y después de la digestión (carriles 1 y 2), marcador molecular de 100 pb (NEB) (M) y los fragmentos cal26a-His y His-cal26a¹⁻² (carriles 3 al 5).

7.1.3. Transformación del producto de ligación

Con los productos de digestión se prepararon las reacciones de ligación correspondientes a las tres construcciones (pET22b-His-cal26a¹⁻² y pET22b-cal26a-His) con las cuales se transformaron células de *E. coli* TOP10. Como resultado de la transformación se obtuvieron 8 colonias para pET22b-His-cal26a¹ (TOP10-pET22b-His-cal26a¹), 20 colonias para pET22b-His-cal26a² (TOP10-pET22b-His-cal26a²) y 35 colonias para pET22b-cal26a-His (TOP10-pET22b-cal26a-His). Cinco colonias de cada construcción fueron analizadas mediante PCR y evaluadas en un gel de agarosa al 2 %, el tamaño de banda esperado para el vector sin inserto fue de 305 pb, mientras que para pET22b-His-cal26a¹⁻² fue de 370-373 pb y para pET22b-cal26a-His de 330 pb (Figura 13).

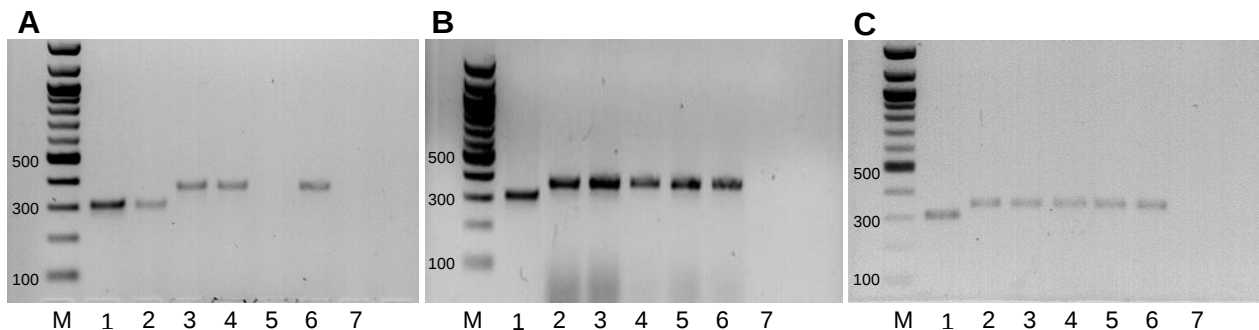


Figura 13 Análisis electroforético de las colonias evaluadas mediante PCR correspondientes a las tres construcciones. En el carril 1 se muestra el amplificado de pET-22b(+) sin inserto, en los carriles 2 a 6 las cinco colonias evaluadas y en M se usó el marcador molecular de 100 pb (NEB®). A) Top10-pET22b-His-cal26a¹ B) Top10-pET22b-His-cal26a² y C) Top10-pET22b-cal26a-His.

Para el caso de la construcción pET22b-His-cal26a¹, sólo 3 colonias presentaron el fragmento del tamaño esperado, mientras que para pET22b-His-cal26a² y pET22b-cal26a-His todas las clonas analizadas presentaron el fragmento esperado. Cabe mencionar en el caso de la construcción pET22b-His-cal26a¹, dos clonas no amplificaron y otra presentó una banda similar a la del vector sin inserto (Figura 13-A carril 2) el cual pudiera ser remanente de plásmido no digerido. De las clonas que presentaron el tamaño esperado, se seleccionaron dos de cada construcción, se purificó su plásmido mediante lisis alcalina y se secuenciaron con el oligonucleótido para el promotor T7. El análisis de las secuencias corroboró que el inserto correspondiente a la conotoxina en sus tres versiones, no presentó ningún cambio en su secuencia nucleotídica y que se encontraba en fase para su expresión (Figura 14).

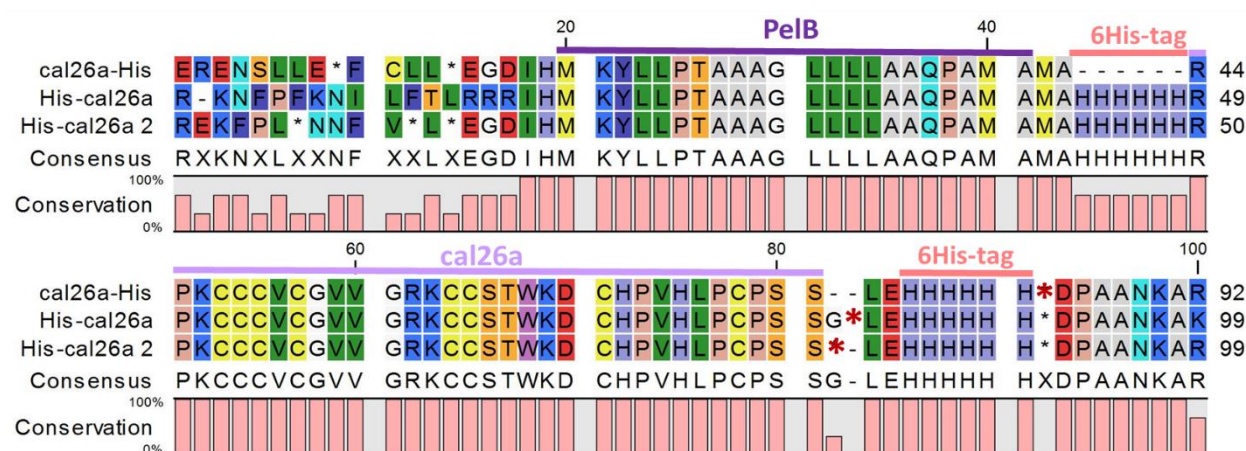


Figura 14 Análisis de secuencias traducidas de los plásmidos pET22b-His-cal26a¹, pET22b-His-cal26a² y pET22b-cal26a-His. En asterisco (*) se representan los codones de paro.

7.1.4. Transformación de *E. coli* BL21 (DE3)

Células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con las respectivas construcciones (pET22b-His-cal26a¹, pET22b-His-cal26a² y pET22b-cal26a-His) previamente confirmadas por secuenciación. De las clonas transformadas obtenidas se eligieron dos de cada construcción para su análisis por PCR. El análisis electroforético evidenció la presencia de una banda del tamaño esperado en todas las colonias analizadas, lo cual confirma la correcta transformación con los respectivos plásmidos (Figura 15).

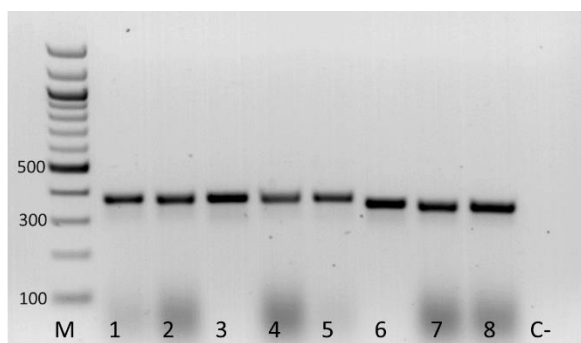


Figura 15 Electroforesis del PCR de colonia de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los respectivos plásmidos recombinantes. Carriles 1 y 2, pET22b-His-cal26a¹. Carriles 4 y 5, pET22b-His-cal26a². Carriles 7 y 8, pET22b-cal26a-His. Carriles 3 y 6 corresponden a la amplificación de los vectores pET22b-His-cal26a y pET2b-cal26a-His. M marcador molecular de 100 pb (NEB).

7.2. Análisis de la expresión a pequeña escala de cal26a

7.2.1. Electroforesis desnaturalizantes en tricina (Tricina-SDS-PAGE)

Con el objetivo de evaluar la expresión a pequeña escala de la proteína recombinante cal26a-His, los extractos periplásmicos, así como los detritos celulares, fueron analizados mediante geles de poliacrilamida al 16 % los cuales se tiñeron con azul de coomassie G250.

La Figura 16 muestra el análisis por electroforesis para las inducciones realizadas con 0, 10 y 1000 μ M de IPTG, en las dos diferentes temperaturas de expresión (21 y 37 °C) y tiempos de incubación (6 y 12 h). Aunque este análisis corroboró que la extracción de proteína a partir del periplasma fue exitosa, no permitió determinar si se logró expresar a la conotoxina recombinante, debido a que no se logró diferenciar una banda distintiva del tamaño esperado (4.76 kDa).

Si bien en los geles de la inducción a 10 y 1000 μ M de IPTG se observaron bandas de un recorrido electroforético menor a 10 kDa, estas son semejantes a las mostradas en el gel correspondiente a 0 μ M de IPTG, el cual la expresión de la proteína fue mínima considerándose como control negativo de inducción.

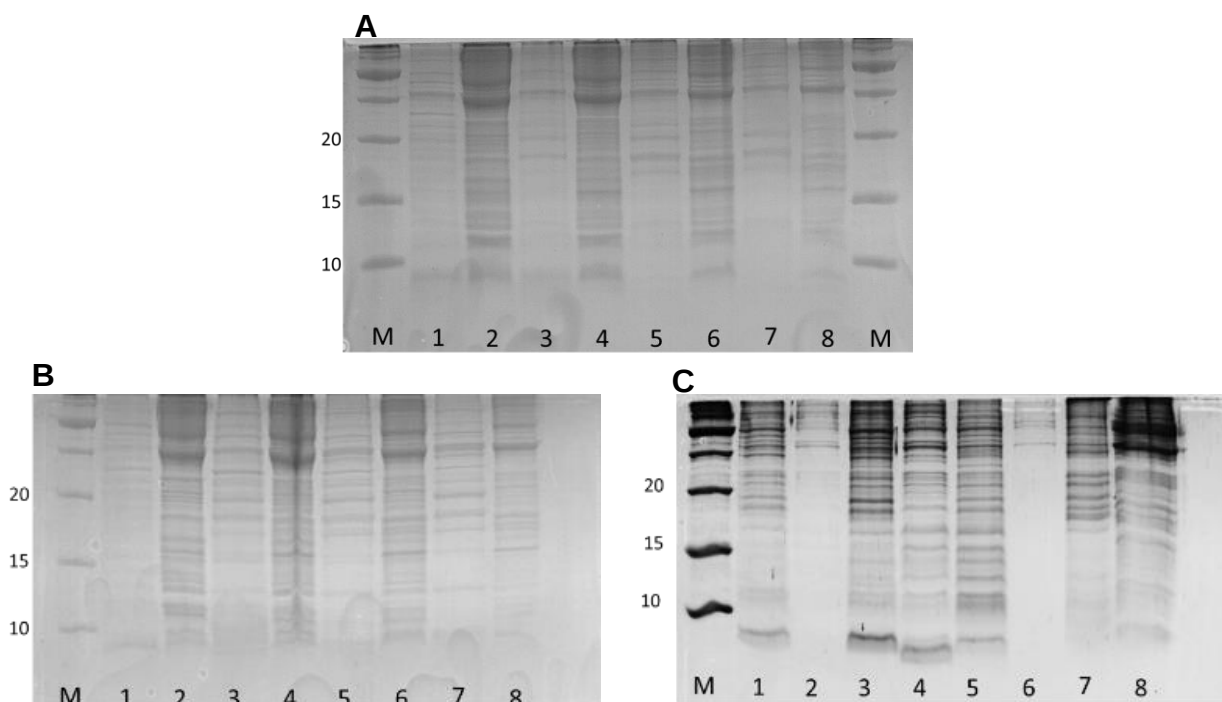


Figura 16 Análisis electroforético de BL21(DE3)-pET22b-cal26a-His con 0, 10 y 1000 μ M de IPTG (A, B y C respectivamente), en las dos diferentes temperaturas de expresión (21 y 37 °C) y tiempos de incubación (6 y 12 h), carril 1 y 2 sobrenadante y pellet inducidos a 21 °C durante 6h, carril 3 y 4 a 21 °C y 12h, carril 5 y 6 a 37 °C y 6h, carril 7 y 8 a 37 °C y 12h. M marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

7.2.2. Inmunodetección

A partir de los resultados obtenidos de la electroforesis (Tricina-SDS-PAGE) se eligieron muestras representativas para su análisis de inmunodetección (Figura 17). Este análisis detectó la presencia de dos bandas intensas de alrededor de los 10 kDa en la fracción celular (carriles 7 y 9 de ambas ilustraciones) y dos bandas muy tenues en los carriles correspondientes a los sobrenadantes (carriles 6 y 8). La presencia de esta banda evidenció la expresión de la conotoxina recombinante cal26a-His en las condiciones 21 °C, 1000 μ M de IPTG, 6 y 12 horas de inducción. El hecho que la banda de mayor intensidad corresponda a la fracción celular y no al sobrenadante sugiere que cal26a-His no fue eficientemente secretada al espacio periplasmático. Por otro lado el que la banda detectada fuera de mayor tamaño al esperado (4.76 kDa) podría deberse a que cal26a-His incluye los aminoácidos correspondientes a el péptido señal *pe/B* (6.97 kDa).

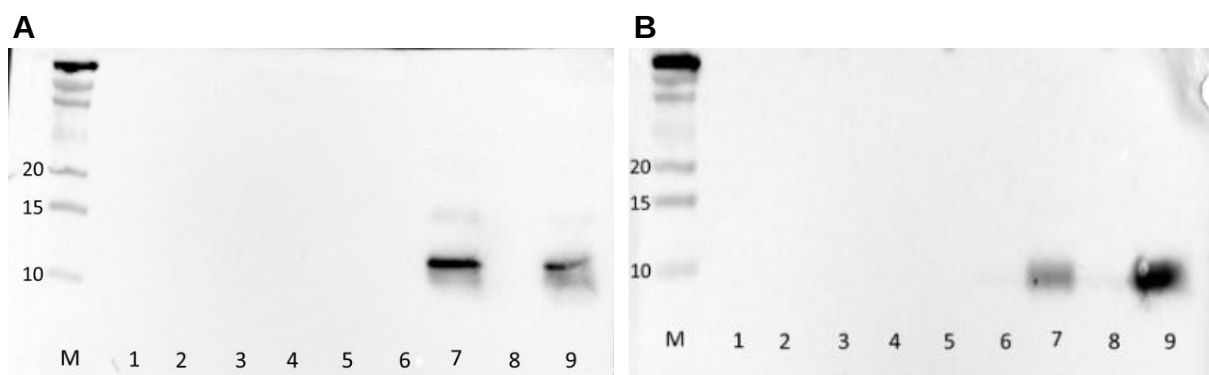


Figura 17 Inmunodetección de la expresión a pequeña escala. A) Análisis de proteínas expresadas a 21 °C. B) Inducción a 37 °C. M marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories). Sobrenadante y pellet inducidos con 10 μ M durante 6h (1 y 2) y 12 h (3 y 4), carril 5 pellet sin inductor (0 μ M IPTG), sobrenadante y pellet inducidos con 1000 μ M durante 6h (6 y 7) y 12 h (8 y 9).

