



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS**

***Expresión Heteróloga de Genes que
Codifican para Toxinas de Alacrán***

T E S I S

que para obtener el grado de

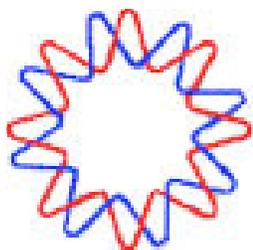
MAESTRA EN CIENCIAS

P r e s e n t a :

L. A. Q. B. Juana María Jiménez Vargas

T u t o r :

Dr. Lourival Domingos Possani Postay



Cuernavaca, Morelos,

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Comité tutorial

Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Dra. Laura Alicia Palomares

Dr. Jorge Paniagua Solís

Jurado de Examen

Presidente: Dr. Mario Soberón Chávez

Secretario: Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Vocal: Dr. Miguel Lara Flores

Suplente: Dr. Joel Osuna Quintero

Suplente: Dr. Ernesto Méndez Salinas

El trabajo experimental y la escritura de esta tesis fueron realizados en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Lourival D. Possani Postay y cotutoría de la Dra. Verónica Quintero Hernández, gracias a los donativos financiados de las siguientes entidades:

Fondo Mixto CONACyT-MORELOS, No. MOR2004 C02-002;

CONACyT FONSECA SSA/IMSS/ISSSTE, No. 14109;

Instituto Bioclon S. A. De C. V y

Beca para maestría CONACyT No. 189579

A mis Padres

José Manuel y Sanjuana

Por su apoyo y confianza en todo momento

A mis Hermanos

Ernesto, Patricia y Manuel

Por su cariño y apoyo incondicional

A mi Familia y Amigos

Agradecimientos

A mí tutor, profesor y amigo Dr. Lourival Domingos Possani Postay, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo íntegro durante la realización de la tesis.

De igual manera agradezco a quienes formaron parte de mi comité tutorial Dr. Jorge Paniagua Solís y a la Dra. Laura A. Palomares, así como a mis sinodales Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Miguel Lara Flores, Dr. Joel Osuna Quintero y Dr. Ernesto Mendez Salinas por la revisión de este trabajo y por sus atinadas observaciones.

A la Dra. Georgina Gurrola Briones, a la Dra. Verónica Quintero Hernández, a la Dra. Elia Diego García y al Dr. Baltazar Becerril por su asesoría en el trabajo experimental, ayuda académica, por su tiempo dedicado a este trabajo y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Fernando Martínez, de manera especial, por sus enseñanzas al inicio de esta formación académica.

A la Dra. Elisa Redaelli por su apoyo en los ensayos de electrofisiología.

A Fernando Zamudio y a Timoteo Olamendi por su ayuda en la determinación de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos requeridas en este trabajo.

A Cesar Batista por su apoyo en la determinación de pesos moleculares por espectroscopia de masas.

A Fredy Coronas, por sus consejos, apoyo y amistad.

A mis amigos Erika, Elia, Lidia, Paty, Itzel, Brenda, Gina, Gerardo, Pável, Ernesto, Luis, Sabino, Miguel, Carmen, José Luis, Isabel, Florentino, Armando, Agustín, por todo su cariño, apoyo incondicional y su amistad.

Al resto de mis compañeros y personal del laboratorio, por sus palabras de aliento y amistad (Cipriano, Cinthia, Carmen, Marisol, Linda, Lidia, Rivelino, Blanca, Ricardo, Omar, Christian, Miriam, Rosalba, Verna).

I N D I C E

	Páginas
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	11
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	15
Toxinas de Na⁺	17
Toxinas de K⁺	21
Alacranismo, problema de Salud Pública	23
ANTECEDENTES.....	25
Ergtoxina1	25
Expresión de toxinas recombinantes	30
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Construcción de vectores de expresión	35
1.1 Vectores de expresión citoplásmica	36
1.2 Vectores de expresión periplásmica	39
2. Obtención de proteínas recombinantes en el citoplasma de la cepa Origami de <i>Escherichia coli</i>	42
2.1 Expresión de las proteínas recombinantes	42
2.2 Purificación por cromatografía de afinidad y digestión de la proteína de fusión	42
2.3 Análisis de inmunoblots y ELISAS	43
2.4 Análisis de proteínas: identificación de la secuencia y determinación de peso molecular por espectroscopia de masas	44
3 Obtención de proteínas recombinantes en el periplasma de la cepa TG1 de <i>Escherichia coli</i>	44

3.1 Expresión de las proteínas recombinantes	44
3.2 Purificación por cromatografía de afinidad y digestión de la proteína de fusión	45
3.3 Análisis de inmunoblots y ELISAS	46
4 Generación de las variantes de la Ergtx1	46
5 Ensayos electrofisiológicos	52
5.1 Cultivo celular	52
5.2 Soluciones	52
5.3 Registros “Patch clamp”	53
5.4 Protocolo experimental y análisis de datos	54
RESULTADOS Y DISCUSIONES	54
1. Clonación del gen <i>ergtx1</i> dentro de dos diferentes vectores de expresión	54
2. Expresión y purificación de la rErgtx1 en la cepa Origami	55
2.1 pThioC + rErgtx	55
2.2 pThioC + His6X-EK-rErgtx	55
2.3 pThioC + Thioredoxina-EK-rErgtx	56
3. Expresión y purificación de la rErgtx1 en la cepa TG1	60
3.1 pSyn1 + Ergtx1, pSyn1 + His6X-EK-Ergtx1	60
3.2 pSyn1 + Thioredoxina-EK-Ergtx1	60
4. Generación de variantes de la Ergtx1	65
4.1 Consideraciones referentes a la interacción canal HERG y la Ergtoxinal	65
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS	72
REFERENCIAS	68

A B R E V I A T U R A S

(ϕ80)	Célula acarreadora del profago lamba ϕ 80	F'	La cepa contiene el plásmido F
(lacZ)M15	Delección parcial del gen β - galactosidasa	<i>glnV</i>	Supresión del codón de paro ámbar (UAG)
ΔU169	Delección del operón <i>lac</i> del cromosoma	<i>gor</i>	Mutación en glutatión reductasa; favorece la formación de puentes disulfuro
aa	Aminoácidos	<i>gyrA96</i>	Mutación en el gen DNA girasa
Acc#	Número de Acceso al Swiss-Prot	HEPES	N-[2-Hydroxietil] piperazina N'- [ácido 2 etanosulfónico]
AGAP	Péptido analgésico antitumor	HERG	Canales <i>erg</i> en humanos
CaCl₂	Cloruro de Calcio	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
CTX	Caribdotoxina	IPTG	Isopropiltiogalactósido
<i>deoR</i>	Gen regulador que sigue la expresión constitutiva de deoxirribosa en la síntesis de genes	KCh	Canal de potasio
DNA	Ácido desoxirribonucleico	KDa	Kilo Daltons
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	KScTx	Toxinas de alacrán que afectan a canales de potasio
EGTA	Ácido etilenglicol -bis(β - aminoetileter) N,N,N',N' tetraacético	Kurtx	Kurtoquina
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente	Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
<i>endA1</i>	Mutación en el gen endonucleasa I.	F-	La cepa no contiene el plásmido F
Ergtx1	Ergtoxin1		

A B R E V I A T U R A S

<i>lacI^q</i>	Sobreproducción del gen que codifica para la proteína represora <i>lac</i>	PDB	Protein Data Bank (Banco de datos de Proteínas)
<i>lacY</i>	Mutación en el gen galactosido permeasa. Bloquea la utilización de lactosa	RBS	Sitio de unión a ribosoma
NaCh	Canal de sodio	<i>recA</i>	Abolición de la recombinación homologa
NaCl	Cloruro de Sodio	<i>relA</i>	Fenotipo relajado; permite la síntesis de RNA en ausencia de síntesis de proteínas
NaScTx	Toxinas de alacrán que afectan a canales de sodio	rErgtx1	Ergtoxin1 recombinante
nm	nanómetros	rpm	revoluciones por minuto
RMN	Resonancia Magnética Nuclear	SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
NTX	Noxiustoxina	supE	Supresor del codón de paro ámbar (UAG)
<i>nupG</i>	Gen regulador que sigue la expresión constitutiva de deoxirribosa en la síntesis de genes	TFA	Ácido Trifluoroacético
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	<i>thi-1</i>	Mutación en el gen del metabolismo de la tiamina. La cepa requiere de tiamina para crecer en medio mínimo
PBS	Buffer de fosfatos salino	Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	<i>trxB</i>	Mutación en thioredoxina reductasa; favorece la formación de puentes disulfuro en el citoplasma
PD	Puentes Disulfuro		

A B R E V I A T U R A S

Aah	<i>Androctonus australis</i>	Cii	<i>Centruroides infamatus infamatus</i>
Amm	<i>Androctonus mauretanicus</i> <i>mauretanicus</i>	CII	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>
Ba	<i>Buthacus arenicola</i>	ClT	<i>Centruroides limpidus</i> <i>tecomanus</i>
Be	<i>Buthus eupeus</i>	Cn	<i>Centruroides noxius</i>
Bj	<i>Buthotus judaicus</i>	CsE	<i>Centruroides sculpturatus Ewing</i>
BmK	<i>Buthus martensii</i> Karsch	Css	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>
Bom	<i>Buthus occinatus mardochei</i>	Lqh	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>
Bot	<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	Lqq	<i>Leiurus quinquestriatus</i> <i>quinquestriatus</i>
Cex	<i>Centruroides exilicauda</i>	Pt	<i>Parabuthus transvaalicus</i>
Cg	<i>Centruroides gracilis</i>	Ts	<i>Tityus serrulatus</i>

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Canal de sodio
- Figura 2.** Alineamiento de secuencias primarias de las toxinas más representativas, que afectan a los canales de Na⁺.
- Figura 3.** Alineamiento de secuencias primarias de las toxinas de alacrán que afectan a los canales de K⁺ de la subfamilia γ
- Figura 4.** Distribución Geográfica de alacranes peligrosos en México.
- Figura 5.** Secuencia primaria de la Ergtx1.
- Figura 6.** Estrutura de la toxina Ergtx1.
- Figura 7.** Estructural tridimensionales de la toxina Ergtx1 y su modo de interacción con el canal HERG.
- Figura 8.** Clonación de los fragmentos Ergtx1, His6X-EK-Ergtx1 y Thioredoxina-EK-Ergtx1, en el vector de expresión citoplásmica pThioC.
- Figura 9.** Clonación de los fragmentos Ergtx1, His6X-EK-Ergtx1 y Thioredoxina-EK-Ergtx1, en el vector de expresión periplásmico pSyn1
- Figura 10.** Ejemplo de como se lleva a cabo la amplificación de las variantes K13A, Y14A, Y17A, M35A, K13A/F37A, Y14A/F37A, Y17A/F37A, K13A/K38A por PCR de empalme.
- Figura 11.** SDS-PAGE al 18% y “Western blotting”.
- Figura 12.** Purificación por HPLC de la proteína Thioredoxina-EK-Ergtx1.
- Figura 13.** SDS-PAGE al 20% del producto de la digestión de la proteína de Thioredoxina-EK-Ergtx1 con EKMax.
- Figura 14.** Gel de tricine-SDS-PAGE de la rErgtx1 producida en los diferentes sistemas de expresión en el periplasma de la cepa TG1.
- Figura 15.** Geles de Tricine-SDS-PAGE.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 16. HPLC del producto de la digestión de la proteína Thioredoxina-EK-Ergtx1.