Pese a que las bandas correspondientes a la conotoxina recombinante se detectaron en el citoplasma, en los ensayos posteriores se decidió utilizar 1000 μ M de IPTG, 12 h de incubación a 21 °C como condiciones óptimas, ya que en estas fue donde el análisis de inmunodetección evidenció la banda con la mayor intensidad, lo que sugirió una mayor nivel de expresión y como consecuencia una mayor cantidad de proteína recombinante.

Los resultados de inmunodetección para la expresión a pequeña escala de BL21(DE3)-pET22b-His-cal26a¹ y BL21(DE3)-pET22b-His-cal26a² se presentan en la Figura 18. Cabe mencionar que este ensayo solo incluyó ocho tratamientos donde se evaluaron dos concentraciones del inductor (100 y 1000 μ M), dos temperaturas (21 °C y 37 °C) y dos tiempos de inducción (6 y 12 h). En este análisis se incluyó una proteína recombinante con etiqueta de histidinas, de un tamaño aproximado a los 15 kDa, como control positivo del western blot (carril 9). Dado que no se observaron bandas correspondientes al tamaño esperado (4.5 kDa o 6.7 kDa si permanecieran unidas a *peI/B*) en ninguna de las condiciones evaluadas se sugirió que ninguna de las dos conotoxinas recombinantes fue expresada.

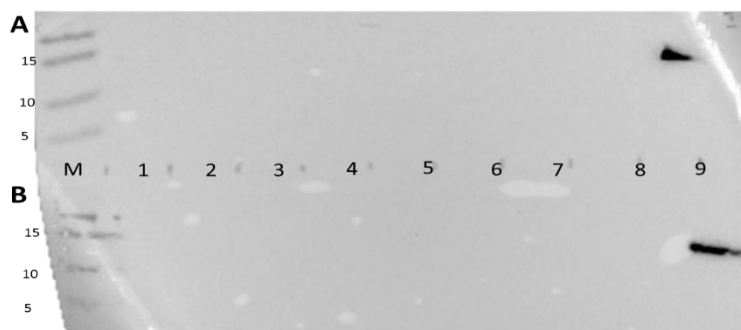


Figura 18 Evaluación de las condiciones de expresión de las construcciones His-cal26a¹ (A) y His-cal26a² (B). En los carriles 1-4 se muestra la inducción con 100 μ M de IPTG y 1000 μ M en los carriles 5-8. Carril 1 y 5 inducción a 21 °C durante 6h, carril 2 y 6 a 21 °C y 12h, carril 3 y 7 a 37 °C y 6h, carril 4 y 8 a 37 °C y 12h, carril 9 control de revelado y M es el marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

Con el propósito de descartar cualquier fallo en el proceso de transformación e inducción de pET22b-His-cal26a¹⁻², células BL21(DE3) fueron nuevamente transformadas, las clonas evaluadas por PCR y su plásmido secuenciado. Posteriormente se realizó un ensayo en paralelo con las tres construcciones utilizando: el mismo medio LB, antibiótico e inductor; se procedió a su inducción utilizando la condición óptima establecida para la expresión de la conotoxina recombinante cal26-His (1000 μ M, 21 °C y 12 h). El análisis de inmunodetección para la expresión en paralelo de las tres construcciones mostró que sólo la proteína recombinante cal26-His fue expresada ya que no se observó banda alguna correspondiente a las proteínas recombinantes His-cal26a¹ y His-cal26a² (Figura 19). Este ensayo también confirmó que la proteína recombinante permaneció unida al péptido señal (*pe/B*), puesto que el péptido sin *pe/B* tendría un peso teórico de 4.76 kDa y este mostró un recorrido mayor a los 5 kDa.



Figura 19 Inmunodetección de las tres construcciones de cal26a expresadas con 1000 μ M a 21 °C durante 12 h, el carril 1 pertenece a His-cal26a¹, el carril 2 a His-cal26a² y el carril 3 corresponde a cal26a-His. M es el marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

7.3. Clonación y expresión de cal26a con sitio de proteólisis

Para las construcciones pET22b-His-SP-cal26a¹⁻², se inició con un gradiente de amplificación por PCR empleando el oligonucleótido nuevo a diferentes temperaturas de alineamiento con el objeto de determinar la condición óptima de alineamiento. El análisis electroforético mostró una amplificación uniforme del fragmento esperado (~150 pb) a lo largo del gradiente, sin embargo se consideró 54 °C como la temperatura óptima de alineamiento para las amplificaciones posteriores (Figura 20).

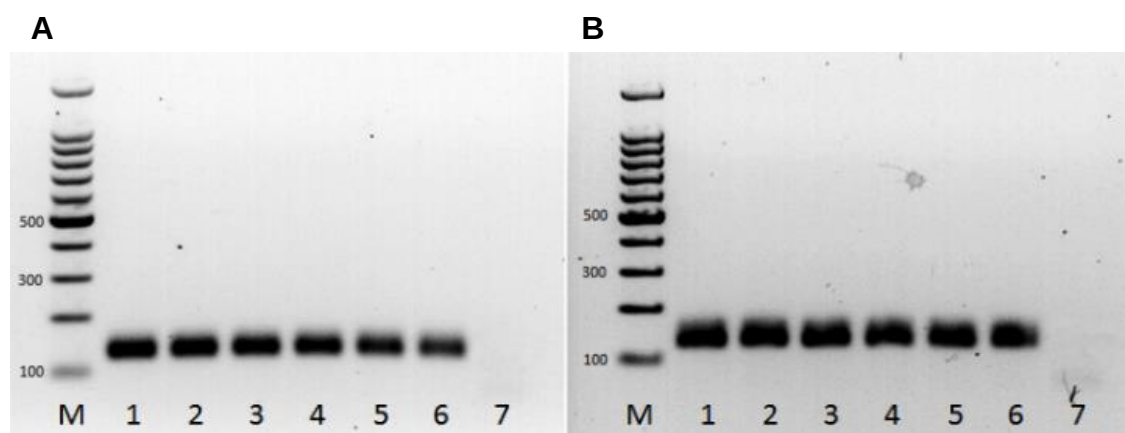


Figura 20 Análisis electroforético de la temperatura de alineamiento óptima para el oligonucleótido His-SP-cal26a_{For}, M marcador molecular de 100 pb (NEB), los carriles 1-6 corresponden a las diferentes temperaturas de alineamiento (50, 52, 54, 56, 58 y 60 °C) respectivamente y el carril 7 corresponde al control negativo. A) His-SP-cal26a¹ y B) His-SP-cal26a².

Se realizaron tres reacciones de PCR de 50 µL para la amplificación de cada uno de los insertos His-SP-cal26a¹⁻², se digirieron empleado las enzimas *Nco* I y *Xho* I y se purificaron; obteniendo 51.0 ng/µL para la construcción con glicina terminal (¹) y 67.9 ng/µL para la que carece de glicina terminal (²).

Posterior a la transformación en *E. coli* TOP10 con las reacciones de ligación de cada uno de los insertos en pET-22b(+) (pET22b-His-SP-cal26a¹⁻²), de las clonas resultantes se analizaron ocho de cada construcción mediante PCR, para pET22b-His-SP-cal26a¹

solo dos clonas no mostraron el fragmento del tamaño esperado de ~390 pb (Figura 21-A carriles 1 y 5) mientras que para pET22b-His-SP-cal26a² solo tres clonas lo presentaron (Figura 21-B, carriles 2, 6 y 7).

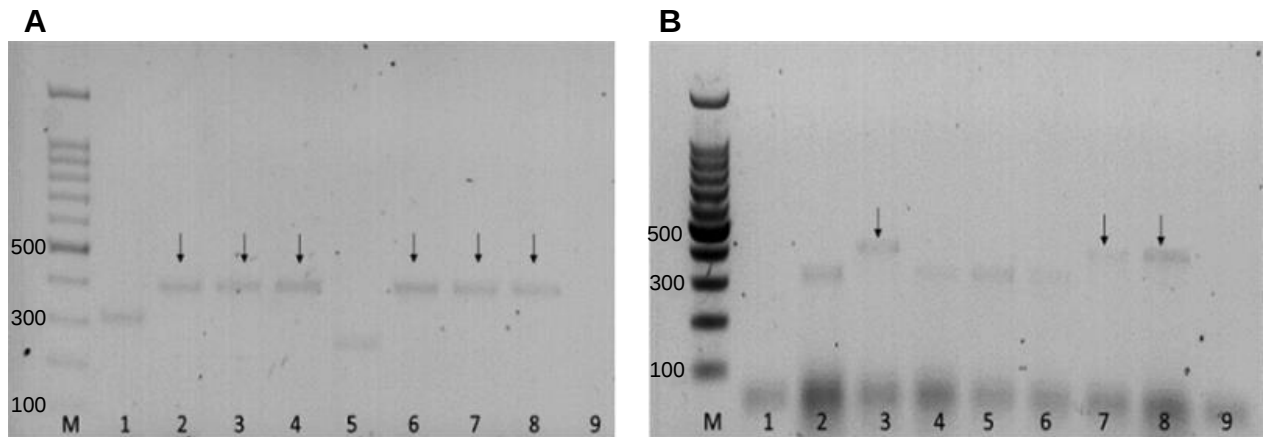


Figura 21 Análisis electroforético de las colonias evaluadas mediante PCR correspondientes a las dos construcciones, en los carriles 1-8 se muestran las ocho colonias evaluadas, en 9 se cargó el control negativo de amplificación y en M se usó el marcador molecular de 100 pb (NEB). La flecha indica las colonias con el inserto de interés. A) His-SP-cal26a¹ B) His-SP-cal26a².

De las clonas que presentaron el inserto se eligieron dos de cada construcción para la purificación de su plásmido y su posterior secuenciación. De la construcción pET22b-His-SP-cal26a¹ se seleccionaron las clonas 2 y 3, mientras que para pET22b-His-SP-cal26a² fueron la 6 y 7. El análisis de las secuencias traducidas confirmó que ambas construcciones se encontraban en marco de lectura correcto para su transcripción y que no presentaban cambios en su secuencia de aminoácidos, así mismo se observó el sitio de proteólisis para enteropeptidasa (DDDDK) entre la etiqueta de histidinas y los primeros aminoácidos de la conotoxina (Figura 22).

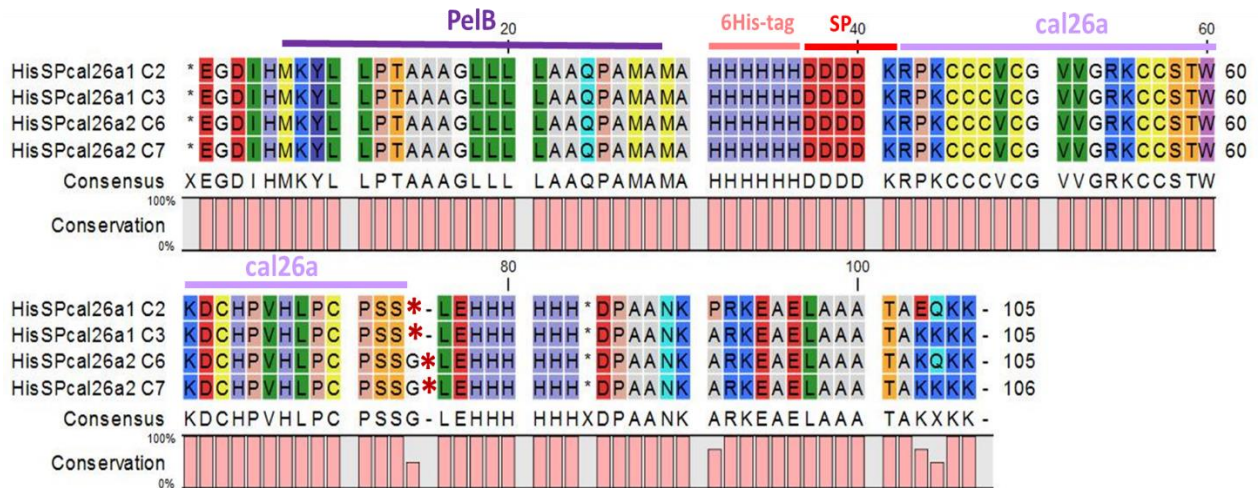


Figura 22 Análisis de las secuencias de aminoácidos de los plásmidos *pET22b-His-SP-cal26a¹* y *pET22b-His-SP-cal26a²*. El asterisco (*) representa el codón de paro.

En el ensayo para establecer las condiciones óptimas de inducción a pequeña escala de la conotoxina recombinante se seleccionó la clona BL21(DE3)-pET22b-His-SP-cal26a², la cual tiene un peso molecular teórico de 5.13 kDa y 7.34 kDa si conserva el péptido señal (*pe/B*).

El análisis de inmunodetección del ensayo de inducción a 12 horas, evidenció una banda tenue con un recorrido electroforético aproximado a los 10 kDa en los carriles 3 y 6, correspondientes a los tratamientos de IPTG (100 μ M) a 21 °C e IPTG (1000 μ M) a 37 °C, respectivamente (Figura 23). Para el caso de la inducción a 6 horas, en ninguno de los tratamientos se detectó la presencia de la proteína recombinante. Si bien se expresó la conotoxina recombinante cal26a con sitio de proteólisis esto fue a nivel muy bajo por lo cual se decidió continuar con el trabajo empleando cal26a-His.

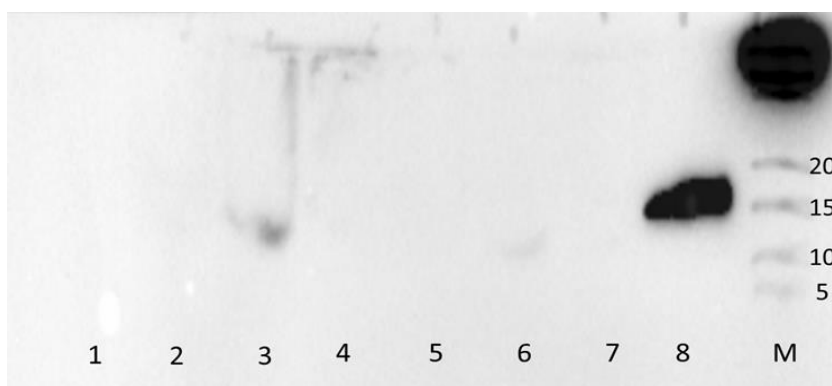


Figura 23 Inmunodetección de las condiciones de inducción de His-Sp-cal26a² durante 12 h. los carriles 1 y 2 corresponden a la expresión con IPTG (10 μ M) a 21 y 37 °C, en 3 y 4 a IPTG (100 μ M) a 21 y 37 °C y IPTG (1000 μ M) a 21 y 37 °C en los carriles 5 y 6, el carril 7 se dejó como espacio y en el carril 8 se cargó un control positivo de revelado. M es el marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

7.4. Purificación por cromatografía de afinidad a metales de la proteína recombinante cal26a-His

7.4.1. Purificación en condiciones nativas

Para la purificación en condiciones nativas se emplearon los extractos periplasmáticos solubles (~20 mL) obtenidos en el ensayo de expresión a pequeña escala y en los que se evidenció la presencia de la proteína cal26a-His (sección 7.2.2). Los resultados del análisis de inmunodetección de las fracciones purificadas se presentan en la Figura 24. A partir de este análisis se corroboró que la proteína no fue secretada al periplasma, ya que en ninguno de los carriles se observó la banda del tamaño correspondiente a cal26a-His. Lo anterior sugiere que lo observado previamente en el western blot de los extractos crudos (Figura 17), pudo deberse a contaminación con proteína insoluble (pellet).



Figura 24 Inmunodetección de los productos de la purificación por cromatografía de afinidad a metales en condiciones nativas. M: marcador Multimark (Invitrogen), carril 1: primer lavado, carriles 2-6: eluciones 1-5, carril 7: segundo lavado, carril 8: sobrenadante pasado por la columna y carril 9: pellet obtenido de la extracción periplasmática.

7.4.2. Purificación en condiciones desnaturalizantes

Dado que se corroboró que la conotoxina recombinante cal26a-His se encontraba en el citoplasma de forma insoluble, se procedió a su purificación empleando condiciones desnaturalizantes. Aunque en este proceso se logró obtener la proteína recombinante, como evidenció el western blot (Figura 25-B), su purificación no logró eliminar proteínas inespecíficas en ninguna de las eluciones, como lo demuestra el análisis por SDS-PAGE (Figura 25-A).

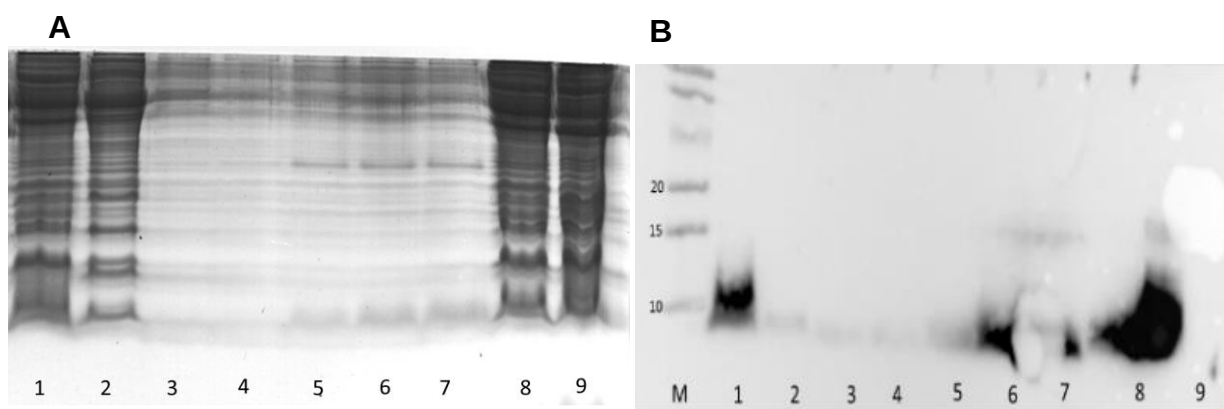


Figura 25 Análisis de la purificación por cromatografía de afinidad a metales en condiciones desnaturalizantes. A) SDS-PAGE, B) Inmunodetección. M: marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories), carril 1: Sobrenadante sin purificar, carriles 2-3: lavados 2 y 8, carriles 4-7: eluciones 1-4, carril 8: sobrenadante pasado por la columna y carril 9: pellet obtenido de la extracción periplasmática.

7.4.3. Aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión

Debido a que la purificación desnaturalizante a partir de los lisados celulares no permitió separar de manera eficiente la conotoxina recombinante se optó por aislar y purificar los agregados citoplasmáticos cuerpos de inclusión. Para ello se utilizó biomasa bacteriana proveniente de un cultivo de 100 mL el cual fue inducido en las condiciones óptimas previamente establecidas. Las bacterias fueron lisadas en condiciones nativas, las proteínas insolubles recuperadas (cuerpos de inclusión) y solubilizadas para su purificación mediante cromatografía IMAC. Finalmente, las eluciones obtenidas fueron evaluadas mediante SDS-PAGE y western blot (Figura 26).

En el SDS-PAGE se observó en todos los carriles una banda con un recorrido electroforético menor a los 10 kDa (~7 kDa) presumiblemente correspondiente a la conotoxina recombinante cal26a-His (Figura 26-A) lo cual fue confirmado mediante inmunodetección (Figura 26-B). A partir del SDS-PAGE se observó que en el caso de las eluciones, las bandas más intensas se obtuvieron en las dos primeras (carriles 3 y 4) lo que sugiere una mayor concentración de la misma. Cabe destacar que en todas las eluciones, la presencia de proteínas inespecíficas disminuyó considerablemente, siendo las eluciones 3-5 (carriles 5-7) las que presentaron la conotoxina recombinante prácticamente pura aunque en menor concentración.

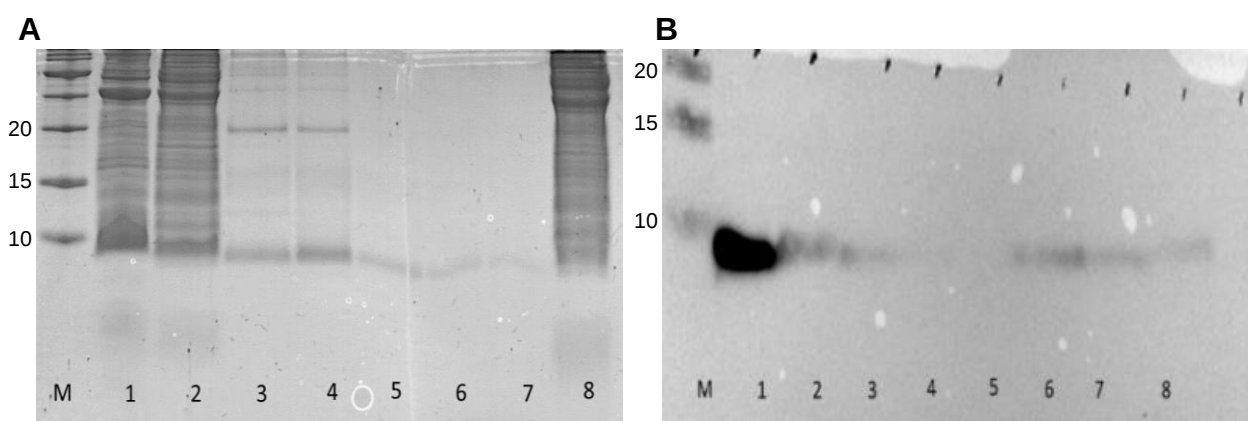


Figura 26 Purificación desnaturalizante de cuerpos de inclusión. Electroforesis (A) e inmunodetección (B). Carril 1, precipitado bacteriano posterior a la inducción, carril 2, sobrenadante del solubilizado de cuerpos de inclusión, carriles 3-7, eluciones 1-5 respectivamente, carril 8, sobrenadante pasado por la columna. M: marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

Con el propósito de optimizar la purificación reduciendo las proteínas inespecíficas presentes en las eluciones 1 y 2, la cuales presentaron la mayor cantidad de proteína recombinante (Figura 26-A), se decidió hacer modificaciones independientes en el lavado de la columna, como fue, 1) lavar con el doble del volumen (40 mL) de la solución de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y urea 8 M a pH 8.0) y 2) lavar con el mismo volumen (20 mL) pero incrementando la concentración de imidazol de la solución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM y urea 8 M a pH 8.0). Los productos de estas nuevas purificaciones fueron evaluados mediante SDS-PAGE.

El análisis electroforético de la optimización de la purificación, mostró que al incrementar el volumen de lavado se disminuyó de manera importante las proteínas inespecíficas excepto por la que tiene un peso aproximado de 20 kDa que estuvo presente en las tres primeras eluciones (Figura 27-A). La banda correspondiente a la conotoxina recombinante se presentó en todas las eluciones, mostrándose con una mayor intensidad en las tres primeras junto con la de 20 kDa. De manera similar al caso anterior (Figura 26-A) la proteína con mayor pureza pero con menor concentración se obtuvo en las ultimas eluciones (Figura 27-A, carriles 4 y 5). Por otra parte, el incremento de la concentración de imidazol en la solución de lavado, eliminó de manera eficiente las proteínas inespecíficas en todas las eluciones, quedando prácticamente pura la proteína recombinante, sin embargo esto también ocasionó pérdida, lo que se reflejó de manera significativa en su concentración.

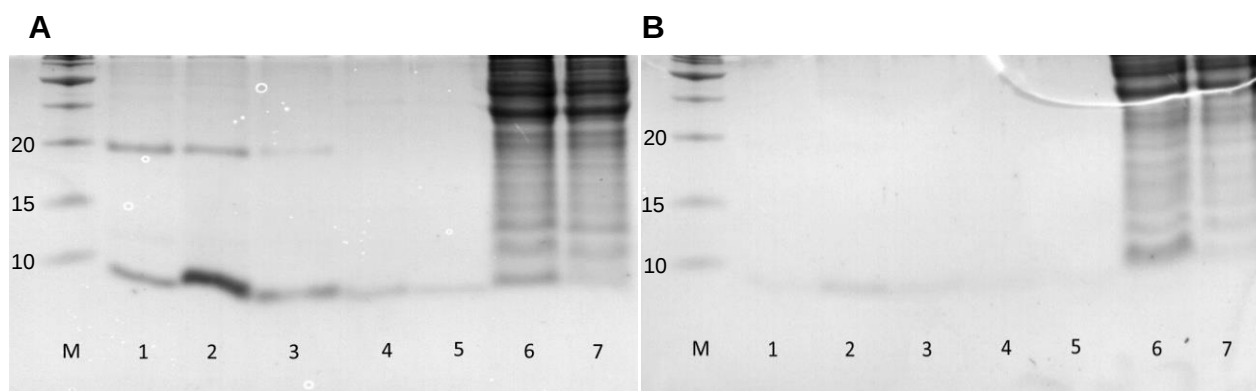


Figura 27 Estandarización de la purificación desnaturalizante de cuerpos de inclusión. A) 40 mL de solución de lavado y B) solución de lavado con 50mM de Imidazol. Carril 1-5 eluciones 1-5 respectivamente, carril 6 sobrenadante del solubilizado de cuerpos de inclusión, carril 7 sobrenadante pasado por la columna. M: marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

Con estos resultados, se generaron dos alternativas: obtener la conotoxina recombinante en mayor concentración pero con cierta cantidad de impurezas u obtenerla de forma más pura pero en menor cantidad. La elección fue obtener la mayor cantidad de proteína recombinante y emplear, en un futuro, otro sistema para su repurificación.

Una vez que se determinó incrementar el volumen de lavado como estrategia para obtener fracciones medianamente puras, se procedió a la purificación de la conotoxina recombinante a partir de 1L de cultivo. El análisis de las fracciones purificadas se presenta en la Figura 28, en la elución dos se observó a cal26a-His con mayor intensidad, pero también la banda adicional de ~20 kDa, la cual aparece hasta la cuarta elución.

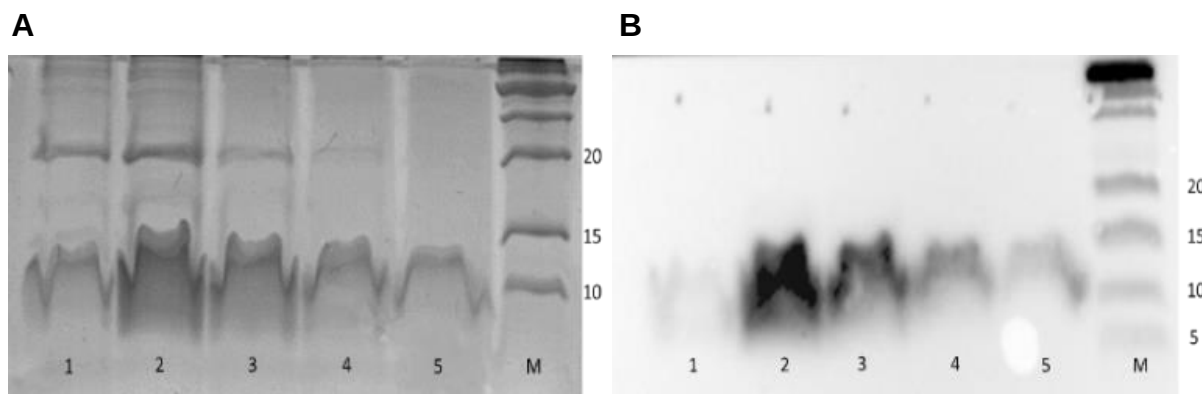


Figura 28 Eluciones obtenidas de la purificación de cuerpos de inclusión. Se muestra la electroforesis (A) e inmunodetección (B) de las cinco eluciones correspondientes a 1 L de cultivo inducido, M: marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

7.5. Renaturalización

Basándose en la pureza de las eluciones obtenidas de la purificación previa, se formaron dos grupos: las primeras tres eluciones se mezclaron en el grupo 1, mientras que en el grupo 2 se mezclaron las eluciones 4 y 5, los cuales se dializaron y cuantificaron. Obteniendo 971 μ g para el grupo 1 y 217 μ g para el grupo 2.

En el ensayo de renaturalización por cromatografía IMAC, se utilizó al grupo 1 (~12 mL), del cual la mitad se renaturalizó con Tris-HCL 20 mM y el resto con Tris-HCL 20 mM

adicionado con glicina 10 mM. El análisis por SDS-PAGE de las eluciones obtenidas (Figura 29), evidenció la presencia de proteína soluble en las eluciones nativas (carriles 3-7), esta proteína obtenida corresponde a la proteína que logró un plegamiento completo que le proporcionó una estabilidad estructural adecuada para su solubilidad, sin embargo puede apreciarse en las eluciones desnaturalizantes (carriles 8 y 9), una cantidad considerable de proteína que no alcanzó una conformación completa, formando agregados en el proceso, los cuales quedaron retenidos en la columna hasta ser desnaturalizados nuevamente. A pesar de que se obtuvo proteína soluble, no se puede saber si esta alcanzó la conformación correcta, hasta evaluar su actividad biológica contra *M. tuberculosis*.