Figura 17. Purificación de la rErgtx1 por HPLC.

Figura 18. Efectos de la Toxina recombinante Ergtx1 sobre el canal *herg1*.

Figura 19. Alineamiento de secuencias primarias de la toxina Ergtx1 y de las variantes generadas.

Figura 20. Gel Tricine-SDS-PAGE y Western blot de los productos de expresión de las variantes generadas fusionadas a la thioredoxina.

Figura 21. Gel de Tricine-SDS-PAGE de la purificación y digestión de la proteína Thio-EK-Ergtx1M35A.

Figura 22. HPLC y Gel de Tricine-SDS-PAGE de la purificación de la Ergtx1M35A.

Figura 23. Recromatografía correspondiente a la fracción obtenida en el tiempo 35-38.38.

Tabla 1.- Intoxicación por picadura de alacrán.

Tabla 2.- Datos estadísticos sobre casos de picadura de alacrán en México

Tabla 3.- Expresión heteróloga de genes que codifican para toxinas de alacrán.

Tabla 4.- Rendimientos de proteína de fusión y toxina recombinante en el sistema de expresión pThioC.

Tabla 5.- Rendimientos de proteína de fusión y toxina recombinante en el sistema de expresión pSyn1.

R E S U M E N

Las toxinas de alacrán son de gran interés biológico por su capacidad de unirse a los canales iónicos, alterando su función y comunicación celular. Además son elementos esenciales para el desarrollo de antivenenos contra la picadura de alacrán. Por el número de accidentes que se presentan, este tipo de intoxicación representa un problema de salud pública, en los últimos años en México se han registrado alrededor de 250,000 casos anuales.

En los últimos años se ha logrado combatir el problema del alacranismo, mediante el desarrollo y mejoramiento de antivenenos que han logrado reducir el número de muertes. Sin embargo para su obtención se necesita inmunizar caballos con los extractos solubles de las glándulas de alacranes maceradas, para lo que se requiere a un gran número de estos. Como alternativa, se propone producir los componentes responsables de la toxicidad en forma recombinante, con el fin de emplearse como inmunógenos y como herramientas para la caracterización estructural de canales iónicos.

En el presente trabajo se emplea la toxina Ergtx1 aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, como modelo en dos sistemas de expresión heterólogos en *Escherichia coli*: 1) la cepa Origami, que presenta un citoplasma oxidante y por lo tanto permite obtener grandes cantidades de toxinas recombinantes plegadas (10-30 mg/L; Bessette et al., 1999) y 2) la cepa TG1, en donde la toxina es exportada al periplasma.

La Ergtx1 es una toxina formada por 42 residuos de aminoácidos y presenta un motivo α/β estabilizado por 4 puentes disulfuro. Esta toxina se caracteriza por actuar específicamente sobre los canales de potasio HERG, que se encuentran en células del corazón, cerebro, tumorales y en ganglios del sistema nervioso simpático periférico.

Con ambos sistemas de expresión se ha logrado la producción de la proteína Ergtx1 y particularmente con el sistema de la cepa TG1 en donde el rendimiento fue de 100 µg de por litro de cultivo. La Ergtx1 recombinante se obtuvo de forma funcionalmente plegada, lo que se verificó por ensayos de electrofisiología.

Para analizar la relación estructura-función de la Ergtx1 en su interacción con el canal de potasio HERG se generaron variantes de la toxina, que permiten proponer el papel funcional y/o estructural de los residuos que pudiesen estar involucrados.

Aquí representamos la construcción de las mutantes: K13A, Y14A, Y17A, M35A, F37A, K38A, K13A/F37A, Y14A/F37A, Y17A/F37A y K13A/K38A, que están siendo usadas para obtener información sobre la relación estructura-función del par proteico: toxina-canal iónico.

INTRODUCCIÓN

La generación de material venenoso es uno de los rasgos evolutivos adquiridos por diversas especies de animales como parte de su mecanismo de defensa y/o captura de la presa, desencadenando una serie de eventos que trae como consecuencia la afectación de procesos vitales, tales como la transmisión neuromuscular, la circulación sanguínea, la permeabilidad de las membranas, entre otros efectos, como forma de garantizar el dominio sobre la víctima. Entre los animales productores de veneno se encuentran las serpientes, anémonas marinas, arañas, caracoles de mar y alacranes, que en particular son de gran interés científico y médico para nuestro laboratorio.

Los alacranes representan uno de los grupos más antiguos de animales terrestres (más de 400 millones de años). Existen aproximadamente 1500 especies, pertenecen a la clase *Arácnida*, orden *Escorpiones*. Los más peligrosos para el humano forman parte de la familia *Buthidae*, comprendiendo 500 especies, de las cuales los géneros *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus* y *Buthotus* están localizados principalmente al Norte de África, en el Medio Oriente y en la India (Balozet, 1971), el género *Mesobuthus* esta distribuido en Asia Central e Iran (Fet et al., 2000), el género *Parabuthus* se ha encontrado al Sur de África (Debont et al., 1998), el género *Centruroides* esta distribuido en la parte Sur de Estados Unidos, México y Centroamérica (Mazzotti et al., 1963; Dehesa-Davila et al., 1994) y el género *Tityus* en Trinidad y Tobago, Brasil, Venezuela, Colombia y Argentina (Bücherl et al., 1971).

Cada especie de alacrán presenta en su veneno diversos componentes como: enzimas, mucoproteínas, proteínas, lípidos, nucleótidos, sales, aminoácidos, péptidos y otros que aún se desconocen (Zlotkin et al., 1978; Possani et al., 1999).

En las últimas cuatro décadas se han realizado varios estudios sobre la bioquímica, biología molecular y evolución de los diversos componentes activos del veneno de alacrán, permitiendo el aislamiento y caracterización general de péptidos tóxicos que reconocen de manera específica a receptores de membranas celulares, comunmente denominados canales iónicos, así como algunos otros con actividad fosfolipásica, hialuronidásica, antimicrobiana, insecticida y antiepiléptica. Además se ha logrado determinar algunas características estructurales tridimensionales de varias toxinas e inclusive de algunos canales iónicos y se han desarrollado algunos antivenenos en contra de la intoxicación por picadura de estos arácnidos. Para una revisión del asunto consultar los artículos recientes publicados por Rodríguez de la Vega y Possani (Toxicon 2004, 2005).

De acuerdo a la especificidad de las toxinas hacia los canales iónicos, pueden clasificarse dentro de cuatro familias:

- 1) Toxinas constituidas por 58 a 76 residuos de aminoácidos, estabilizados por cuatro puentes disulfuro que modulan la actividad de los canales de Na^+ (Possani et al., 2000).
- 2) Toxinas de cadena corta de 22 a 48 residuos de aminoácidos, estabilizados por tres o cuatro puentes disulfuro que bloquean los canales de K^+ (Rodríguez de la Vega y Possani, 2004).
- 3) Toxina corta de 36 residuos de aminoácidos con cuatro puentes disulfuro que inhibe el canal de Cl^- (Debin, et al., 1993).
- 4) Toxinas que modulan la sensibilidad de los canales de Ca^{+2} , de 27 a 104 residuos de aminoácidos (Possani et al., 1999).

Propiedades funcionales y estructurales de las toxinas de alacrán

Toxinas de Na⁺ (NaScTxs)

Las toxinas de alacrán que modifican la actividad de los canales de Na⁺, son péptidos de cadena larga biológicamente activos contra mamíferos, insectos o crustáceos (Miranda et al., 1970; Zlotkin et al., 1978) de 6500–8500 Da (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005). Su estructura terciaria se caracteriza por tener una triple cadena plegada β antiparalela, una cadena corta hélice α y cuatro puentes disulfuros. Tres de los puentes disulfuros se encuentran conservados en todas las toxinas, dos de ellos contribuyen a mantener la hélice α conectada a la plegada β , formando el dominio α/β , estabilizado por cisteínas (Fontecilla-Camps, et al., 1982). Este dominio estructural es común en toxinas que tienen afinidad por canales iónicos (Loret, et al., 1990). Cerca de esta región existe otro puente disulfuro localizado muy próximo que une dos asas. El cuarto puente disulfuro puede modificar su posición, como en el caso de las toxinas de algunos insectos (Possani, et. al., 1999).

Las NaScTxs son moduladoras del mecanismo de apertura y cierre del canal y son clasificadas en dos grupos: toxinas α y β (Jover et al., 1980; Wheeler et al., 1983; Gordon et al., 1998). En la figura 2 se muestran las toxinas más representativas que afectan al canal de sodio.

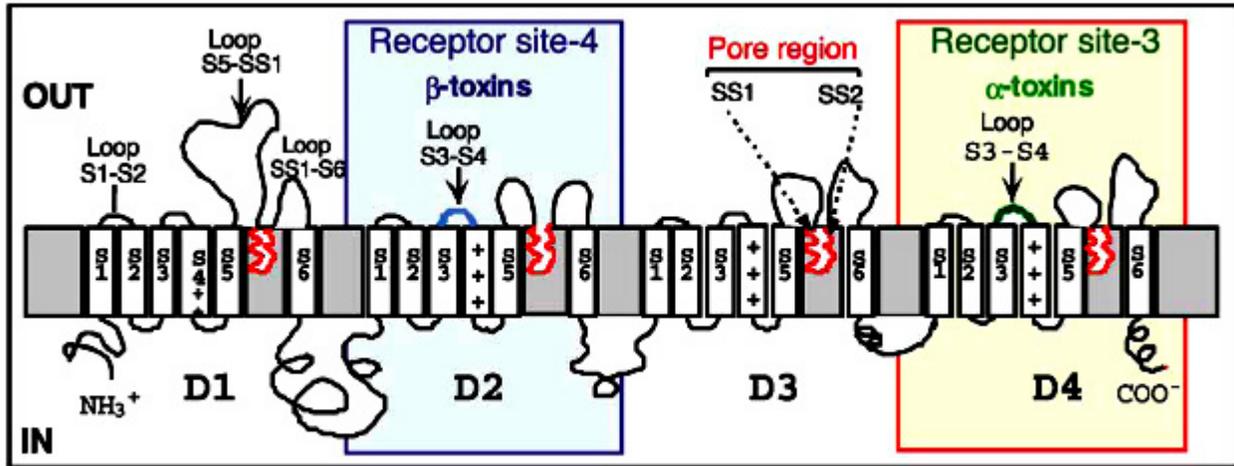


Figura 1. Canal de sodio. Topología de la subunidad α formadora del poro del canal y de los receptores sitio 3 y 4. Los segmentos SS1 y SS2 forman la región del poro, el cual está rodeado de cuatro dominios homologos (D1-D4) ensamblados. El asa S3-S4 de D2 está involucrado en la unión de las toxinas β al sitio 4. El asa S3-S4 en D4 muestran el receptor sitio 3 de las toxinas α (ver referencias Gordon et al., 20002, Gordon and Gurevitz, 2003).

Las toxinas α se unen al receptor sitio 3 de manera dependiente de voltaje (ver figura 1), retardando o inhibiendo el mecanismo de inactivación del canal (Catterall and Beress 1978; Couraud et al., 1978; Little et al., 1998; Leipold et al., 2005). Estas toxinas de alacrán de acuerdo al tipo de actividad, han sido divididas dentro de tres grupos:

- Las toxinas α "clásicas", son altamente activas sobre mamíferos, pero presentan baja toxicidad sobre algunos insectos, así como su afinidad sobre las membranas neuronales de insectos.
- Las toxinas α "anti-insecto", no compiten contra las toxinas anteriores. Se unen a los sinaptosomas de cerebro de rata y muestran una baja toxicidad en mamíferos al

ser administradas por vía intracerebroventricular, pero son altamente activas por vía subcutánea. Además para algunos insectos son altamente tóxicas.

- Las toxinas "α-like", tienen una alta toxicidad al ser administradas por vía intracerebroventricular en ratas y ratones, aunque su actividad es baja por vía subcutánea y son moderadamente tóxicas para algunos insectos. Compiten con las toxinas "anti-insecto" en la unión a las membranas sinaptosomales de insecto (Gordon et al., 1998).

Por otro lado, las toxinas β se unen al receptor sitio 4 asignado en el dominio 2 en el canal de Na⁺ (ver figura 1) produciendo cambios en la activación del canal hacia potenciales de membrana más negativos (Cestele and Catterall, 2000). Son toxinas que reconocen tanto tejidos de mamíferos como de artrópodos. En el caso de artrópodos estas toxinas se han clasificado en 2 clases: depresantes y excitatorias (Gordon et al., 1998; Zlotkin 1997; Froy et al., 1999). Actúan selectivamente sobre los canales de sodio de insectos, induciendo síntomas opuestos sobre las larvas de mariposa (Zlotkin 1997; Lester et al., 1982) ya que se unen a sitios distintos en el receptor (Gordon et al., 1992). Una de las toxinas β mejor estudiadas es la toxina 2 de *Centruroides noxius* (Cn2), que fue ampliamente estudiada en nuestro laboratorio. Recientemente se demostró que Cn2 tiene una exquisita preferencia por un subtipo especial de canal de Na⁺, el Na_v 1.6 (Schiavon et al., 2006).

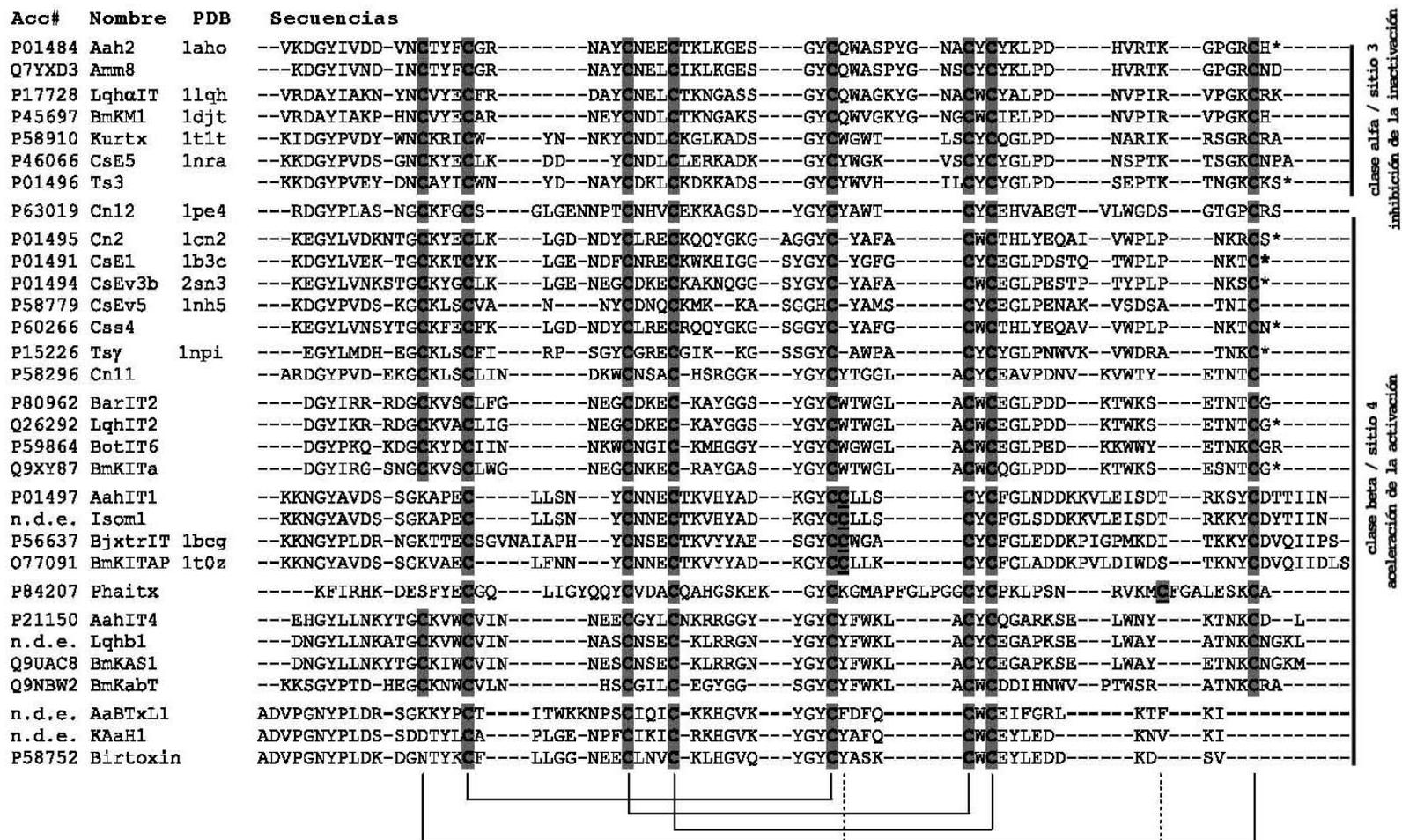


Figura 2. Alineamiento de secuencias primarias de las toxinas más representativas, que afectan a los canales de Na⁺. El alineamiento fue realizado con 191 secuencias (ver material suplementario doi:10.1016/j.toxicon.2005.09.006). Los números de acceso al Swiss-Prot estan seguidos por el nombre abreviado de la toxina y por el código de acceso al PDB para las que cuentan con estructura tridimensional resuelta. Se muestra al lado derecho de la figura el efecto farmacológico de las toxinas, aunque con astérisco se señalan las que tienen distinta función. Las secuencias han sido alineadas con base en las cisteínas con objeto de mostrar la conservación de tres de los puentes disulfuro. Este arreglo de puentes disulfuro se mantiene en todas estas toxinas. El cuarto puente puede o no estar presente y tener una posición diferente en algunas toxinas, como en algunas toxinas que afectan a los canales de insectos (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005).

Toxinas de K⁺ (KScTxS)

Las toxinas que inhiben los canales de potasio presentan un motivo estructural α/β estabilizado por tres o cuatro puentes disulfuro (Rodríguez de la Vega y Possani, 2004). Este motivo estructural está formado por una α hélice de dos y media vueltas y una hoja β plegada de dos o tres segmentos de la cadena. La α hélice se encuentra conectada, mediante dos puentes disulfuro, a la hoja β formando el dominio α hélice estabilizado por cisteínas (Bontems et al., 1991). De estas toxinas se conocen 125 secuencias, 80 están clasificadas como KScTxS α , comprendidas en 20 diferentes subfamilias (Goudet et al., 2002; Batista et al., 2002. Olamendí et al., 2006), 4 son KScTxS β (Legros et al., 1998; Batista et al., 2002), 27 son KScTxS γ (Rodríguez de la Vega et al., 2004; Zeng et al., 2006) y 2 son κ -hefutoxinas (Srinivasan et al., 2002). De ellas, las KScTxS α han sido convenientes herramientas en ensayos farmacológicos, fisiológicos, bioquímicos y biofísicos asociados con la caracterización estructural del canal de K⁺ y sus corrientes iónicas. La estructura terciaria de estas toxinas α es similar, por lo que su mecanismo de acción, especificidad y afinidades fisiológicas dependen de que aminoácidos estén situados en la superficie externa y de la forma en que interaccionan estos con las moléculas del canal (Rodríguez de la Vega et al., 2003).

En la figura 3, se presenta un alineamiento de secuencias de toxinas de distintas especies de alacrán que afectan los canales de potasio de las subfamilia γ , basado en la homología de su estructura primaria. Entre las toxinas de distintas especies de alacrán, se observa la conservación de las cisteínas, que dan lugar a los puentes disulfuro, además otros residuos .