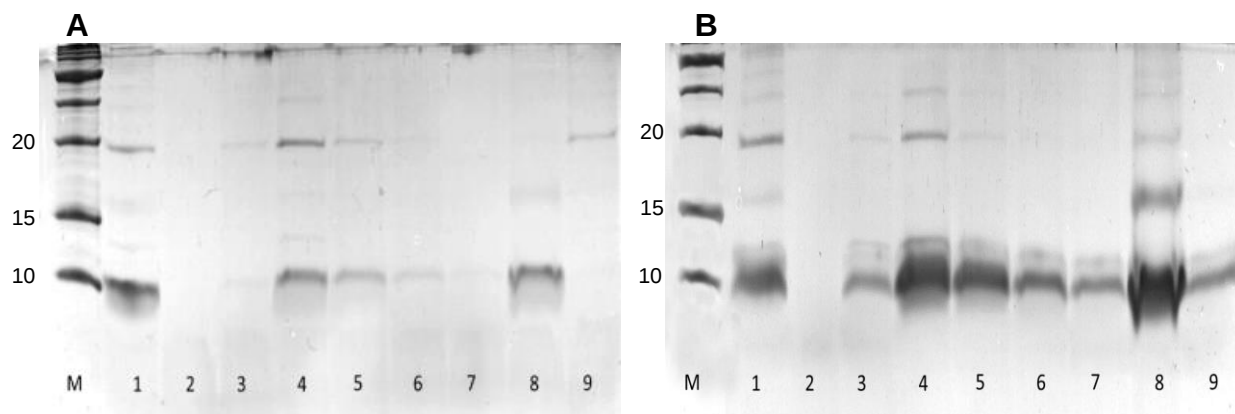


Figura 29 Plegamiento en columna utilizando Tris-HCl 20 mM pH 8.0 como agente renaturalizante (A) y adicionado con glicina 10mM (B). Carril 1 sobrenadante previo a la renaturalización, carril 2 sobrenadante pasado por la columna, carril 3-7 eluciones en condiciones nativas, carriles 8 y 9 eluciones desnaturalizantes 1 y 2 respectivamente. M: marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories).

De las eluciones nativas se excluyó la elución 2 por ser la que presentó mayor cantidad de bandas adicionales. El resto se mezclaron, se dializaron contra PBS y se cuantificaron. Al término del proceso se obtuvieron 40 µg de proteína renaturalizada con Tris-HCL y 64 µg para Tris-HCl complementado con glicina.

7.6. Análisis de la actividad biológica

Se evaluó el efecto de la conotoxina recombinante cal26a-His sobre *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, para cal26a-His-1 (muestra renaturalizada en Tris-HCl y dializada contra PBS 1x), se empleó una concentración final de 2.5 µg/mL mientras que para cal26a-His-2 (muestra renaturalizada en Tris-HCl adicionado con glicina HCl y dializada contra PBS 1x) fue de 2.5 y 8 µg/mL. Las concentraciones empleadas en este ensayo fueron seleccionadas con base a las concentraciones iniciales de cada conotoxina renaturalizada (10 y 32 µg/mL, respectivamente).

Un ensayo preliminar mostró que la conotoxina recombinante tuvo un efecto moderado sobre la viabilidad de *M. tuberculosis*, siendo cal26a-2 a una concentración de 8 µg/mL la que presentó un mayor efecto, al disminuir la viabilidad en aproximadamente el 63 %, en comparación con el control de crecimiento y un 23 % con respecto al PBS 1X. Sin embargo, este resultado debe tomarse con cautela, ya que el control con PBS mostró un efecto importante en la viabilidad, y en el caso de PBS 10x, llegando a ser mayor al del control positivo (isoniacida 1 µg/mL) (Figura 30).

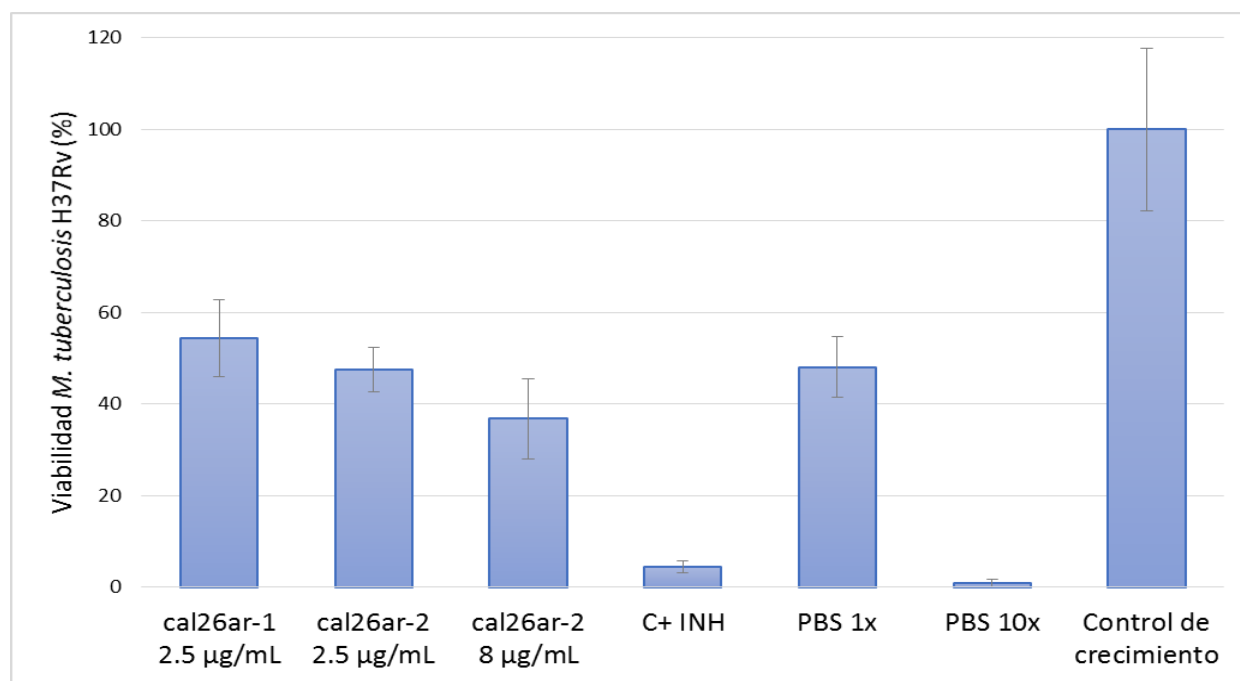


Figura 30 Evaluación de la actividad de cal26a-His_r contra *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, probada a diferentes soluciones de renaturalización

Capítulo 8. Discusión

Las conotoxinas son los componentes principales del veneno de los caracoles marinos del género *Conus*, se caracterizan por ser péptidos pequeños (<5 kDa) ricos en enlaces disulfuro y por presentar diversas modificaciones postraduccionales entre las que se incluyen aminoácidos modificados y procesamiento de la región N- y C-terminal. Estas modificaciones afectan su estructura y actividad biológica, lo cual repercute en su elevada afinidad y especificidad por sus blancos moleculares (Durek and Craik, 2015; Kaas, *et al.*, 2008; Thapa *et al.*, 2014). Es con base a estas características, que las conotoxinas se convierten en biofármacos potenciales para el tratamiento de numerosas enfermedades.

Tal es el caso de cal26a, una conotoxina de 32 aminoácidos aislada del veneno de *Conus californicus*, presenta un peso de 3.5 kDa, 4 enlaces disulfuro y se encuentra amidada en el extremo carboxilo. Esta conotoxina descrita por Bernáldez Sarabia (2013) tiene la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria responsable de la tuberculosis. Esta enfermedad, considerada como un problema de salud pública, afectó a cerca de 9 millones de personas y fue la causante de 1.5 millones de fallecimientos en 2013 a nivel mundial (OMS, 2014). Si bien, se cuenta con diversos fármacos para su tratamiento, la aparición de nuevas cepas multidrogoresistentes lleva a la búsqueda constante y permanente de nuevos fármacos para su control. Es por ello que es de gran interés evaluar el empleo potencial de la conotoxina cal26a como biofármaco en el tratamiento de esta enfermedad.

La imposibilidad de contar con cantidades suficientes de conotoxinas, y en este caso de cal26a, limita su estudio y análisis, esto nos lleva a explorar otras alternativas para su obtención. La síntesis química es considerada como una opción práctica, sin embargo, su elevado costo de producción y la dificultad de sintetizar más de tres enlaces disulfuro, no la hace la mejor opción para cal26a, ya que esta presenta 4 enlaces. Es por ello que los sistemas de expresión heteróloga se convierten en una alternativa viable y económica para la producción de estas toxinas. De estos sistemas, aquellos que emplean a *Escherichia coli* como medio de expresión son más ampliamente utilizados debido a su

bajo costo, su alta productividad y el extenso conocimiento de su genética y metabolismo (Correa and Oppezzo, 2015). El interés por producir conotoxinas recombinantes ha cobrado interés en años recientes, lo cual queda demostrado en varios trabajos que documentan la expresión de varias conotoxinas biológicamente activas a partir de *E. coli* (Tabla 2). Un ejemplo es ω -MVIIA, la cual ha sido expresada exitosamente empleando dos diferentes sistemas y la cual demostró una actividad antinociceptiva similar a la del péptido nativo y ochocientas veces mayor a la morfina (Xia, *et al.*, 2006; Zhan, *et al.*, 2003). Otro caso de interés son las conotoxinas MrVIB y GeXIVAWT, las cuales a pesar de ser producidas con el mismo sistema de expresión, estas tuvieron un comportamiento distinto (GeXIVAWT no fue soluble) (Gao, *et al.*, 2013a y b), lo cual sugiere que el éxito obtenido en la expresión de una conotoxina, a pesar del sistema empleado, depende mayoritariamente de las características del péptido.

Con base a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se planteó como objetivo la expresión heteróloga de la conotoxina cal26a en *Escherichia coli*, con su subsecuente purificación y análisis de actividad. Se seleccionó el vector de expresión pET-22b(+) (Novagen) tomando en cuenta que fue empleado con éxito por Gao y colaboradores (2013a, 2013b) para la expresión de dos conotoxinas activas. Entre las características más notables de este vector se incluye: 1) el péptido señal (*peI/B*), el cual permite exportar la proteína recombinante al periplasma y 2) una etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal que permite su identificación y purificación (Novagen, 2003). Si bien el vector pET-22b(+) presenta las etiquetas de histidinas en el extremo C-terminal, en el diseño de cal26a recombinante se incluyó la opción de ubicar la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de esta manera el extremo C-terminal de la conotoxina quedaría libre con la opción para su potencial amidación *in vitro*. La estrategia de ubicar la etiqueta de histidinas el extremo N-terminal obedece a que la conotoxina nativa presenta su carboxilo terminal amidado, modificación que se ha descrito en otras conotoxinas como crucial en su actividad; por ejemplo, ω -MVIIA y prIIIE, tienen un decremento en su actividad cuando no presentan esta modificación, y para el caso de α -ImI, pierde por completo su afinidad por su blanco molecular, al sufrir un cambio en su estructura globular (Hernandez-Cuebas and White, 2012; Kang, Vivekanandan, Jois and Kini, 2005).

Al promover *pe/B* la secreción de la proteína recombinante al espacio periplásmico (lugar con las condiciones óptimas para la formación de enlaces disulfuro), facilita su purificación y evita su proteólisis, debido a que este espacio contiene una menor cantidad de proteínas en comparación con el citoplasma así como de proteasas. Para que esta translocación se lleve a cabo se requiere del reconocimiento del péptido señal por el sistema de transporte Sec, el cual ancla a *pe/B* en la membrana interna de la bacteria y permite el paso de la proteína a través de un canal impulsado por ATP. Previo al tránsito de la proteína recombinante al espacio periplásmico, la señal *pe/B* es hidrolizada, por una peptidasa señal, con lo cual, el extremo N-terminal queda semejante al péptido nativo (Choi and Lee, 2004; Hannig and Makrides, 1998; Mori and Koreaki, 2001).

Se construyeron tres vectores recombinantes: pET22b-cal26a-His, pET22b-His-cal26a¹ y pET22b-His-cal26a² y se obtuvieron sus respectivas clonas BL21(D3) para su expresión. En la búsqueda de obtener a cal26a recombinante de forma soluble, se evaluaron diferentes condiciones de inducción de la clona BL21(DE3)-pET22b-cal26a-His (Figura 7) mismas que se analizaron mediante inmunodetección. A partir de este análisis se observó una mayor cantidad de proteína inducida bajo las condiciones de 1000 μ M de IPTG a 21 °C y 12 horas de cultivo, con lo cual se determinan estas como las óptimas para su inducción. La presencia de una banda en la fracción no solubles (detrito celular) y su ausencia en la soluble (periplasma) sugiere que la conotoxina recombinante se acumuló en forma de cuerpos de inclusión en el citoplasma a pesar de contar con la señal *pe/B* para su translocación al espacio periplásmico. Asimismo, el tamaño de la banda observada (alrededor de 10 kDa) contrasta con el teórico (4.8 kDa), lo cual sugiere que la señal *pe/B* no fue hidrolizada ya que su recorrido electroforético es coincidente con el teórico calculado para conotoxina y la señal (7.3 kDa). Sin embargo, un análisis por espectrometría de masas mostraría el peso real de cal26a-His_r evidenciando si este permaneció unido o no al péptido señal.

Diversas causas son las que interfieren en la expresión de proteína recombinantes de forma soluble, como: 1) las condiciones de inducción (temperatura, concentración del inductor y tiempo), 2) cuando la proteína tiene una sobreexpresión que supera al mecanismo de plegamiento y/o transporte, 3) cuando la proteína es tóxica para la bacteria

y 4) cuando se compromete su expresión debido a la presencia de múltiples enlaces disulfuro que dificultan el plegamiento (García-Fruitós, 2015).