Acc#	Nombre	Secuencia	gama-Ktx	Ref.
		1... 5... 10... 15... 20... 25... 30... 35... 40... 45... 48		
Q86QV6	CeErg1	DRDS C VDKSR C AKYGY ¹⁰ YQE C TD C CK-KYGHNGGT C MFFK C KCA-----	1.2	Corona et al., 2002
Q86QV3	CgErg1	DRDS C VDKSR C AKYGH ¹⁰ YQE C TD C CK-KYGHNGGT C MFFK C KCA-----	1.3	Corona et al., 2002
Q86QU6	CsErg1	DRDS C VDKSR C AKYGY ¹⁰ YQE C QD C CK-KAGHNGGT C MFFK C KCA-----	1.4	Corona et al., 2002
Q86QT3	CnErg1	DRDS C VDKSR C AKYGY ¹⁰ YQE C QD C CK-NAGHNGGT C MFFK C KCA-----	1.1	Gurrola et al., 1999
Q86QV0	CllErg1	DRDS C VDKSR C SKYGY ¹⁰ YQE C QD C CK-KAGHNGGT C MFFK C KCA-----	1.5	Corona et al., 2002
Q86QU1	CexErg1	DRDS C VDKSR C AKYGY ¹⁰ YQE C QD C CK-KAGHSGGT C MFFK C KCA-----	1.6	Corona et al., 2002
Q86QU2	CsErg5	DRDS C VDKSR C AKYGY ¹⁰ YQ C EV C CK-KAGHNGGT C MFFK C MCVNSKMN	5.1	Corona et al., 2002
Q86QU5	CsErg2	DRDS C VDKSR C AKYGY ¹⁰ YQ C EV C CK-KAGHRGGT C DFFK C KCKV----	3.3	Corona et al., 2002
P59939	CnErg2	GRDS C VNKS C AKYGY ¹⁰ YSQ C EV C CK-KAGHKGGT C DFFK C KCKV----	3.1	Corona et al., 2002
Q86QV5	CeErg2	DRDS C VDKSR C AKYGY ¹⁰ YQ C EI C CK-KAGHRGGT C EFFK C KCKV----	3.2	Corona et al., 2002
Q86QV2	CgErg2	DRDS C VDKSR C QKYGN ¹⁰ YAQ C TAC C CK-KAGHNKGT C DFFK C KCT-----	3.4	Corona et al., 2002
Q86QV1	CgErg3	DRDS C VDKSR C QKYGP ¹⁰ YQ C TD C CK-KAGHTGGT C IYFK C KCGAESGR	5.2	Corona et al., 2002
Q86QU9	CllErg2	DRDS C VDKSK C SKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGN C VYFK C KCNP----	4.1	Corona et al., 2002
Q86QU8	CllErg3	DRDS C VDKSK C SKYGY ¹⁰ YQ C DK C CK-KAGDRAGN C VYFK C KCNQ----	4.6	Corona et al., 2002
Q86QU7	CllErg4	DRDS C VDKSK C AKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGN C VYLK C KCNQ----	4.7	Corona et al., 2002
Q86QT9	CexErg3	DRDS C VDKSK C AKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGT C EYFK C KCNP----	4.4	Corona et al., 2002
Q86QT8	CexErg4	DRDS C VDKSK C AKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGT C EYFK C KCNP----	4.5	Corona et al., 2002
Q86QU0	CexErg2	DRDS C VDKSK C GKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGT C EYFK C KCNP----	4.3	Corona et al., 2002
Q86QV4	CeErg3	DRDS C VDKSK C GKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGN C VYFK C KCNP----	4.8	Corona et al., 2002
Q86QV9	CnErg3	DRDS C VDKSK C GKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGT C VYFK C KCNP----	4.13	Corona et al., 2002
P59940	CsErg1	ERDS C VEKSK C GKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGT C VYFK C KCNP----	4.12	Nastainczyk et al., 2002
Q86QU4	CsErg3	DRDS C VDKSR C GKYGY ¹⁰ YQ C DD C CK-KAGDRAGT C VYFK C KCNP----	4.9	Corona et al., 2002
Q86QU3	CsErg4	DRDS C VDKSR C GKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGDRAGT C VYFK C KCNP----	4.10	Corona et al., 2002
Q86QV8	CnErg4	DRDS C VDKSK C GKYGY ¹⁰ YQ C DE C CK-KAGERVGT C VYFK C KCNP----	4.11	Corona et al., 2002
Q86QV7	CnErg5	DRDS C VDKSK C GKYGY ¹⁰ YQE C QD C CK-NAGHNGGT C VYFK C KCNP----	4.2	Corona et al., 2002
Q9BKB7	BeKm-1	-RP--TDIK C SES--Y-Q C FPV C KSFRFGKTNGR C VNGF C DCF-----	2.1	Kozolko et al., 2001
P59938	BmKK7	-RP--TDIK C SAS--Y-Q C FPV C KSFRFGKTNGR C VNGL C DCF-----	2.2	Zeng et al., 2006

Figura 3. Alineamiento de secuencias primarias de las toxinas de alacrán que afectan a los canales de K⁺ de la subfamilia γ . El alineamiento fue realizado con 27 secuencias. Los números de acceso al Swiss-Prot estan seguidos por el nombre abreviado de la toxina. Las secuencias han sido alineadas con base en las cisteínas con objeto de mostrar la conservación de tres de los puentes disulfuro. Este arreglo de puentes disulfuro se mantiene en todas estas toxinas. El cuarto puente puede o no estar presente, como en el caso de las dos últimas toxinas.

Alacranismo, problema de salud pública

El alacranismo es causado por la intoxicación por la picadura de alacrán en el humano y representa un serio problema de salud pública en México (Mazzotti and Bravo-Becherelle, 1963). Estimaciones estadísticas revelan cerca de 250,000 casos en el 2005, ver tabla 1. (Dehesa-Dávila and Possani, 1994; Dirección General de Epidemiología). Se han identificado 221 especies y subespecies de alacrán en el país (Dehesa-Dávila et al., 1996), afortunadamente, solo siete son medicamente importantes (Hoffmann 1936; Hoffmann and Nieto 1939) y forman parte del género *Centruroides*. Estas especies peligrosas para el hombre son: *Centruroides limpidus limpidus*, *C. limpidus tecomanus*, *C. infamatus*, *C. suffusus suffusus*, *C. noxius*, *C. elegans* y *C. sculpturatus* (Dehesa-Dávila et al., 1995) y estan distribuidas principalmente en las vertientes del Pacífico en México desde Sonora hasta Oaxaca y en algunas regiones del centro como Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Morelos y Puebla, como se muestra en la figura 4 (Calderón-Aranda et al., 1996).

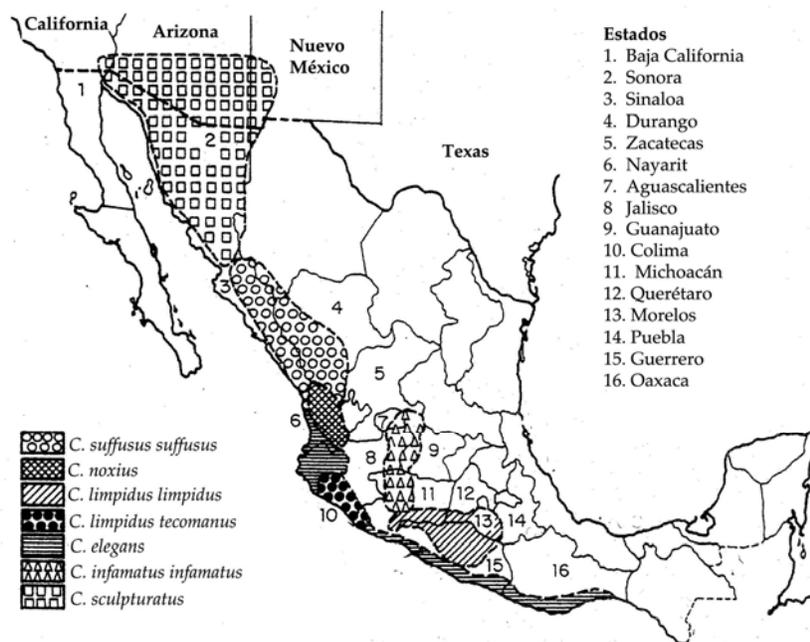


Figura 4. Distribución Geográfica de alacranes peligrosos en México (Dehesa-Dávila y Possani, 1994).

Tabla 1. Intoxicación por picadura de alacrán.

Indicador	1995	1997	2000	2002	2003	2004	2005
Casos	83,814	170,115	208,444	263,079	243,183	230,199	247,976
Tasa ¹	91.49	179.57	198.08	262.76	233,4	218.51	232.95
Defunciones	230	140	84	70	50 ²	30	35
Letalidad ³	0.27	0.08	0.04	0.03	0.02	0.01	+

¹Número de casos por cada 100,000 habitantes mayores de 1 año.

²Datos preliminares .

³Número de muertes por cada 100 casos.

*Datos no estimados.

*Fuente: Sistema único para vigilancia epidemiológica / Dirección general de epidemiología.

De los casos anteriores los estados de Nayarit, Jalisco, Guanajuato, Colima, Michoacán, Morelos, Puebla y Guerrero, presentan una mayor incidencia de alacranismo en la República Mexicana, encontrándose distribuidos en ellos *C. limpidus*, *C. infamatus* y *C. noxius*, alacranes de gran importancia médica. De acuerdo a los datos estadísticos registrados por la Dirección General de Epidemiología, entre 1995 y 2005 (tabla 2), se muestra que el estado de Jalisco ocupa el primer lugar de alacranismo de la República Mexicana, reportándose 50,313 casos, lo que representa el 20% del número total de picaduras en el 2005.

Tabla 2. Datos estadísticos sobre casos de intoxicación por picadura de alacrán en México (Fuente: Sistema Único para Vigilancia Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología).

Año	Nayarit	Jalisco	Guanajuato	Colima	Michoacán	Morelos	Puebla	Guerrero
1995	10,011	26,527	16,048	12,716	22,489	30,610	12,369	13,990
1998	10,782	27,179	15,920	12,532	19,132	31,356	10,782	17,127
1999	10,777	31,749	21,029	10,452	25,351	34,414	12,903	18,175
2000	13,358	37,952	23,331	9,031	27,172	31,267	11,660	22,094
2001	13,634	44,042	26,056	9,394	27,546	32,810	13,248	22,379
2002	14,890	43,792	25,935	10,358	30,218	32,030	14,021	25,022
2003	15,052	48,453	24,073	10,271	28,588	30,741	15,481	24,204
2004	14,642	47,949	23,254	10,640	23,847	25,559	14,855	28,921
2005	13,466	50,313	26,419	9,726	27,036	31,559	16,575	33,154

En los últimos años se ha logrado combatir el problema del alacranismo, mediante el desarrollo y mejoramiento de antivenenos que logran reducir el número de muertes, (tabla 1). Sin embargo para su obtención se necesita inmunizar caballos con los extractos solubles de las glándulas de alacranes maceradas, para lo que se requieren a un gran número de estos alacranes. Una alternativa que nuestro grupo ofrece es producir los componentes responsables de la toxicidad en forma recombinante, con el fin de emplearlos como inmunógenos y como herramientas para la caracterización estructural de canales iónicos. Para este fin, se empleará como modelo la toxina Ergtx1 que fue aislada del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann.

Actualmente el tratamiento indicado para las personas picadas por alacrán es el uso de antivenenos producidos por hiperinmunización de caballos. El suero del caballo es tratado enzimáticamente y los fragmentos F(ab)₂ son purificados, cuantificados y liofilizados para uso en humanos. Uno de las 2 venenos existentes en México es producido por el Instituto Bioclón S. A. de C. V., subsidio de los Laboratorios Silanes S. A. de C. V. Su marca registrada se llama **Alacramyn** y es muy efectiva.

ANTECEDENTES

Ergtoxina1 (Ergtx1)

La Ergtx1 es una toxina corta, forma parte de la familia de las KScTx γ , esta constituida por 42 residuos de aminoácidos, su estructura terciaria presenta un motivo α/β estabilizado por 4 puentes disulfuro (C5-C23, C11-C34, C20-C39 y C24-C41), como se observa en la figura 5 (Gurrola et al., 1999; Bottiglieri et al., 2000; Corona et al., 2002; Frenál et al., 2004).

En los últimos años se ha logrado combatir el problema del alacranismo, mediante el desarrollo y mejoramiento de antivenenos que logran reducir el número de muertes, (tabla 1). Sin embargo para su obtención se necesita inmunizar caballos con los extractos solubles de las glándulas de alacranes maceradas, para lo que se requieren a un gran número de estos alacranes. Una alternativa que nuestro grupo ofrece es producir los componentes responsables de la toxicidad en forma recombinante, con el fin de emplearlos como inmunógenos y como herramientas para la caracterización estructural de canales iónicos. Para este fin, se empleará como modelo la toxina Ergtx1 que fue aislada del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann.

Actualmente el tratamiento indicado para las personas picadas por alacrán es el uso de antivenenos producidos por hiperinmunización de caballos. El suero del caballo es tratado enzimáticamente y los fragmentos F(ab)₂ son purificados, cuantificados y liofilizados para uso en humanos. Uno de las 2 venenos existentes en México es producido por el Instituto Bioclón S. A. de C. V., subsidio de los Laboratorios Silanes S. A. de C. V. Su marca registrada se llama **Alacramyn** y es muy efectiva.

ANTECEDENTES

Ergtoxina1 (Ergtx1)

La Ergtx1 es una toxina corta, forma parte de la familia de las KScTx γ , esta constituida por 42 residuos de aminoácidos, su estructura terciaria presenta un motivo α/β estabilizado por 4 puentes disulfuro (C5-C23, C11-C34, C20-C39 y C24-C41), como se observa en la figura 5 (Gurrola et al., 1999; Bottiglieri et al., 2000; Corona et al., 2002; Frenál et al., 2004).

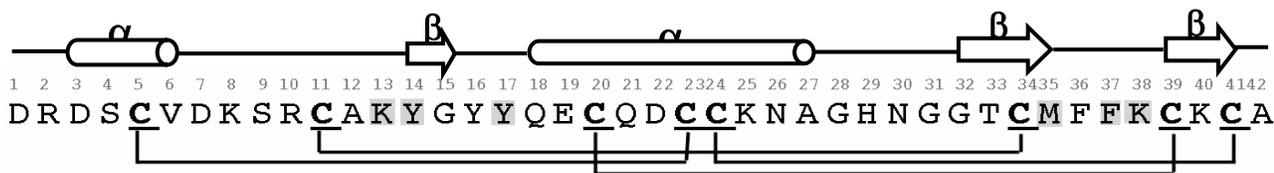


Figura 5. Secuencia primaria de la Ergtoxina1. La estructura de la toxina se caracteriza por tener una secuencia N-terminal pobremente organizada, extendiéndose desde D1-K13, e incluye un fragmento corto helicoidal de D3-V6, le sigue una lámina β (Y14-T15) Estos elementos son seguidos por una α -hélice (Q18-A27), una segunda lámina β (G32-M35) y una tercera y pequeña lámina β (C39-C41).

En el 2002, Pardo-López y cols. reportaron aminoácidos de Ergtx1 importantes en el reconocimiento del canal de potasio (Pardo-López et al., 2002). Más tarde Torres y cols., reportaron la estructura tridimensional de la Ergtx1 sintetizada químicamente y obtenida por RMN, la cual adopta una conformación similar a las toxinas de potasio. Sin embargo su estructura es inusual, ya que se observa una hélice corta situada en el extremo del N-terminal del péptido en lugar de la usual lámina β . Además la primera lámina β interactúa (por puentes de hidrógeno) con la segunda lámina β y no con la tercera, como es común observarse en las toxinas de alacrán. La estructura presenta un N-terminal flexible, del primero al cuarto residuo, seguida de una vuelta, probablemente de una hélice 3_{10} , por el residuo 5-7. La primera lámina β , de los tres segmentos β antiparalelos, es corta y esta formada por los residuos 14-15. Las dos restantes están definidas por los residuos 32-35 y 39-41, separadas por una asa formada por los residuos 35-37. Una hélice α , formada por los residuos 18-27, seguida por la primera lámina β y la tercera lámina β (ver figura 6) atravesada diagonalmente (Torres et al., 2003). Esta estructura fue confirmada por nuestro grupo de trabajo utilizando la Ergtx1 nativa (Fréchal et al., 2004).

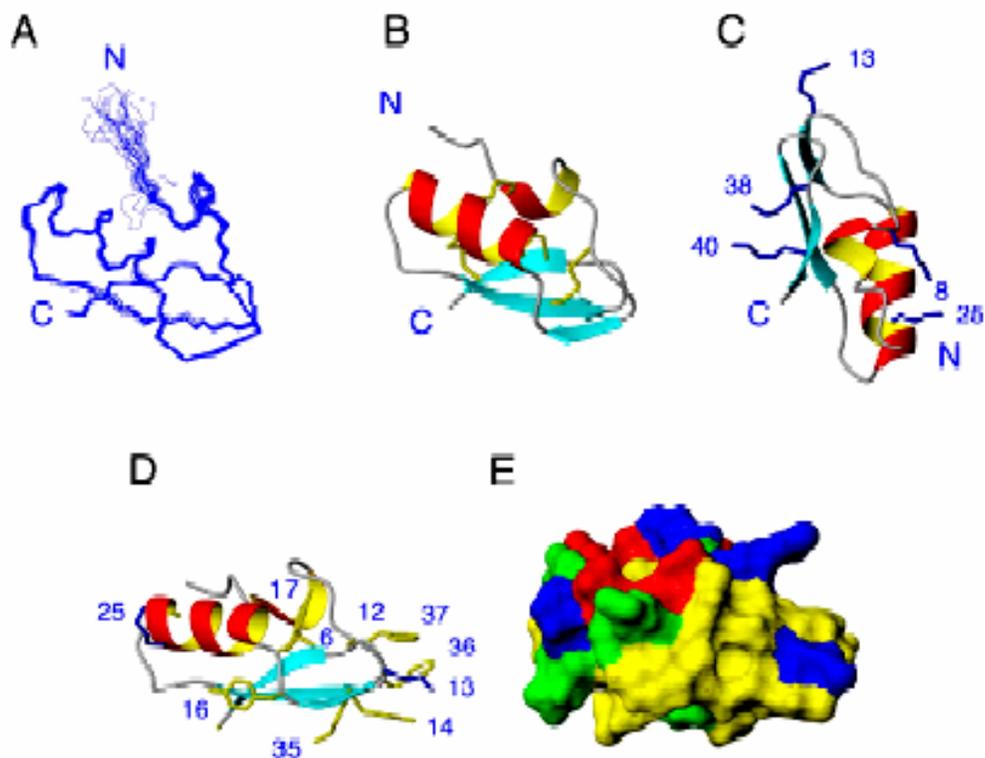


Figura 6. Estructura de la toxina Ergtx1: A. Ensamble de las 20 mejores estructuras alineadas por superposición de esqueletos de átomos del residuo 5-42. B. Diagrama de listón muestra la estructura secundaria y puentes disulfuro. C. En la estructura se enfatiza las cadenas laterales de los residuos de lisina. D. Diagrama de listón muestra las localizaciones de residuos importantes. K13 y K25 en azul y Y en amarillo. E. Muestra las superficies moleculares hidrofóbicas e hidrofílicas. El tipo de residuos son distinguidos por su color: residuos no polares y Y amarillos; residuos no cargados polares en verde; residuos cargados en azul y los cargados negativos en rojo. Las figuras fueron generadas usando MOLMOL (Torres et al., 2003).

La toxina Ergtx1 actúa específicamente sobre los canales de potasio codificados por la familia de genes *Human ether-à-go-go* (HERG; Gurrola et al., 1999), que son expresados en corazón, ganglios del sistema nervioso simpático periférico, cerebro y células tumorales. Estos canales son estructuras proteicas insertadas en la membrana plásmica que controlan el flujo iónico, en este caso del K^+ , entre el exterior y el interior celular. Pertenecen a la familia de canales de potasio dependientes de voltage (K_v , voltage-gated, VGK), esto significa que son capaces de sensor los cambios en el potencial de membrana

modificando su estructura conformacional y permitiendo (estado abierto) o impidiendo (estado cerrado o inactivado) el flujo iónico a través de él.

Los canales HERG pertenecen a la familia Kv 11.1, según la nomenclatura actual, (*International Union of Pharmacology*, 2003; *K*: canal de potasio; *v*: con dependencia de voltaje; *11*: miembro de la tercera subfamilia de mamíferos *erg*; *1*: primer miembro descrito del grupo) contiene seis dominios transmembranales denotados por S1-S6, una hélice poro que está interpuesta entre S5 y S6. El S4 está cargado positivamente, actuando como sensor de voltaje para la activación (Warmke and Ganetzky, 1994; Shi et al., 1997). Estos canales son blanco de un grupo potente de drogas en las que se incluyen antiarrítmicos, antihistamínicos y antibióticos (Roden, 1998; Mitcheson, 2000), que bloquean el canal de potasio causando la adquisición del síndrome LQT, que puede causar un síncope y muerte repentina resultado de arritmias y fibrilación ventricular. El descubrimiento de sustancias naturales que puedan específicamente bloquear reversiblemente o reconocer este tipo de canales es fundamental para la búsqueda y desarrollo de nuevas drogas que trate algunas de las enfermedades y mal funcionamientos asociados con el canal HERG (Carbone et al., 1982; Mackinnon and Miller, 1988; Miller et al., 1995). Para este tipo de canales las toxinas de alacrán han sido herramientas importantes para determinar la geometría del vestíbulo externo del poro del canal.

En el 2002 nuestro grupo en colaboración con el grupo de la Dra. G. N. Tseng de la "Virginia Commonwealth University" (USA), realizamos mutagénesis de cisteína del segmento que une al S5-P y al P-S6 del canal HERG, observándose cambios en los sitios de unión de la toxina Ergtx1, sobretodo en el segmento S5-P que puede estar formando una alfa hélice anfipática, aunque en el segmento P-S6 pueden estar involucradas interacciones hidrofóbicas (Pardo-López et al., 2002). Después Bansal y cols., en el 2003, reportan la síntesis y estructura de la asa extracelular (S5-P loop), que une extremos

externos del dominio transmembranal S5 y la hélice del poro y es el sitio de unión de la toxina Ergtx1. Por lo que al conocer la estructura y como interacciona esta toxina en este sitio, se puede obtener información estructural acerca del vestíbulo externo del canal HERG (Bansal et al., 2003).

En el 2004 estudios realizados por Frénal y cols., sugieren que la toxina Ergtx1 puede estar interactuando con la α -hélice externa anfipática del canal HERG, pero no en la región central del poro, como generalmente es bloqueado este canal. Ellos proponen que hay un parche hidrofóbico en la Ergtx1 formado por 4 residuos aromáticos (Y14, Y16, Y17 y F36) y 2 básicos (K38 y K13) que pueden estar unidos a la α -hélice anfipática. En la figura 7 se puede observar la estructura de la Ergtx1, obtenida por RMN (Frénal, et. al., 2004).