Con respecto a las condiciones de inducción, se ha observado que la temperatura tiene un efecto en la solubilidad del péptido recombinante, ya que a menor temperatura hay una reducción en las interacciones hidrofóbicas de los aminoácidos y un incremento en la expresión de la maquinaria de plegamiento (Ferrer-Miralles, Saccardo, Corchero, Xu and García-Fruitós, 2015). La concentración de IPTG también puede influir en la solubilidad, ya que a bajas concentraciones se reduce el índice de expresión permitiendo un mejor plegamiento. Sin embargo, el decremento de la temperatura y/o concentración de inductor puede afectar la velocidad de los procesos metabólicos y por ende disminuye el rendimiento de la proteína recombinante, requiriéndose un mayor tiempo de inducción, lo cual podría conducir a su degradación por proteasas (Tolia and Joshua-Tor, 2006).

En relación al transporte de proteínas al espacio periplásmico, Kajava *et al.* (2000) encontraron que la capacidad de *E. coli* para traslocar, está relacionada con la carga neta de sus primeros 14 aminoácidos, la cual es inhibida cuando se presenta una carga positiva ($\geq +1$). En este cálculo los autores consideraron como valores positivos (+1) a los aminoácidos arginina (R) y lisina (K), mientras que de valor negativo (-1) a los aminoácidos aspartato (D) y glutamato (E). Con base a lo anterior, cal26a-His presenta cinco aminoácidos de valor positivo y uno de valor negativo, otorgándole una carga neta de +4 y catalogándola como una proteína difícil de transportar al espacio periplásmico, lo cual podría explicar su ausencia en esta zona. Al analizar de igual manera las conotoxinas expresadas por Gao y colaboradores (2013a y 2013b) encontramos que mientras MrVIB con una carga neta de 0 fue expresada de forma soluble, GeXIVAWT con una valor de +2 fue obtenida en forma de agregados. El análisis de espectrometría de masas de MrVIB indicó que la señal *pe/B* fue procesada, lo que sugiere su translocación al periplasma. Sin embargo, para el caso de GeXIVAWT donde el péptido señal no fue hidrolizado, nos permite suponer que este permaneció en el citoplasma, fortaleciendo la teoría que una carga positiva en la proteína recombinante afecta su translocación (ver Anexo A 4).

La expresión de proteínas recombinantes en el citoplasma de *E. coli*, es preferida por los altos rendimientos obtenidos, sin embargo la presencia de enzimas como tioredoxina y

glutaredoxina, que favorecen la reducción de las cisteínas, impiden la formación de enlaces disulfuro, por lo que aquellas proteínas que presenten estas uniones solo pueden ser correctamente plegadas en el periplasma mediante las enzimas Dsb (por sus siglas en inglés). Actualmente existen en el mercado cepas de *E. coli*, como Origami (Novagen), que carecen de tiorredoxina y glutatión reductasas (*trxB*/*gor*) favoreciendo la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma (Sørensen and Mortensen, 2005), las cuales pueden ser empleadas para la expresión de cal26a-His y evaluar si la formación de estos enlaces evita su acumulación en cuerpos de inclusión.

Para el caso de las conotoxinas recombinantes His-cal26a¹ y His-cal26a² que no se expresaron, diversas son las causas atribuibles, mismas que se pueden agrupar en fallos de transcripción y/o en la traducción o la degradación de la proteína recombinante. Un problema en la traducción de genes de origen eucariota es la diferencia en el uso de codones, ya que no todos los ARN de transporte (ARNt) tienen la misma disponibilidad en *E. coli*, considerándose “raros” a aquellos codones con la menor disponibilidad de transporte del aminoácido para el que codifican. Por lo que la traducción de genes con un gran número de estos codones “raros” se ve reducida y en algunos casos inhibida (Gustafsson, Govindarajan and Minshull, 2004).

La herramienta bioinformática “Rare Codon Analysis Tool” disponible en el sitio web de la empresa GenScript, permite analizar secuencias e identificar codones raros para varios organismos, utilizados en la expresión de proteínas recombinantes, entre los que se encuentra *E. coli*, levaduras y células de insecto. De acuerdo a las especificaciones del programa para evitar problemas en la transcripción por uso de codones, la secuencia debe tener un índice de adaptación de codones (CAI, por sus siglas en inglés) mayor a 0.8. El análisis de la secuencia TxCC-KD (ver Anexo A 1) demostró que contiene múltiples codones raros para *E. coli*, obteniendo un CAI de 0.65. Cabe mencionar que el gen TxCC-KD fue optimizado para su expresión en *Pichia pastoris*. Sin embargo aunque un CAI de 0.65 sugiere problemas en la traducción, esto no podría tomarse como el único factor de la falla en la expresión de His-cal26a¹⁻² ya que cuentan con la misma secuencia nucleotídica que cal26a-His (la cual si fue expresada) y solo varían en la posición de los 6 codones que codifican para la etiqueta de histidinas (Anexo A 2), lo cual podría modificar la estructura del ARNm impidiendo la transcripción.

Una alternativa empleada para remediar la imparcialidad de codones, es la co-expresión de ARNt's raros empleando vectores complementarios que codifiquen estos ribonucleotidos, como pRARE (Novagen) y CodonPlus (Stratagene) o emplear cepas de *E. coli* que contienen estos vectores; la cepa Rosetta (DE3) (Novagen®) contiene al vector pRARE, el cual contiene los genes para los ARNt's AGG/AGA (Arg), AUA (Ile), CUA (Leu), CCC (Pro) y GGA (Gly); la cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RP contiene los mismos genes exceptuando a GGA (Gly) (Rosano and Ceccarelli, 2014; Sørensen and Mortensen, 2005).

La estabilidad del plásmido es otro factor que influye en la expresión de la proteína recombinantes ya sea ocasionando que las bacterias repriman la expresión del gen o que incluso pierdan el plásmido, lo cual se refleja en una disminución considerablemente del rendimiento de la proteína expresada. A partir de un ensayo para evaluar la estabilidad del plásmido de las cepas estudiadas, descrito en el 'pET System Manual' (Novagen, 2003), para el caso de BL21(DE3)-pET22b-His-cal26a1-2, se encontró que este fue inestable, ya que algunas células lo perdieron y las que lo conservaron reprimieron la expresión del gen de interés. Por otro lado, BL21(DE3)-pET22b-His-SP-cal26a2 presentó clones que no retuvieron el plásmido, lo cual refuerza que el problema en la expresión de estas construcciones fue previo a la transcripción, en comparación BL21(DE3)-pET22b-cal26a-His la cual mostró una completa estabilidad del plásmido (ver Anexo A 6).

Sin embargo, un ensayo mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) confirmaría si la nula expresión de His-cal26a¹⁻² fue por problemas en la transcripción o en la traducción/degradación del péptido recombinante, mediante la comparación del RNA procedente de células inducidas contra células sin inducir; si se detectara una mayor cantidad de transcrito en las células inducidas sugeriría un problema en la traducción, pero si no hubiera diferencia significativa, el problema sería de transcripción.

Considerando que solo se había logrado la expresión de cal26a-His, la cual no era transportada al espacio periplásmico y presumiblemente conservaba el péptido señal *pe/B*, se decidió diseñar dos nuevas construcciones, en las cuales se insertó un sitio de proteólisis (SP) para la enzima enteropeptidasa entre la etiqueta de histidinas (6xHis) y la secuencia que codifica para la conotoxina cal26a (Figura 8). A partir de este nuevo

diseño se esperaba que la conotoxina recombinante fuera translocada al periplasma, ya que al insertar el sitio de proteólisis la carga neta de sus primeros 14 aminoácidos (-2) la catalogaba como de fácil transporte a éste espacio (Kajava *et al.*, 2000). Otra ventaja de incluir el sitio de proteólisis es que una vez que la conotoxina fuera purificada, la etiqueta 6xHis puede ser eliminada junto con *pe/B* si esta permaneciera unida a la proteína, obteniendo así a cal26a_r con una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la conotoxina nativa.

El análisis de inducción de His-SP-cal26a² mostró una muy baja expresión y el recorrido electroforético sugirió que permanecía unido a *pe/B*. Al igual que las construcciones His-cal26a¹⁻², se debe determinar si el problema en la baja expresión fue a nivel de transcrito, en la traducción del péptido o si fue por degradación de la proteína.

Una vez que se establecen las condiciones óptimas para la expresión de las proteínas recombinantes, el siguiente reto es su purificación. En este trabajo se evaluaron dos estrategias con el propósito de optimizar las condiciones que permitieran obtener el mayor rendimiento y nivel de pureza de la conotoxina recombinante cal26a-His.

Los cuerpos de inclusión eran considerados como proteínas inservibles para la industria, sin embargo, estudios recientes han modificado esta percepción, ya que se han obtenido proteínas catalíticamente activas mediante la renaturalización de estos agregados. Un hecho importante es que son un reservorio de la mayor parte de la proteína recombinante que incluye una mezcla heterogénea de proteínas en la que se han identificado péptidos malformados y plegados correctamente, algunos de los cuales presentan actividad incluso dentro del agregado (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

La purificación de proteína contenida en cuerpos de inclusión requiere del empleo de agentes desnaturalizantes como la urea o guanidina-HCl. De acuerdo al manual QIAexpressionist™ (QIAGEN ©, 2003), se recomienda utilizar urea ya que la guanidina, aunque es considerada un mejor agente solubilizante, interfiere en el análisis de electroforesis posterior, al reaccionar con el SDS. El protocolo descrito para la purificación de proteínas en cuerpos de inclusión, emplea el punto isoeléctrico de la histidina para su acoplamiento y desacoplamiento al níquel. Inicialmente se utiliza un pH de 8.0, donde el

nitrógeno del anillo de imidazol de la proteína se encuentra desprotonado, aumentando su afinidad a níquel, posteriormente en el lavado con una solución con pH 6.3, las histidinas se encuentran cerca de su pK_a , por lo que solo proteínas que contienen etiquetas de histidina se encuentran lo suficientemente unidas, eliminándose aquellas con uniones inespecíficas. A un pH inferior a 5.9, el nitrógeno se protona, desestabilizando el puente de hidrógeno que lo une al níquel facilitando su elución (Wingfield, Palmer and Liang, 2001).

Sin embargo, una desventaja de emplear urea como agente desnaturizante, es que este reactivo en solución se disocia en iones cianato y amonio, aumentando el pH de la solución, lo cual puede ocasionar un desacoplamiento ineficiente de las proteínas inespecíficas en los lavados, lo que aumenta la impureza de las eluciones (Lippincott and Apostol, 1999). Lo anterior fue constatado ya que se observó la presencia de una gran cantidad de bandas accesorias (impurezas) en las eluciones obtenidas (Figura 25 A), motivo por el cual se decidió evaluar un método de purificación nuevo en el que se optimizara el rendimiento y la pureza.

Los cuerpos de inclusión son estructuras porosas con forma esférica irregular con tamaño que puede superar los 1.6 μm , sin embargo, es su densidad (~ 1.3 g/mL) la que permite recuperarlos mediante centrifugación a bajas velocidades (Doglia and Lotti, 2014; Fischer, Sumner and Goodenough, 1993). Diversos protocolos aprovechan la densidad de los cuerpos de inclusión, para separarlos de las proteínas solubles nativas de *E. coli* y detrito celular, favoreciendo al proceso de purificación posterior (Doglia and Lotti, 2014; Mukhopadhyay, 1997; Palmer and Wingfield, 2012; Patra *et al.*, 2000; Singh and Panda, 2005; Wingfield *et al.*, 2001).

La purificación cal26a-His a partir de los cuerpos de inclusión previamente aislados (Macherey-Nagel, 2013) mejoró considerablemente la pureza de las eluciones, en comparación al protocolo descrito por QIAGEN (2003), sin embargo fue necesario ajustar algunas condiciones para eliminar impurezas presentes en las primeras tres eluciones, siendo un aumento en el volumen de solución de lavado (40 mL) como la mejor condición evaluada.

Posterior a la purificación de la proteína expresada en un litro de cultivo inducido con 1000 μ M de IPTG a 21 °C por 12 h, se obtuvo un rendimiento de 1.19 mg/L, el cual es bajo en comparación a lo obtenido por Gao y colaboradores (2013a, 2013b), lo obtenido se encuentra entre un rango establecido para la expresión de otras toxinas recombinantes (Hernandez-Cuebas and White, 2012) y el cual fue suficiente para los ensayos posteriores. Una causa posible para este rendimiento es la pérdida atribuida al proceso de purificación y a su manipulación.

Las proteínas en cuerpos de inclusión se encuentran, en su mayoría, mal formadas y esta aumenta al purificarse por condiciones desnaturalizantes. Un punto clave en la recuperación de la bioactividad de un péptido, está en recobrar su conformación tridimensional nativa y el patrón correcto de enlaces disulfuro, lo cual se puede lograr removiendo el exceso de agente desnaturalizante y cambiando al péptido a una solución oxidante (De Bernardez-Clark and Georgiou, 1991; Fischer *et al.*, 1993). La renaturalización es un proceso en el que la estructura cambia de un estado solvatado, desplegado y flexible, a uno rígido y compacto, pero este cambio puede llegar a ser drástico, provocando muchas veces que la proteína se pliegue mal y precipite (Tsumoto, Ejima, Kumagai and Arakawa, 2003).

La adición de pequeñas moléculas ha sido utilizada para prevenir la agregación durante la renaturalización, estas moléculas se pueden clasificar en: desnaturalizantes (urea, guanidina-HCl, etc.), estabilizadores (glicerol, sacarosa, polietilenglicol, etc.) e inhibidores de agregación (arginina, prolina, glicinamida, etc.) (Yamaguchi and Miyazaki, 2014). La glicina se ha descrito como una molécula estabilizadora de proteínas, ya que reduce su área de contacto con el agua (solvatación), protegiendo su estructura a cambios de pH, temperatura y presencia de agentes desnaturalizantes (Arakawa and Timasheff, 1985; Pikal-Cleland, Cleland, Anchordoquy and Carpenter, 2002).

Muchos son los métodos descritos para replegar a un péptido, como por ejemplo, dilución, diálisis o por cromatografía. Sin embargo el plegamiento depende de la solubilidad de la proteína, las condiciones de renaturalización o la presencia de impurezas, por lo que elegir un método con el mayor rendimiento se convierte en un experimento de prueba y error (Yamaguchi and Miyazaki, 2014). La ventaja del método por dilución es su

practicidad, sin embargo, la concentración de la muestra es altamente reducida por lo que se requiere de un proceso de concentración posterior. Por otro lado, la diálisis permite mantener la concentración original de la proteína, sin embargo, si la proteína precipita al renaturalizarse, esta puede quedar retenida en la membrana dificultando su recuperación (Li, Su and Janson, 2004).

Gao, *et al.* (2013b) describen la recuperación de actividad de la conotoxina recombinante GeXIVAWT, mediante dilución en 20 mM de Tris-HCl empleando diferentes aditivos, de los cuales, Tris-HCL y Tris-HCL adicionado con glicina 10 mM o GSH 1 mM/ GSSG 0.5 mM, obtuvieron los mejores rendimientos (> 60 %). En un intento por renaturalizar a cal26a-His_r, se empleó el método por dilución, utilizando Tris-HCL 20 mM con y sin glicina 10 mM, como agente estabilizante, pero la proteína se precipitó rápidamente, por lo que se decidió utilizar otra alternativa para su plegamiento.

El método de renaturalización por cromatografía previene la formación de agregados por interacción de las proteínas cuando están parcialmente plegadas, ya que se encuentran espacialmente limitadas al quedar unidas a la matriz. A diferencia de otros métodos, el plegamiento se puede llevar a cabo en un solo paso o por reducción en gradiente, del agente desnaturizante, de forma rápida y con un consumo bajo de solución renaturalizante (De Bernardez-Clark and Georgiou, 1991). Además es posible recuperar la proteína insoluble, mediante eluciones adicionales con agente desnaturizante.

Diversos trabajos han empleado la cromatografía como método de renaturalización, en especial mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) que permite la purificación y renaturalización en un solo paso de péptidos con etiqueta de histidinas (Chang, Tsai, Tseng and Liang, 2001; Glynnou, Ioannou and Christopoulos, 2003; Razeghifard, 2004; Shi, Jiang, Chen and Tang, 2003; Wagner *et al.*, 1999).

La renaturalización de cal26a-His empleando IMAC, permitió obtener a la proteína soluble en condiciones nativas, siendo la proteína renaturalizada con Tris-HCl adicionando glicina la de mayor rendimiento, 60 µg contra 39 µg obtenidos con Tris-HCl, sin embargo, una cantidad de proteína quedó retenida en la columna sugiriendo que se precipitó, eluyendo hasta que se adicionó urea nuevamente (Figura 29 carriles 8 y 9). Otras

soluciones de renaturalización deben ser evaluadas para mejorar el rendimiento del proceso, como GSH/GSSG la cual obtuvo el mayor rendimiento para la renaturalización de la conotoxina GeXIVAWT (Gao *et al.*, 2013b).

Un estudio preliminar de actividad de cal26a-His_r, mostró una tendencia en la disminución de la actividad metabólica de *M. tuberculosis*, siendo cal26a_r-2 (8 µg/mL) la de mayor efecto, sin embargo, el vehículo de dilución (PBS, pH 8.0) mostró también tener efecto, una causa posible es que el pH de la solución afectó el crecimiento de la micobacteria, ya que esta presenta un crecimiento óptimo en un rango de pH de 5.8-6.5 (Portaels and Pattyn, 1982). Para confirmar si cal26a_r tiene un efecto significativo sobre la micobacteria deberán ser evaluadas concentraciones más altas de la proteína recombinante junto con otra solución que no interfiera con el desarrollo de la micobacteria y con la estabilidad de la proteína, ya que ésta presenta un punto isoeléctrico promedio de 8.7, lo que sugiere inestabilidad del péptido a pH ácido (Chi, Krishnan, Randolph and Carpenter, 2003).

Al comparar con lo reportado por Bernáldez Sarabia (2013) respecto a la concentración mínima inhibitoria de la conotoxina nativa (4.08 µg/mL), podemos considerar que la forma recombinante no conservó la misma capacidad, lo cual puede atribuirse a la falta en la amidación C-terminal, la ausencia de hidroxiprolinas o al efecto de presencia de las etiquetas de histidinas y *pe/B*, las cuales se han observado tienen un efecto en la afinidad de las conotoxinas recombinantes pero no así en su actividad, lo cual podría ser el caso de cal26a_r (Bruce *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013; Hernandez-Cuebas and White, 2012).

Cabe resaltar que este es el primer trabajo realizado en la Unidad de Desarrollo Biomédico, CICESE, relacionado con la expresión recombinante de una conotoxina (cal26a), con el cual se sientan las bases para su posterior aplicación en la obtención de material suficiente para un acercamiento en el análisis estructural de ca26a, de su posible blanco molecular o de otras posibles aplicaciones antimicrobianas. Sin descartar su aplicación en otras conotoxinas, así como una alternativa para la inserción de mutaciones sitio-dirigidas para mejorar su afinidad, como lo descrito por Papineni, *et al.* (2001) en la conotoxina α -MI.

Capítulo 9. Conclusiones

Se diseñaron cinco construcciones para la expresión recombinante de la conotoxina al26a, en las cuales difería la posición de la etiqueta de histidinas (6xHistag) en sus regiones N- y C-terminal, cal26a-His y His-cal26a¹⁻², o contaban con un sitio de proteólisis, His-SP-cal26a¹⁻².

Las condiciones óptimas para la expresión de cal26a-His_r fueron 1000 µM de IPTG, 21 °C y 12 h, sin embargo esta se expresó en forma de cuerpos de inclusión y permaneció unida a *pe/B*, el rendimiento obteniendo fue de 1.19 mg/L.

Para el caso de las construcciones His-cal26a¹⁻² estas no fueron detectadas por western blot, lo que se sugiere no fueron expresadas, His-SP-cal26a² se expresó en bajas cantidades y su recorrido sugiere que permaneció unido a *pe/B*.

Se renaturalizó cal26a-His_r empleando dos soluciones, Tris-HCl 20 mM y Tris-HCl 20 mM adicionado con glicina 10 mM, siendo esta última donde se obtuvo el mayor rendimiento de solubilización.

El análisis de actividad de cal26a-His_r sugiere una tendencia en la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* (H37Rv), mostrándose una ligera inhibición con la muestra cal26a-2 (proteína renaturalizada con Tris-HCl adicionado con glicina) a una concentración de 8 µg/mL.

Lista de referencias bibliográficas

- Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J. and Alewood, P. F. (2014). Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chemical Reviews*, 114(11), 5815–5847.
- Andersen, D. C. and Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 117–123.
- Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 47(3), 411–414.
- Azam, L. and McIntosh, J. M. (2012). Molecular basis for the differential sensitivity of rat and human $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs to α -conotoxin RgIA. *Journal of Neurochemistry*, 122(6), 1137–1144.
- Bandyopadhyay, P. K., Colledge, C. J., Walker, C. S., Zhou, L.-M., Hillyard, D. R. and Olivera, B. M. (1998). Conantokin-G Precursor and Its Role in γ -Carboxylation by a Vitamin K-dependent Carboxylase from a Conus Snail. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5447–5450.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411–421.
- Becker, S. and Terlau, H. (2008). Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), 1–9.
- Bernáldez Sarabia, J. (2008). *Caracterización electrofisiológica de toxinas peptídicas del caracol marino Conus californicus en canales iónicos de calcio*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 106pp.
- Bernáldez Sarabia, J. (2013). *Aislamiento y caracterización de toxinas de caracoles marinos del género Conus con actividad en Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 113pp.
- Bingham, J.-P., Mitsunaga, E. and Bergeron, Z. L. (2010). Drugs from slugs--past, present and future perspectives of omega-conotoxin research. *Chemico-Biological Interactions*, 183(1), 1–18.
- Bruce, C., Fitches, E. C., Chougule, N., Bell, H. A. and Gatehouse, J. A. (2011). Recombinant conotoxin, TxVIA, produced in yeast has insecticidal activity. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 58(1), 93–100.

- Buczek, O., Bulaj, G. and Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 62(24), 3067–3079.
- Buczek, O., Olivera, B. M. and Bulaj, G. (2004). Propeptide does not act as an intramolecular chaperone but facilitates protein disulfide isomerase-assisted folding of a conotoxin precursor. *Biochemistry*, 43(4), 1093–1101.
- Buczek, O., Wei, D., Babon, J. J., Yang, X., Fiedler, B., Chen, P., ... Norton, R. S. (2007). Structure and Sodium Channel Activity of an Excitatory I1-Superfamily Conotoxin. *Biochemistry*, 46(35), 9929–9940.
- Cabrera Rojo, I. (1999). Cardioprotección: un triunfo de la biomedicina del siglo XX. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(2), 146–150.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., ... Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327–1333.
- Castellanos-Mendoza, A., Castro-Acosta, R. M., Olvera, A., Zavala, G., Mendoza-Vera, M., García-Hernández, E., ... Valdez-Cruz, N. A. (2014). Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 13, 137.
- Chang, S.-Y., Tsai, P.-C., Tseng, C.-S. and Liang, P.-H. (2001). Refolding and Characterization of a Yeast Dehydrolipoyl Diphosphate Synthase Overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 23(3), 432–439.
- Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W. and Carpenter, J. F. (2003). Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research*, 20(9), 1325–1336.
- Choi, J. H. and Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 625–635.
- CICESE. (2013). *Unidad de Desarrollo Biomédico*. Recuperado el 8 de agosto de 2014, de <http://udb.cicese.mx/>
- Correa, A. and Oppezzo, P. (2015). Overcoming the solubility problem in *E. coli*: available approaches for recombinant protein production. In *Insoluble Proteins* (pp. 27-44). Springer New York.

- Craig, A. G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., ... Olivera, B. M. (1999). Contulakin-G, an O-Glycosylated Invertebrate Neurotensin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13752–13759.
- Cruz, L. J., Gray, W. R., Olivera, B. M., Zeikus, R. D., Kerr, L., Yoshikami, D. and Moczydlowski, E. (1985). *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(16), 9280–9288.
- Cruz, L. J., Gray, W. R., Yoshikami, D. and Olivera, B. M. (1985). *Conus* Venoms: A Rich Source of Neuroactive Peptides. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 4(2), 107–132.
- De Bernardez-Clark, E. and Georgiou, G. (Eds.) (1991). *Protein Refolding*. (Vol. 470). Washington, DC, American Chemical Society.
- Denac, H., Mevissen, M. and Scholtysik, G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(6), 453–479.
- Doglia, S. M. and Lotti, M. (Eds.). (2014). *Protein Aggregation in Bacteria*. Hoboken, NY, John Wiley and Sons, Inc.
- Duda, T. F., Kohn, A. J. and Palumbi, S. R. (2001). Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological Journal of the Linnean Society*, 73(4), 391–409.
- Durek, T. and Craik, D. J. (2015). Therapeutic conotoxins: a US patent literature survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 1–15.
- Dutertre, S., Jin, A.-H., Vetter, I., Hamilton, B., Sunagar, K., Lavergne, V., ... Lewis, R. J. (2014). Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature Communications*, 5.
- Ekberg, J., Craik, D. J. and Adams, D. J. (2008). Conotoxin modulation of voltage-gated sodium channels. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(11), 2363–2368.
- England, L. J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A. G., Gulyas, J., Akhtar, M., ... Olivera, B. M. (1998). Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5376), 575–578.
- Esposito, D., & Chatterjee, D. K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 353–8.

- Eton Bioscience Inc. (2015). *Peptide Synthesis Service*. Recuperado el 26 de septiembre de 2015, de http://www.etonbio.com/peptides/peptide_service.php
- Everett-Patriquin, M. B. (1998). *pET22b (+) vector map*. Recuperado de [https://www.emdmillipore.com/US/en/product/pET-22b %28 %2B %29-DNA---Novagen,EMD_BIO-69744?bd=1#documentation](https://www.emdmillipore.com/US/en/product/pET-22b-%28-%2B-%29-DNA---Novagen,EMD_BIO-69744?bd=1#documentation)
- Fainzilber, M., Gordon, D., Hasson, A., Spira, M. E. and Zlotkin, E. (1991). Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 202(2), 589–595.
- Fainzilber, M., Nakamura, T., Lodder, J. C., Zlotkin, E., Kits, K. S. and Burlingame, A. L. (1998). gamma-Conotoxin-PnVIIA, a gamma-carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry*, 37(6), 1470–1477.
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z. and García-Fruitós, E. (2015). General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 1–24.
- Filmer, R. M. (2001). *A Catalogue of Nomenclature and Taxonomy in the Living Conidae, 1758-1998*. Backhuys.
- Fischer, B., Sumner, I. and Goodenough, P. (1993). Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(1), 3–13.
- Gao, B., Zhangsun, D., Hu, Y., Wu, Y., Sheng, L., Fang, L., ... Luo, S. (2013a). Expression and secretion of functional recombinant μ O-conotoxin MrVIB-His-tag in *Escherichia coli*. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 72, 81–89.
- Gao, B., Zhangsun, D., Wu, Y., Lin, B., Zhu, X. and Luo, S. (2013b). Expression, renaturation and biological activity of recombinant conotoxin GeXIVAWT. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1223–30.
- García-Fruitós, E. (Ed.). (2015). *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*. New York, NY, Humana Press.
- GenScript. (2015a). *Codon Usage Frequency Table*. Recuperado el 22 de septiembre de 2015, de http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/codon_freq_table
- GenScript. (2015b). *Peptide Synthesis-Peptide Modifications*. Recuperado el 26 de septiembre de 2015, de http://www.genscript.com/peptide_modification.html

- GenScript. (2015c). *Rare Codon Analysis*. Recuperado el 23 de septiembre de 2015, de http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis
- Ghomashchi, F. (1995). Conodipine-M, a Novel Phospholipase A(2) Isolated from the Venom of the Marine Snail *Conus magus*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3518–3526.
- GL Biochem. (2009). *Custom peptide service*. Recuperado el 26 de septiembre de 2015, de <http://www.glbiochem.com/en/product/customize.aspx>
- Glynou, K., Ioannou, P. C. and Christopoulos, T. K. (2003). One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 27(2), 384–390.
- Gray, W. R., Luque, A., Olivera, B. M., Barrett, J. and Cruz, L. J. (1981). Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4734–4740.
- Guillén López, A. (2011). *Caracterización bioquímica de toxinas del veneno del caracol marino Conus californicus que interactúan con el análogo del receptor de acetilcolina AChBP*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 63pp.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. and Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 346–353.
- Hannig, G. and Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 54–60.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press.
- Harvey, A. L. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon*, 92, 193–200.
- Hernandez-Cuebas, L. M. and White, M. M. (2012). Expression of a biologically-active conotoxin PrIIIE in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 6–10.
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (Vol. 507). Sunderland, MA, Sinauer
- International Association for the Study of Pain. (2015). *IASP Taxonomy*. Recuperado el 23 de julio de 2015, <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>

- Invitrogen TM. (2003). *Discover a star-studded cast of competent cells: for all your transformation needs*. Recuperado de <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/710-021761-B Comp Cell Fin.pdf>
- Izaguirre, V. and Zavaleta, A. I. (1998). Canales de calcio voltajes dependientes. *Ciencia e Investigación*, 1(1), 49-61.
- Jain, K. K. (2011). *The Handbook of Neuroprotection*. New York, NY, Humana Press.
- Jiménez Flores, S. M. (2011). *Aislamiento y caracterización de toxinas de Anthopleura sp y tres caracoles marinos del género Conus con efecto en la respuesta nociceptiva*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 80pp.
- Juárez Moreno, K. O. (2005). *Caracterización electrofisiológica del veneno del caracol marino Conus californicus en canales iónicos de potasio*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 138pp.
- Kaas, Q., Westermann, J.-C. and Craik, D. J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 55(8), 1491–509.
- Kaas, Q., Westermann, J.-C., Halai, R., Wang, C. K. L. and Craik, D. J. (2008). ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics*, 24(3), 445–446.
- Kajava, A. V, Zolov, S. N., Kalinin, A. E. and Nesmeyanova, M. A. (2000). The net charge of the first 18 residues of the mature sequence affects protein translocation across the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2163–2169.
- Kang, T. S., Vivekanandan, S., Jois, S. D. S. and Kini, R. M. (2005). Effect of C-terminal amidation on folding and disulfide-pairing of alpha-conotoxin Iml. *Angewandte Chemie*, 44(39), 6333–6337.
- Kern, S. E., Allen, J., Wagstaff, J., Shafer, S. L. and Yaksh, T. (2007). The pharmacokinetics of the conopeptide contulakin-G (CGX-1160) after intrathecal administration: an analysis of data from studies in beagles. *Anesthesia and Analgesia*, 104(6), 1514–1520.
- Kerr, L. M. and Yoshikami, D. (1984). A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature*, 308(5956), 282–284.