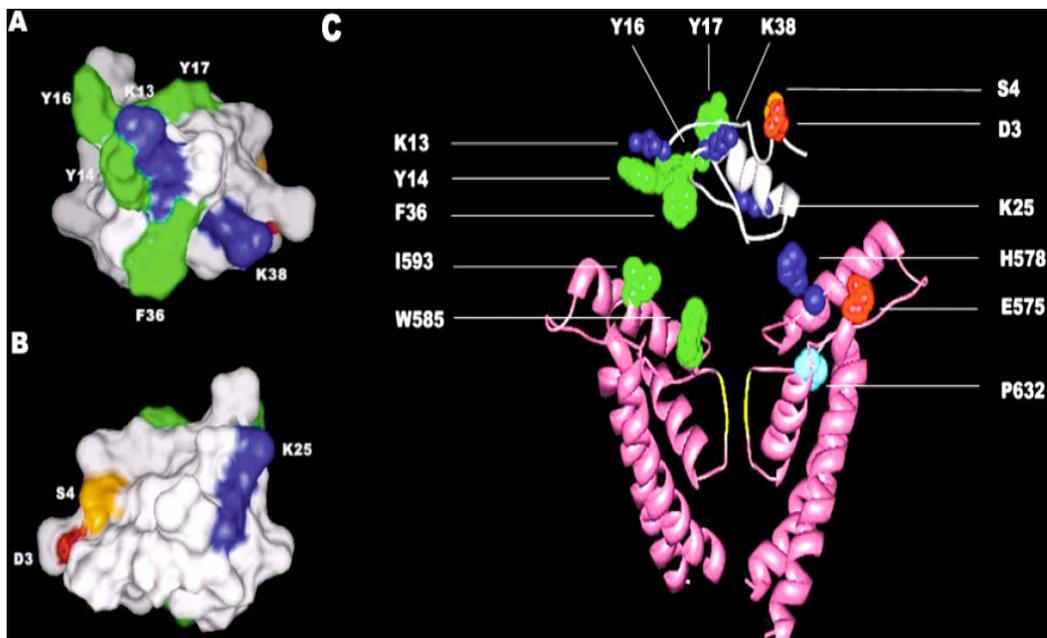


Figura 7. Estructuras tridimensionales de la toxina Ergtx1 y del canal HERG. A. El parche hidrofóbico esta formado por cuatro residuos aromáticos y 2 residuos básicos y este se encuentra unido a 2 residuos catiónicos. **B.** Tres residuos polares, incluyendo dos residuos cargados, forman un parche hidrofílico. **C.** Se propone que el modo de interacción entre la Ergtx1 y el canal HERG. Y14, Y16, Y17 y F36 pueden unirse a W585 y I593 de la α -hélice anfipática por interacción hidrofóbica. K38 y K13 puede formar una interacción de forma catiónica con W585. La repulsión electrostática puede ocurrir entre E575, H578 sobre el canal y D3, K25 sobre la Ergtx1, respectivamente. Pro632 puede formar algún puente de hidrógeno con el parche hidrofílico.

Para estudiar la relación estructura-función de la toxina Ergtx1 y el vestíbulo del canal HERG nosotros realizaremos la expresión heteróloga de esta toxina, así como de distintas variantes mutagénicas de su respectiva secuencia y al mismo tiempo se analizarán los resultados obtenidos en el trabajo de Torres y Frenál. Con estas variantes será posible identificar que aminoácidos participan en los motivos estructurales fundamentales para la función de la toxina sobre el canal iónico.

Expresión de toxinas recombinantes

Desde 1989, se ha reportado la expresión de toxinas de alacrán en diferentes sistemas, esto incluye a *Escherichia coli*, levaduras, células de insectos, células de mamíferos, etc. Desafortunadamente pocos de ellos han sido exitosos, ya que o producen muy pequeñas cantidades, o se obtienen toxinas inactivas (Shao et al., 1999). A continuación en la siguiente tabla se muestran las toxinas que han sido expresadas, utilizando diferentes sistemas.

Tabla 3. Expresión heteróloga de genes que codifica para toxinas de alacrán.

Toxinas de Alacrán	Características	Cepa / Vector	Inductor / producto	Rendimiento	Referencia
CTX	37 aa, KCh, 3PD	<i>E. coli</i> BL21(DE3) / pCSP105	IPTG / soluble	1 mg/lt de cultivo toxina activa	Park et al., 1991
Lqhα1T	62 aa, NaCh, 4PD	<i>E. coli</i> BL21 / pET-11cK	IPTG/ cuerpos de inclusión	5 – 10 mg/lt de cultivo toxina activa	Zilberberg, et al., 1996
LqhI₂	61 aa, NaCh, 4PD	<i>E. coli</i> BL21 / pET-11cK	IPTG/ cuerpos de inclusión	500 μ g/lt de cultivo toxina activa	Turkov, et al., 1997
N TX	39 aa, KCh, 3PD	<i>E. coli</i> BL21/ pCSP105	IPTG/soluble	2 mg/lt de cultivo toxina activa	Martínez et al., 1998
BmKM1	64 aa, NaCh, 4PD	<i>Saccharomyces</i>	No	5 mg/lt de	Shao et al.,

		<i>cerevisiae</i> S78 / pVT102U/ α	inducible/soluble	cultivo	1999
Css II	66 aa, NaCh, 4PD	<i>E. coli</i> BL21 / pET-15b	IPTG/soluble	toxina activa 1-2mg/lit de cultivo	Johnson et al., 2000
BmKIM	61 aa, NaCh, 4PD	<i>E. coli</i> BL21 / pGEX-5x-1	IPTG/soluble	toxina activa 1-2 mg /lit de cultivo	Peng et al., 2002
BmP05	31 aa, KCh, 3PD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S78 / pVT102U/ α	No inducible/soluble	toxina activa 8-10 mg/lit de cultivo	Wu et al., 2002
AaHI	63 aa, NaCh, 4 PD	<i>E. coli</i> DH5 α / pMAL-p	IPTG/soluble	toxina activa 0.3 mg/lit de cultivo	Legros et al., 2002
AaHII	64 aa, NaCh, 4PD				
AaHIII	65 aa, NaCh, 4PD				
BmTXKβ	66 aa, NaCh, 3PD	<i>E. coli</i> BL21/ PGEX-5x-1	IPTG/soluble	toxina activa 2 mg/l de cultivo	Cao et al., 2003
AGAP	Péptido analgésico-antitumor	<i>E. coli</i> BL21 / PET28	IPTG/soluble	toxina activa 2.5 mg/lit de cultivo	Liu et al., 2003
Cn5	66 aa, NaCh, 4 PD	<i>E. coli</i> CMK / pMalC	IPTG/soluble	toxina activa 3 mg/lit de cultivo	García, et al., 2003
Lqhβ1	61 aa, NaCh, 4PD	<i>E. coli</i> BL21 / pET-11cK	IPTG/soluble	toxina activa 2 mg/lit de cultivo	Gordon et al. 2003
Bj-xtrIT	76 aa, NaCh, 4PD	<i>E. coli</i> BL21 / pET-11cK	IPTG/soluble	toxina activa 2 mg/lit de cultivo	Cohen et al., 2004
BotIII	64 aa, NaCh, 4PD	<i>E. coli</i> HB101 / pEZZ-18	No inducible/soluble	toxina activa 1 mg/lit de cultivo	Benkhadir et al., 2004
		<i>E. coli</i> HB101/ pEZZ-18	No inducible	toxina activa 1.1 mg/lit de cultivo	Rhouma et al., 2005
BotIT 6	62 aa, NaCh, 4 PD	Células Sf9 / pGmAc116T	No inducible	toxina activa 2X10 ⁷ pfu/mL	
Lqq-V	64 aa, NaCh, 4 PD	<i>E. coli</i> JM109/ PET15b	IPTG/ soluble	toxina activa 1.5 mg/lit de cultivo	Banerjee et al., 2006
BmK CT	35 aa, Cl,KCh, 4PD	<i>E. coli</i> BL21 / pExSecI	IPTG/soluble	toxina inactiva 1.4 mg/lit de cultivo	Fu et al., 2005
Lqh-dprIT₃	61 aa, Nach, 4 PD	<i>E. coli</i> BL21 / pET-11cK	IPTG/soluble	toxina activa Toxina activa	Strugatsky et al., 2005

Con respecto a la tabla anterior, se puede afirmar que no existe un sistema de expresión universal para la producción de proteínas heterólogas. Sin embargo, hasta el momento el sistema más utilizado para la expresión de toxinas recombinantes de alacrán ha sido en *Escherichia coli* y en la mayoría de los casos anteriores se ha logrado obtener

más de 1 mg de toxina por litro de cultivo, cantidad suficiente para realizar ensayos de estructura-función con respecto a canales iónicos. *Escherichia coli* es el huésped procariótico más usado porque ha sido el mejor caracterizado en términos de genética molecular, fisiología y sistemas de expresión. Sin embargo su uso para la producción de proteínas recombinantes puede involucrar una serie de problemas prácticos. Por ejemplo, *Escherichia coli* no es muy apropiada para la producción de proteínas muy grandes, complejos que contienen puentes disulfuro, o proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales. Además la estabilidad de las proteínas producidas en este huésped puede ser baja ocasionada por degradación proteolítica, y las proteínas sobreexpresadas tienden a agregarse, formando cuerpos de inclusión, los cuales después requieren complicados procesos de desnaturalización y de plegamiento *in vitro* para hacerlas funcionales. Una variedad de tecnologías incluyendo el uso de promotores y cepas huésped, coexpresión de chaperonas y cambios en las condiciones de cultivo, han sido usadas para reducir algunos de estos problemas (Choi and Lee, 2004; Makrides, 1996).

El interior de *Escherichia coli* esta dividido en dos compartimentos: citoplasma y periplasma. Las proteínas recombinantes pueden ser enviadas a alguno de estos compartimentos, presentándose ventajas y desventajas dependiendo en cual de ellos sea enviada.

Citoplasma

Cuando el destino de la proteína es el citoplasma, los niveles altos en la producción de proteínas frecuentemente lleva a la formación de cuerpos de inclusión, los cuales son agregados de intermediarios plegadas como la nativa o proteínas desplegadas, aunque es imposible predecir que proteínas serán producidas como cuerpos de inclusión (Kane and Hartley, 1998). Se han desarrollado varias estrategias de expresión para la formación de estructuras plegadas naturalmente en este compartimento. Esto incluye la coexpresión de

chaperonas (Bessette et al., 1999; Wall and Pluckthun, 1995), el uso de cepas huésped con thioredoxinas deficientes que mantienen un potencial redox favorable, como la cepa Origami (Derman et al., 1993; Proba et al., 1995), la reducción en la velocidad de síntesis de las proteínas (Bowden and Georgiou, 1990), la reducción de la temperatura de las condiciones de cultivo (Schein, 1989) y el uso de polipéptidos altamente solubles como parejas fusionadas (Murby et al., 1996; Uhlen and Moks, 1990).

Periplasma

La producción de proteínas recombinantes en el espacio periplásmico presenta varias ventajas:

- La proteína es secretada naturalmente al estar fusionada a un péptido señal.
- Hay menor actividad de proteasas en el espacio periplásmico que en el citoplasma, por lo que hay menor degradación de proteínas.
- La purificación de las proteínas recombinantes es simple, debido al poco contenido de proteínas nativas de este compartimento en el huésped.
- Formación correcta de puentes disulfuro que puede ser facilitado por el medio oxidativo que provee este compartimento (Hockney, 1994; Makrides, 1996).
- Las proteínas secretadas pueden ser usadas en ensayos de actividad *in vivo*.

Sin embargo, también se observan desventajas, principalmente relacionadas con el procesamiento del péptido señal:

- La secuencia señal puede ser incompletamente procesada o removida.
- La cantidad de proteína secretada puede ser muy baja o indetectable.
- Puede presentarse autólisis celular, principalmente causada por debilidad de la membrana externa.

- La eficiencia de la secreción es variable, dependiendo de las características de la proteína recombinante. Sin embargo se han desarrollado nuevas secuencias señal que pueden hacer la secreción más eficiente, como: PelB, proteína A y OmpA.
- Los cuerpos de inclusión pueden formarse en el citosol o en el periplasma cuando los niveles de expresión son altos.
- Los puentes disulfuro pueden estar formados incorrectamente (Jeong and Lee, 2000; Lucic et al., 1998; Pritchard et al., 1997; Wong et al., 2003).