- Kohn, A. J., Saunders, P. R. and Wiener, S. (1960). Preliminary studies on the venom of the marine snail conus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 90(3), 706–725.
- Kumar, G. S., Ramasamy, P., Sikdar, S. K. and Sarma, S. P. (2005). Overexpression, purification, and pharmacological activity of a biosynthetically derived conopeptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(3), 965–972.
- Lee, S., Kim, Y., Back, S. K., Choi, H.-W., Lee, J. Y., Jung, H. H., ... Kim, J. Il. (2010). Analgesic effect of highly reversible ω -conotoxin FVIA on N type Ca^{2+} channels. *Molecular Pain*, 6(1), 97.
- Lewis, R. J. (2015). Case Study 1: Development of the Analgesic Drugs Prialt® and Xen2174 from Cone Snail Venoms In: G. F. King (Ed.), *Venoms to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics*, 245.
- Li, M., Su, Z.-G. and Janson, J.-C. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, 33(1), 1–10.
- LifeTein®. (2015). *Custom cyclic peptide synthesis with disulfide bond*. Recuperado el 26 de septiembre de 2015, de <http://www.lifetein.com/cyclic-peptide-disulfide-bonds.html>
- Lippincott, J. and Apostol, I. (1999). Carbamylation of cysteine: a potential artifact in peptide mapping of hemoglobins in the presence of urea. *Analytical Biochemistry*, 267(1), 57–64.
- Macherey-Nagel. (2013). *Purification of His-tag proteins User manual*. Recuperado de http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Protino/UM_ProtinoNi-NTA.pdf
- Martínez Hernández, L., López Vera, E. y Aguilar Ramírez, M. B. (2014). El veneno de los caracoles marinos y su paradójico uso médico. *Revista Digital Universitaria*, 15(11).
- McGivern, J. G. (2007). Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3(1), 69–85.
- McIntosh, J. M., Foderaro, T. A., Li, W., Ireland, C. M. and Olivera, B. M. (1993). Presence of serotonin in the venom of *Conus imperialis*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 31(12), 1561–1566.
- McIntosh, J. M., Hasson, A., Spira, M. E., Gray, W. R., Li, W., Marsh, M., ... Olivera, B. M. (1995). A New Family of Conotoxins That Blocks Voltage-gated Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), 16796–16802.

- Medina Elizalde, J. (2012). *Efecto del veneno de Conus princeps y Anthopleura sp. sobre el canal TRPV1*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 87pp.
- Mori, H., & Ito, K. (2001). The Sec protein-translocation pathway. *Trends in Microbiology*, 9(10), 494–500.
- Motin, L. and Adams, D. J. (2008). Omega-Conotoxin inhibition of excitatory synaptic transmission evoked by dorsal root stimulation in rat superficial dorsal horn. *Neuropharmacology*, 55(5), 860–864.
- Mukhopadhyay, A. (1997). Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 56, 61–109.
- Nakamura, H., Kobayashi, J., Ohizumi, Y. and Hirata, Y. (1982). The occurrence of arachidonic acid in the venom duct of the marine snail *Conus textile*. *Experientia*, 38(8), 897.
- NCBI. (2005). *Conantokin-G*. Recuperado el 2 de agosto de 2015, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P07231.2>
- Norton, R. S. and Olivera, B. M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon*, 48(7), 780–798.
- Novagen®. (2003). *pET System Manual* (10th ed., Vol. 2).
- Olivera, B. M. (2003). Conus Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species, 33(2002), 25–47.
- Olivera, B. M. (2006). Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31173–31177.
- Olivera, B. M., Cruz, L. J., De Santos, V., LeCheminant, G., Griffin, D., Zeikus, R., ... Varga, J. (1987). Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry*, 26(8), 2086–2090.
- Olivera, B. M. and Teichert, R. W. (2007). Diversity of the neurotoxic Conus peptides: a model for concerted pharmacological discovery. *Molecular Interventions*, 7(5), 251–260.
- Organización Mundial de la Salud. (2014). Global tuberculosis report 2014. WHO. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf

- Oroz Parra, I. (2011). *Aislamiento e identificación de agentes citotóxicos provenientes del caracol marino Conus ximenes con actividad contra una línea celular de cáncer de colon (LIM-1215)*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 57pp.
- Palmer, I. and Wingfield, P. T. (2012). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 6-3.
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. and Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 267, 15–52.
- Papineni, R. V, Sanchez, J. U., Baksi, K., Willcockson, I. U. and Pedersen, S. E. (2001). Site-specific charge interactions of alpha-conotoxin MI with the nicotinic acetylcholine receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23589–23598.
- Patra, A. K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L. C. and Panda, A. K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18(2), 182–192.
- Peng, C., Chen, W., Sanders, T., Chew, G., Liu, J., Hawrot, E. and Chi, C. (2010). Chemical synthesis and characterization of two α 4/7-conotoxins. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(10), 745–53.
- Peters, H., O'Leary, B. C., Hawkins, J. P., Carpenter, K. E. and Roberts, C. M. (2013). Conus: First Comprehensive Conservation Red List Assessment of a Marine Gastropod Mollusc Genus. *PLoS ONE*, 8(12).
- Petrel, C., Hocking, H. G., Reynaud, M., Upert, G., Favreau, P., Biass, D., ... Servent, D. (2013). Identification, structural and pharmacological characterization of τ -CnVA, a conopeptide that selectively interacts with somatostatin sst3 receptor. *Biochemical Pharmacology*, 85(11), 1663–71.
- Pi, C., Liu, J., Wang, L., Jiang, X., Liu, Y., Peng, C., ... Xu, A. (2007). Soluble expression, purification and functional identification of a disulfide-rich conotoxin derived from *Conus litteratus*. *Journal of Biotechnology*, 128(1), 184–193.
- Pikal-Cleland, K. A., Cleland, J. L., Anchordoquy, T. J. and Carpenter, J. F. (2002). Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(9), 1969–1979.
- Portaels, F. and Pattyn, S. R. (1982). Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. *Annales de Microbiologie*, 133(2), 213–221.

- QIAGEN. (2003). *The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins* (5th ed., Vol. 79).
- Razeghihifard, M. R. (2004). On-column refolding of recombinant human interleukin-4 from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 37(1), 180–186.
- Rigby, A. C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D. E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., ... Stenflo, J. (1999). A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5758–63.
- Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Rubio Pitones, S. V. (2009). *Identificación y caracterización de los componentes citotóxicos del veneno del caracol Conus californicus sobre diferentes líneas celulares de cáncer*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 68pp.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY, CSHL Press.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379.
- Schmidtko, A., Lötsch, J., Freynhagen, R. and Geisslinger, G. (2010). Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet*, 375(9725), 1569–1577.
- Schmidtko, A., Tegeder, I. and Geisslinger, G. (2009). No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends in Neurosciences*, 32(6), 339–346.
- Scott, D. A., Wright, C. E. and Angus, J. A. (2002). Actions of intrathecal ω -conotoxins CVI, GVIA, MVIIA, and morphine in acute and neuropathic pain in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 451(3), 279–286.
- Sharpe, I. A., Gehrmann, J., Loughnan, M. L., Thomas, L., Adams, D. A., Atkins, A., ... Lewis, R. J. (2001). Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neuroscience*, 4(9), 902–907.
- Shi, Y., Jiang, C., Chen, Q. and Tang, H. (2003). One-step on-column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(2), 475–482.

- Singh, S. M. and Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310.
- Sørensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–28.
- Spiezia, M. C., Chiarabelli, C. and Polticelli, F. (2012). Recombinant expression and insecticidal properties of a *Conus ventricosus* conotoxin-GST fusion protein. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 60(5), 744–51.
- Terlau, H. and Olivera, B. M. (2004). Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1), 41–68.
- Terlau, H., Shon, K. J., Grilley, M., Stocker, M., Stühmer, W. and Olivera, B. M. (1996). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*, 381(6578), 148–151.
- Thapa, P., Espiritu, M. J., Cabalteja, C. C. and Bingham, J.-P. (2014). Conotoxins and their regulatory considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*, 70(1), 197–202.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). *Custom Peptide Modifications Selection Guide*. Recuperado el 26 de septiembre de 2015, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/custom-peptide-synthesis-services.html>
- Tolia, N. H. and Joshua-Tor, L. (2006). Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nature Methods*, 3(1), 55–64.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. and Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 1–8.
- Twede, V. D., Miljanich, G., Olivera, B. M. and Bulaj, G. (2009). Neuroprotective and cardioprotective conopeptides: an emerging class of drug leads. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 12(2), 231–239.
- UCLA, M. B. I. (2014). *Biopolymer Laboratory*. Recuperado el 9 de agosto de 2014, de <http://www.mbi.ucla.edu/services/biopolymer-laboratory>
- Wagner, B., Krebitz, M., Buck, D., Niggemann, B., Yeang, H. Y., Han, K.-H., ... Breiteneder, H. (1999). Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(5), 1084–1092.

- Wang, L., Pi, C., Liu, J., Chen, S., Peng, C., Sun, D., ... Xu, A. (2008). Identification and characterization of a novel O-superfamily conotoxin from *Conus litteratus*. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 14(10), 1077–1083.
- Wingfield, P. T., Palmer, I. and Liang, S. M. (2001). Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 6-5.
- Wu, Y., Wang, L., Zhou, M., Jiang, X., Zhu, X., Chen, Y., ... Xu, A. (2014). Soluble expression, purification and functional identification of the framework XV conotoxins derived from different *Conus* species. *Peptides*, 56, 77–83.
- Xia, Z., Chen, Y., Zhu, Y., Wang, F., Xu, X. and Zhan, J. (2006). Recombinant omega-conotoxin MVIIA possesses strong analgesic activity. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 20(5), 275–281.
- Yamaguchi, H. and Miyazaki, M. (2014). Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, 4(1), 235–251.
- Ye, M., Khoo, K. K., Xu, S., Zhou, M., Boonyalai, N., Perugini, M. A., ... Norton, R. S. (2012). A helical conotoxin from *Conus imperialis* has a novel cysteine framework and defines a new superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 14973–14983.
- Yuan, D.-D., Han, Y.-H., Wang, C.-G. and Chi, C.-W. (2007). From the identification of gene organization of alpha conotoxins to the cloning of novel toxins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(8), 1135–1149.
- Zhang, S. J., Yang, X.-M., Liu, G. S., Cohen, M. V, Pemberton, K. and Downey, J. M. (2003). CGX-1051, a peptide from *Conus* snail venom, attenuates infarction in rabbit hearts when administered at reperfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 42(6), 764–771.
- Zhou, L.-M., Szendrei, G. I., Fossom, L. H., Maccecchini, M.-L., Skolnick, P. and Otvos, L. (2002). Synthetic Analogues of Conantokin-G: NMDA Antagonists Acting Through a Novel Polyamine-Coupled Site. *Journal of Neurochemistry*, 66(2), 620–628.
- Zhou, M., Wang, L., Wu, Y., Liu, J., Sun, D., Zhu, X., ... Xu, A. (2015). Soluble expression and sodium channel activity of It16a, a novel framework XVI conotoxin from the M-superfamily. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 98, 5–11.

Anexos

A 1. Análisis del gen cal26a

Se analizó la secuencia TxCC-KD, que codifica para la conotoxina cal26a, para identificar codones raros para *Escherichia coli*, empleando la aplicación proporcionada por Genscript. La secuencia examinada fue la siguiente:

- TxCC-KD

AGA CCA AAA TGT TGC TGT GTC TGC GGT GTT GTC GGA AGA AAA TGC
TGT TCT ACC TGG AAA GAT TGT CAT CCT GTT CAC TTG CCT TGC CCT TCA
TCA

De la gráfica generada (Figura 31) se observan 14 codones con una frecuencia relativa (uso por *E. coli*) menor al 80 %, siendo AGA y TTG los codones menos usados por la bacteria.

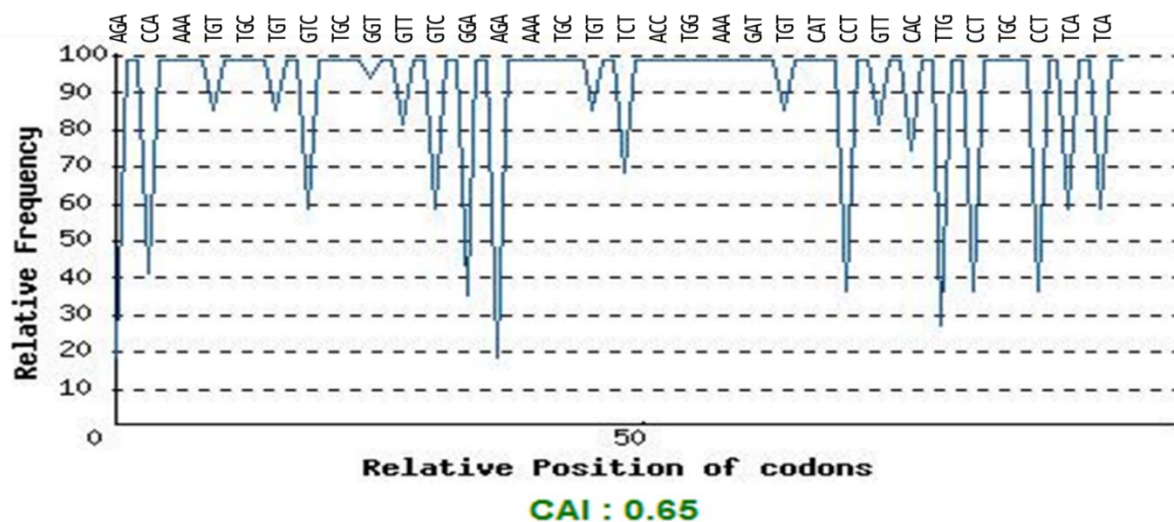


Figura 31 Análisis de frecuencia de codones de TxCC-KD en *Escherichia coli*. Un índice de adaptación de codones (CAI) menor a 0.8 aumenta la probabilidad de una expresión pobre. Realizado en la aplicación de GenScript (2015).

A 2. Construcciones cal26a

Tabla 7 Glosario de las construcciones de cal26a.

Nombre	Significado
His-cal26a ¹	cal26a con etiqueta de histidinas en el amino terminal.
His-cal26a ²	cal26a con etiqueta de histidinas en el amino terminal y con glicina en el carboxilo terminal.
Cal26a-His	cal26a con etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal.
His-SP-cal26a ¹	cal26a con sitio de proteólisis entre la etiqueta de histidinas en el amino terminal y la conotoxina.
His-SP-cal26a ²	cal26a con glicina en el carboxilo terminal y sitio de proteólisis entre la etiqueta de histidinas en el amino terminal y la conotoxina.
pET22b-cal26a	cal26a en sus diferentes presentaciones (His-, His-SP- o –His) insertado en el vector pET-22b(+) entre los sitios <i>Nco</i> I y <i>Xho</i> I.
TOP10-pET22b-cal26a	Células de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con en el vector pET-22b(+) el cual contiene a cal26a en sus diferentes presentaciones. Cepa de almacenamiento del plásmido.
BL21(DE3)-pET22b-cal26a	Células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas con en el vector pET-22b(+) el cual contiene a cal26a en sus diferentes presentaciones. Cepa de expresión recombinante.

Tabla 8 Alcance obtenido para cada una de las construcciones de cal26a.

Construcción	Clonación	Expresión	Purificación	Bioactividad	Observaciones
His-cal26a ¹	✓				No se observó su expresión
His-cal26a ²	✓				No se observó su expresión
cal26a-His	✓	✓	✓	✓	Se obtuvo 1.19 mg y mostró actividad ligera
His-SP-cal26a ¹	✓				No se evaluó su expresión
His-SP-cal26a ²	✓	✓			Expresada en bajas cantidades

A 3. Alineamiento de nucleótidos

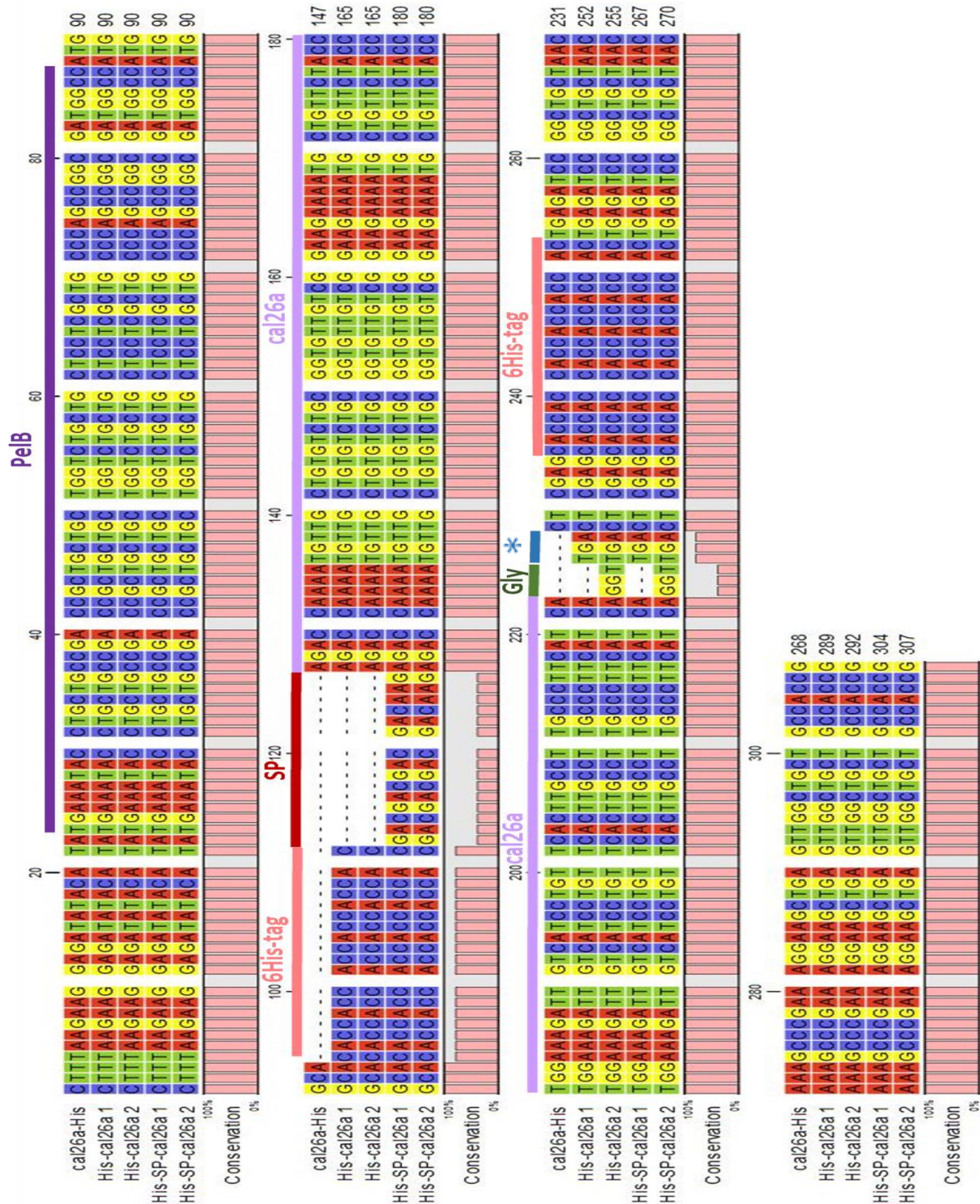


Figura 32 Alineamiento de secuencia nucleotídica de las construcciones para la expresión de cal26a recombinante. En asterisco (*) se marca el codón de paro.

A 4. Carga neta cal26a

Kajava *et al.* (2000) describieron que la capacidad de *E. coli* para exportar está relacionada con la carga neta de sus primeros 14 aminoácidos, la cual es inhibida cuando se presenta una carga positiva ($\geq +1$). Este cálculo se obtiene de la sumatoria de los aminoácidos positivos, arginina (R) y lisina (K), menos la cantidad de aminoácidos negativos, aspartato (D) y glutamato (E). Por ejemplo, cal26a presenta en su secuencia completa cinco aminoácidos positivos y uno negativo dando una carga neta de +4, mientras que en sus primeros catorce aminoácidos solo tiene cuatro aminoácidos positivos dando una carga para esta zona de +4. En la Tabla 9 se muestra la carga neta y de los primeros catorce aminoácidos para las diferentes construcciones de cal26a y de las conotoxinas expresadas por Gao, *et al.* (2013a, 2013b), en azul aparecen los aminoácidos positivos mientras que en rojo los de carga negativa, la región que comprende los primeros catorce aminoácidos aparece subrayada.

Tabla 9 Cuadro comparativo de la carga de las diferentes construcciones de cal26a y de las conotoxinas expresadas por Gao, *et al.* (2013a, 2013b)

Conotoxina	Secuencia	Soluble	Carga neta	Carga 14 aa
cal26a-His	<u>RPKCCCVCGVVGRK</u> CCSTW KD CHPVHLPCP SSHHHHHH	No	+4	+4
His-cal26a	<u>HHHHHHRPKCCCVCGVVGRK</u> CCSTW KD CHP VHLPCPSS	No	+4	+2
His-SP-cal26a	<u>HHHHHHDDDDKRPK</u> CCCVCGVVGR K CCSTW KD CHPVHLPCPSS	No	+1	-1
μ O-MrVIB	<u>D</u> TAC S <u>KKW</u> E YCIVPILGFVYCCPGLICGPFV	SI	0	0
GeXIVAWT	<u>D</u> TT C <u>RSSGRYCR</u> SPYD CRRRYCRRIT D ACV	No	+5	+2

A 5. Cuantificación por Micro-BCA

Para determinar la concentración de las proteínas se empleó el kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific™), donde se aprovecha la propiedad de las proteínas por reducir el Cu^{+2} a Cu^{+1} , donde este último interacciona con el ácido bicinconínico (BCA) formando un compuesto color púrpura el cual es cuantificable por espectrofotometría a 562 nm.

Para lograr determinar la concentración de la muestra, se construyó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar y a partir de una solución stock (2 mg/ml) se realizaron diluciones empleando como diluyente a la solución en la que se encuentra la proteína de interés (Tabla 10), para obtener las concentraciones de 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 10 Diluciones para la construcción de la curva estándar.

Concentración	Cantidad BSA	Cantidad Diluyente
40 $\mu\text{g/mL}$	20 μL de BSA [2 mg/mL]	980 μL
20 $\mu\text{g/mL}$	500 μL de BSA [40 $\mu\text{g/mL}$]	500 μL
10 $\mu\text{g/mL}$	500 μL de BSA [20 $\mu\text{g/mL}$]	500 μL
5 $\mu\text{g/mL}$	500 μL de BSA [10 $\mu\text{g/mL}$]	500 μL
2.5 $\mu\text{g/mL}$	500 μL de BSA [5 $\mu\text{g/mL}$]	500 μL
1 $\mu\text{g/mL}$	400 μL de BSA [2.5 $\mu\text{g/mL}$]	600 μL
0.5 $\mu\text{g/mL}$	500 μL de BSA [1 $\mu\text{g/mL}$]	500 μL

Previo a la cuantificación la proteína recombinante se dializó contra agua destilada para eliminar las sales utilizadas en la purificación, debido a que el imidazol y la urea, en concentraciones mayores a 12.5 mM y 3 M respectivamente, interfieren con la reacción de reducción. Para la diálisis se utilizó membrana SnakeSkin (Thermo Fisher Scientific)

con un corte de 3.5 kDa, la muestra se dializó a 4 °C y se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

El ensayo se montó en una placa para ELISA de 96 pozos, donde se agregaron por triplicado 75 µL de cada proteína estándar y de las muestras problema. Se reveló cada pozo con 75 µL de solución de trabajo (relación 1:1).

La placa se leyó en un espectrofotómetro de microplaca EPOCH (BioTek Instruments) a una absorbancia de 562 nm. Finalmente, se construyó la curva graficando las concentraciones estándar contra el promedio corregido de las absorbancias utilizando el software Microsoft Excel (2013) y en base a la ecuación de la recta obtenida se calculó la concentración de las muestras problema.

A 6. Evaluación de la estabilidad del plásmido.

En ocasiones al iniciar la expresión de la proteína recombinante, en el cultivo puede presentarse una acumulación de células que no mantienen al plásmido o son incapaces de expresar a la proteína de interés. Este ensayo permite evaluar el porcentaje de estas células improductivas (Novagen, 2003).

Las clonas BL21(DE3)-pET22b-cal26a-His, BL21(DE3)-pET22b-His-cal26a¹⁻² y BL21 (DE3)-pET22b-His-SP-cal26a² fueron cultivadas en 10 mL de medio LB con carbenicilina 100 µg/mL a 37 °C en agitación constante, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 (±0.1), posteriormente los cultivos fueron diluidos a un factor de 1×10^{-5} y 200 µL de cada dilución fueron sembrados en diferentes placas de medio LB y se incubaron a 37 °C hasta la visualización de colonias (15-18 h), las cuales se contabilizaron. Las placas utilizadas se describen en la Tabla 11.

Tabla 11 Placas para la evaluación de la estabilidad del plásmido y su interpretación.

#	Placa	Interpretación
1	LB	Crecen todas las células viables.
2	LB + carbenicilina 100 µg/mL	Crecen solo las células que retienen el plásmido.
3	LB + IPTG 1mM	Crecen las células que perdieron el plásmido o la habilidad de expresar la proteína de interés.
4	LB + carbenicilina 100 µg/mL + IPTG 1mM	Crecen solo las células que retienen el plásmido pero perdieron la habilidad de expresar la proteína de interés.

Se contabilizaron se colonias obtenidas de cada una de las placas y el resultado obtenido se interpretó de acuerdo a lo descrito en la Tabla 11. El número de colonias en las placas de LB sin aditivos, se reportaron como ‘demasiado numerosas para contar’ (DNPC)

debido a que no fueron suficientemente distinguibles para asegurar el conteo, sin embargo todas las cepas mantuvieron una confluencia semejante, calculando un aproximado de 4210 colonias para BL21(DE3)-pET22b-His-SP-cal26a². Los resultados obtenidos para cada construcción se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12 Colonias obtenidas del ensayo de estabilidad del plásmido en cepas de *E. coli* BL21 (DE3).

#	Placa	pET22b-cal26a-His	pET22b-His-cal26a ¹	pET22b-His-cal26a ²	pET22b-His-SP-cal26a ²
1	LB	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
2	LB + carbenicilina 100 µg/mL	1540	2084	2058	2624
3	LB + IPTG 1mM	1	65	66	45
4	LB + carbenicilina 100 µg/mL + IPTG 1mM	0	15	10	0

De acuerdo a lo descrito en ‘pET System Manual’ (Novagen, 2003) en un cultivo efectivo para la producción de proteínas recombinantes, menos del 2 % de las células crecerán en la placa que contienen solo IPTG y menos del 0.01 % formaran colonias en la placa con antibiótico e IPTG (1 colonia de 10,000).

Este ensayo evidenció la inestabilidad de las construcciones pET22b-His-cal26a¹ y pET22b-His-cal26a² en BL21 (DE3), al tener crecimiento de colonias en la placa 4, sugiriendo una represión de la expresión. Para el caso de BL21(DE3)-pET22b-His-SP-cal26a² aproximadamente el 1 % de las células perdieron el plásmido o la habilidad de expresar la proteína de interés (placa 3), lo cual es consistente con su baja expresión en comparación con BL21(DE3)-pET22b-cal26a-His que obtuvo un 0.02 %.