OBJETIVO GENERAL

Expresión heteróloga de la toxina Ergtx1 del alacrán *Centruroides noxius* y generación de sus variantes, con la finalidad de analizar la relación estructura-función.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Expresar el gen que codifica para la toxina Ergtx1, empleando las cepas TG1 y Origami de *Escherichia coli*.
- Purificar e identificar la toxina expresada.
- Generar variantes de la toxina Ergtx1.
- Verificar la actividad biológica de la toxina recombinante Ergtx1 y de las variantes por electrofisiología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para las amplificaciones por PCR se empleó la Vent Polimerasa (New England Biolabs). Las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa fueron obtenidas de Boehringer o New England Biolabs. Para purificar los vectores de expresión se empleó la cepa DH5 α (*F'* *gyrA96* (NAI^r) *recA* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17* (*r_K⁻m_K⁺*) *glnV44* *deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169[ϕ 80d Δ (*lacZ*)M15]) de *Escherichia coli* y para la expresión de las proteínas recombinantes las cepas TG1 (*supE* *thi1* Δ (*lac/proAB*) Δ (*mcrB/hsdSM*)5(*rK-mK*-) [*F'* *traD36proAB* *lacIqZ* Δ M15]) y Origami (*F'*[*lac+* *lacI^q* *pro*] (*DE3*) *gor522::Tn 10* *trxB*(*Kan^R*, *Str^R*, *Tet^R*)).

1. Construcción de vectores de expresión

El vector **pKS⁺-Ergtx1** (construido por la Dra. Blanca García), que contiene el gen que codifica para la toxina Ergtx1 fue utilizado como templado para la construcción de seis vectores de expresión. Para tal fin se diseñaron una serie de oligonucleótidos:

Oligo **Erg-Up**

5'GCA CTG CAT ATG GAT AGA GAT AGC TGC GTC-3'

Oligo **Erg-Low**

5'GCA AGC GAA TTC TTA CGC ACA TTT ACA CTT-3'

Oligo **HisEnt-ERG**

5'GCA CTG CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GAT GAC GAT GAC AAG GAC AGA GAT
AGC TGC GTC-3'

Oligo **BamH1-EntERG**

5'GGC TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG GAC AGA GAT AGC TGC GTC-3'

Oligo **Sfi-Erg**

5'GTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAC AGA GCT AGC TGC GTC-3'

Oligo **Not-Erg**

5'TTT TTC AAG TGT AAA TGT GCG TAA TCA CGT GCG GCC GCA AGT CGA GAA TGA CTC-3'

Oligo **Sfi-6His**

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CC G GCC A TG GCC CAT CAC CAT CAC CAT CAC
GAT-3'

Oligo **Sfi-Thio**

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CC G GCC A TG GCC ATG TCT GAT AAA ATT ATT CAT-
3'

El gen rErgtx1, fue clonado dentro de los vectores de expresión, **pThioC** y **pSyn1**, usando PCR. La cepa DH5 α de *Escherichia coli* fue transformada con los plásmidos construidos, por el método de choque térmico. Se realizó una selección de clonas por PCR de colonia. De las clonas que resultaron positivas se obtuvo el plásmido y se determinó la secuencia nucleotídica de ambas cadenas para comprobar si las construcciones eran correctas.

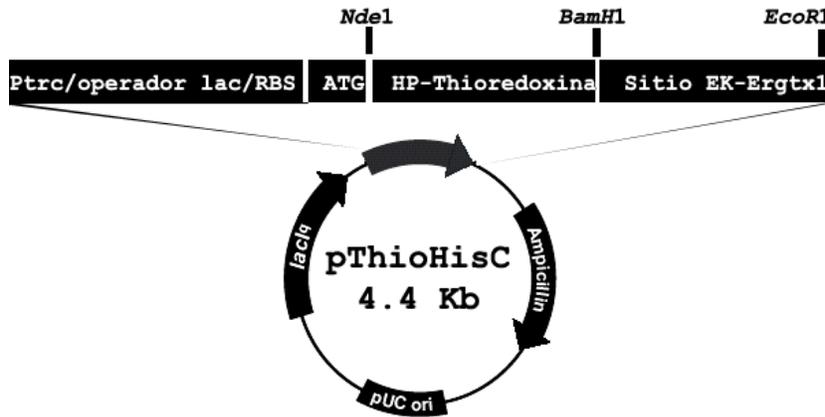
1.1. Vectores de expresión citoplásmica

El vector pThioC esta construido de tal manera que permite insertar una secuencia determinada y fusionarla al gen que codifica para la proteína acarreadora, thioredoxina. Su expresión es inducida con isopropil- β -D-tiogalactosido (IPTG) y su regulación se encuentra bajo el promotor *trc*, el cual es regulado por el gen que codifica para el represor Lac (*lac^{Iq}*). También contiene un gen que le confiere resistencia a ampicilina (www. Invitrogen.com).

- a. **pThioC + Ergtx.** La construcción de este vector permitió expresar la toxina recombinante Ergtx1, sin la necesidad de estar fusionada a una proteína acarreadora. Para amplificar el extremo 5' se emplea el oligonucleótido **Erg-Up**, el cual eliminó la proteína de fusión del plásmido (pThioHisC, Invitrogen) e incluye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NdeI* y los codones que corresponden a los primeros 6 residuos del N-terminal de la toxina ErgTx1. El oligonucleótido **Erg-Low**, se empleó para la amplificación del extremo 3'. Contiene un sitio de corte para la endonucleasa *EcoR1*, un codón de paro y los codones que corresponden a los últimos 5 residuos de la toxina (ver figura 8).
- b. **pThioC + His6X-EK-Ergtx.** Este vector permitió expresar la fusión: seis residuos de histidina, un sitio de corte enterocinasa más la toxina ErgTx1. Para amplificar

el extremo 5' se empleó el oligonucleótido **HisEnt-ERG**, el cual excluye la proteína de fusión del plásmido de expresión (pThioHisC, Invitrogen) e incluye un sitio reconocido por la enzima de restricción *NdeI*, los codones que codifican para los seis residuos de histidinas, los codones que codifican para los aminoácidos que son reconocidos por la enzima enterocinasa (*DDDDK*) y los codones que corresponden a los primeros seis residuos del N-terminal de la toxina ErgTx1. El oligonucleótido **Erg-low** se empleó para amplificar el extremo 3' (ver figura 8).

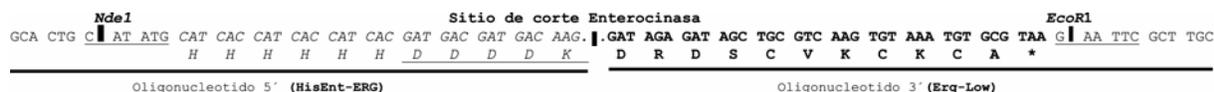
- c. **pThioC + Thioredoxina-EK-Ergtx**. Para amplificar el extremo 5' se usó el oligonucleótido **BamH1-EntERG**, este permitió la fusión con la proteína acarreadora del vector (thioredoxina) e incluye un sitio reconocido por la enzima de restricción *BamH1*, los codones que codifican para los residuos que son reconocidos por la enzima enterocinasa y los codones correspondientes a los primeros 6 aminoácidos del N-terminal de la toxina. Y para amplificar el extremo 3' se emplea el oligonucleótido **Erg-Low** (ver figura 8).



pThioC + Ergtx1



pThioC + His6X-EK-Ergtx1



pThioC + Thioredoxina-EK-Ergtx1

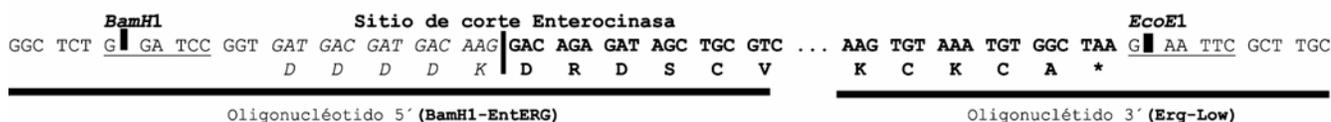


Figura 8. Clonación de los fragmentos Ergtx1, His6X-EK-Ergtx1 y Thioredoxina-EK-Ergtx1, en el vector de expresión citoplásmica pThioC.

1.2. Vectores de expresión periplásmica

Se generaron 3 construcciones empleando como templado de DNA el plásmido *pThioC+Ergtx1*, y diferentes oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. Las construcciones fueron amplificadas por PCR y digeridas con las enzimas de restricción correspondientes, para posteriormente ser clonadas en el vector pSyn1.

El vector pSyn1 está construido de tal manera que permite insertar una secuencia determinada y fusionarla al gen que codifica para el péptido señal, PelB. Su expresión es inducida con IPTG y su regulación se encuentra bajo el promotor *lac*. Presenta genes que

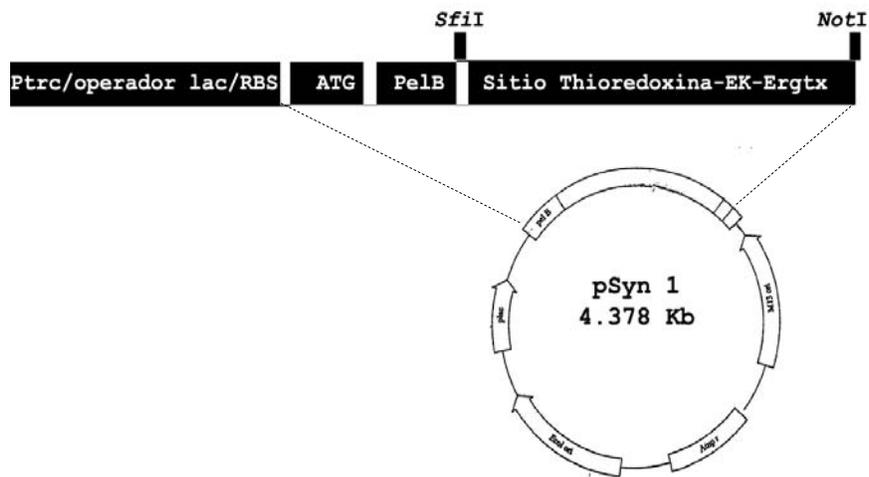
le confieren al huésped resistencia a ampicilina y a kanamicina, pero esta última es eliminada al insertar una secuencia en el vector.

a) **pSyn1 + Ergtx1**. Este vector tiene como característica permitir la expresión de la toxina Ergtx1, sin estar acompañada de alguna otra proteína de fusión y fue generado a partir del vector de expresión citoplásmica *pThioC+Ergtx1*. El extremo 5' fue amplificado con el oligonucleótido **Sfi-Erg**, en donde, los primeros once codones corresponden al sitio de reconocimiento por la enzima de restricción *SfiI* y los seis restantes codifican para los primeros seis residuos del N-terminal de la toxina Ergtx1. Para amplificar el extremo 3' se empleó el oligonucleótido **Not-Erg**, que contiene el sitio de reconocimiento por la endonucleasa *NotI*, dos codones de paro y los codones que corresponden a los últimos cinco residuos de la toxina (ver figura 9).

b) **pSyn1 + 6His-EK-Ergtx1**. La construcción de este plásmido permitió expresar la toxina Ergtx1 fusionada a una cola de histidinas, separadas por un sitio de corte enterocinasa y fue generada a partir del vector de expresión citoplásmica *pThioC+His6X-EK-Ergtx1*. Para amplificar el extremo 5' se empleó el oligonucleótido **Sfi-6His**, incluye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *SfiI*, los codones que codifican para seis residuos de histidinas y un codón que codifica para el primer residuo reconocido por la enzima enterocinasa. El oligonucleótido **Not-Erg**, se empleó para amplificar el extremo 3' (ver figura 9).

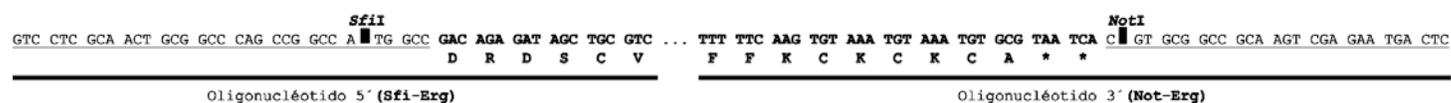
c) **pSyn1 + Thioredoxina-EK-Ergtx1**. Esta construcción permitió expresar la toxina Ergtx1 fusionada a la thioredoxina, separadas por un sitio de corte enterocinasa y

fue generada a partir del vector de expresión citoplásmica *pThioC+Thioredoxina-EK-Ergtx1*. Para amplificar el extremo 5' se empleó el oligonucleótido **Sfi-Thio**, incluye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *SfiI* y los codones que codifican para los primeros siete residuos del N-terminal de la proteína acarreadora thioredoxina. Se empleó el oligonucleótido **Not-Erg**, para amplificar el extremo 3' (ver figura 9).

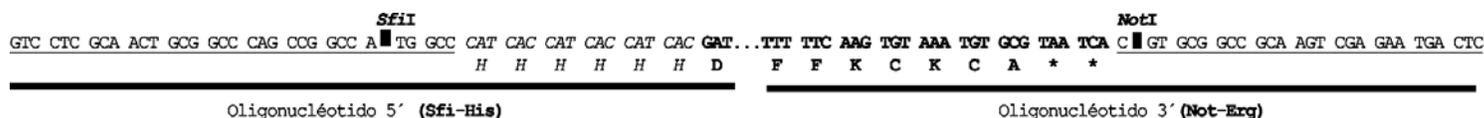


El Sitio Thioredoxina-EK-Ergtx1 puede ser sustituido por los sitios Ergtx1 o His6X-EK-Ergtx1.

pSyn1 + Ergtx1



pSyn1 + His6X-EK-Ergtx1



pSyn1 + Thioredoxina-EK-Ergtx1

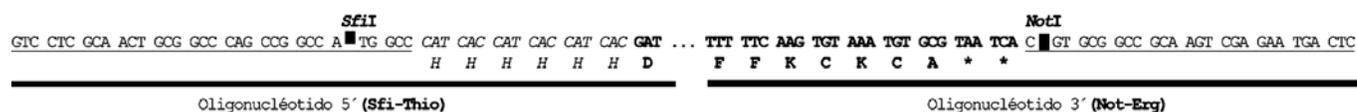


Figura 9. Clonación de los fragmentos Ergtx1, His6X-EK-Ergtx1 y Thioredoxina-EK-Ergtx1, en el vector de expresión periplásmico pSyn1.

2. Obtención de proteínas recombinantes en el citoplasma de la cepa Origami de *Escherichia coli* (rErgtx1, His6X-EK-Ergtx1, Thioredoxina-EK-Ergtx1)

2.1 Expresión de las proteínas recombinantes

Los plásmidos pThioC + Ergtx1, pThioC + His6X-EK-Ergtx1 y pThioC + Thioredoxina-EK-Ergtx1 fueron transformados de manera individual dentro de la cepa Origami de *Escherichia coli*. Las transformantes fueron crecidas en medio YT2X (16g de Triptona, 10g de Extracto de Levadura y 5g de NaCl/litro de cultivo) suplementado con ampicilina (200 µg/ml) a 37° C; una vez que se alcanzó una OD₆₀₀ de 0.3-0.5, se indujo la expresión de las proteínas con 1mM de IPTG. Se tomaron muestras antes y después de la inducción

determinando el nivel de expresión en un gel de SDS-PAGE. La cosecha se realizó durante 4 horas a 30° C después de la inducción.

2.2 Purificación por cromatografía de afinidad y digestión de la proteína de fusión

Las células fueron resuspendidas en un buffer (20mM Tris pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 5mM Imidazol; una tableta de inhibidores de proteasas) y lisadas con prensa francesa. El extracto fue clarificado por centrifugación por 20 minutos a 7,000 rpm a 4° C. El sobrenadante se dializó contra PBS1X (0.00081 mM Na₂HPO₄, 0.00146 mM KH₂PO₄, 0.1368 mM NaCl, 0.0026 mM KCl) para eliminar el imidazol y el EDTA, después se pasó a través de una columna de afinidad Ni²⁺-NTA, la columna se lavó con PBS1X. Las proteínas unidas a la resina fueron eluidas con buffer de elución (PBS1X, 250 mM Imidazol).

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 18%.

La fracción que contiene la proteína de fusión fue pasada a través de una columna C₄ semipreparativa, utilizando un gradiente 0-60% de acetonitrilo en 60 minutos en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por ELISA, para detectar en cual de ellas se encontraba la proteína de fusión.

La proteína de fusión fue digerida en el sitio de reconocimiento (DDDDK) por la enterocinasa recombinante EKMax (Invitrogen) en 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM CaCl₂, 1% Tween-20 (0.2 Unidades/50µg de proteína en 16 horas a 37 y 4° C). El producto de la digestión fue analizada en una electroforesis de SDS-PAGE al 20%.

De acuerdo a lo observado en la electroforesis, los productos de las digestiones fueron pasadas a través de una columna semipreparativa C₄ semipreparativa, utilizando un gradiente 0-60% de acetonitrilo en 60 minutos en presencia de 0.1% TFA. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por ELISA y por espectroscopia de masas (ver más adelante).

2.3 Análisis de Inmunoblots y ELISAS

Las proteínas se visualizaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 18%. Posteriormente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y sujetas a "Western blotting", para el cual se empleó un suero de conejo anti-Ergtx1 a una dilución 1/1000, así como un anticuerpo anti-conejo IgG acoplado a peroxidasa. La toxina recombinante, las proteínas de fusión y las fracciones cromatográficas fueron analizadas por ELISA.

2.4 Análisis de Proteínas: identificación de la secuencia y determinación del peso molecular por espectroscopía de masas

La proteína de fusión Thioredoxina-EK-Ergtx1 purificada por HPLC fue secuenciada por el método automatizado de degradación de Edman, en donde fue secuenciado el N-terminal de la proteína de fusión y por espectroscopía de masas se determinó el peso molecular tanto de la proteína de fusión como de las fracciones obtenidas del HPLC de la digestión con EKMax. Los métodos y técnicas empleadas están descritas en artículos publicados por nuestro laboratorio (ver Diego-García et al., 2006; Barona et al., 2006; Batista et al., 2006; Caliskan et al., 2006).

3. Obtención de proteínas recombinantes en el periplasma de la cepa TG1 de *Escherichia coli* (rErgtx1, His6X-EK-Ergtx1, Thioredoxina-EK-Ergtx1)

3.1 Expresión de las proteínas recombinantes

Los plásmidos pSyn1 + Ergtx1, pSyn1 + His6X-EK-Ergtx1 y pSyn1 + Thioredoxina-EK-Ergtx1, fueron transformados de manera individual dentro de la cepa TG1 de *Escherichia coli*. Las transformantes fueron crecidas en medio YT2X suplementado con ampicilina (200 µg/ml) y glucosa (0.1%) a 37° C, una vez alcanzada una OD₆₀₀ de 0.9 la producción de la proteína fue inducida con 1mM de IPTG. Se tomaron muestras antes y después de la inducción para determinar el nivel de expresión en un gel de Tricine-SDS-PAGE. La inducción se realizó durante 16 horas a 25°C.

3.2 Purificación por cromatografía de afinidad y digestión de la proteína de fusión

Después de la cosecha las células fueron centrifugadas y recibieron un choque osmótico, primero con PPB (250mg/ml Sacarosa, 1mM EDTA, 30 mM Tris-HCl pH 8.0) y posteriormente con 5mM MgSO₄. Después del choque osmótico se obtuvo el extracto periplásmico, el cual fue dializado contra PBS1X.

La purificación de la toxina se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina Cu⁺²-NTA a la cual se unió la proteína de fusión thioredoxina. Para eluir se utilizó 20 mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 100mM Imidazol. La elución se dializó contra el buffer de corte de la enzima EKMax (50 mM Tris pH 8.0, 1 mM CaCl₂, 1% Tween-20)

empleando una membrana de diálisis con un peso molecular de corte de 3,500 Da, se realizaron tres cambios de buffer en un lapso de 16 horas a 4 °C para eliminar el imidazol.

El corte con la enterocinasa EKMax se realizó a 37° C por 16 horas, se agregó 0.1U de enzima/50 µg de proteína.

Una muestra de la digestión se pasó a través de una columna de HPLC C₄ semipreparativa de fase reversa, aplicando un gradiente de acetonitrilo de 0-100%, en presencia de 0.1% de TFA por 100 minutos. Se colectaron las fracciones alrededor del tiempo de retención conocido en nuestro laboratorio (30-32 minutos) para la toxina nativa Ergtx1. Las fracciones obtenidas fueron analizadas en una electroforesis de Tricine-SDS-PAGE para identificar en cual de ellas se encuentra la toxina recombinante rErgtx1.

La fracción correspondiente a la toxina fue recromatografiada en una columna de HPLC C₁₈ analítica de fase reversa, aplicando un gradiente de acetonitrilo de 0-60%, en presencia de 0.1% de TFA por 60 minutos. La fracción que presentó el tiempo de retención más cercano al de la toxina nativa, se le determinó la estructura primaria por el método automatizado de Edman y el peso molecular por Espectrofotometría de Masas (ver Diego-García et al., 2006; Barona et al., 2006; Batista et al., 2006; Caliskan et al., 2006).

3.3 Análisis de Inmunoblots y ELISAS

Las proteínas recombinantes fueron analizadas por electroforesis de Tricine-SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y sujetas a "Western blotting", para el cual se empleó un suero de conejo anti-Ergtx1 a una dilución 1/1000, así como un anticuerpo anti-conejo IgG acoplado a peroxidasa. La toxina recombinante, las proteínas de fusión y las fracciones cromatográficas fueron analizadas por ELISA.

4. Generación de variantes de la Ergtx1

Para la mutagénesis sitio dirigida se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligo **M35A**

5'- CGC ACA TTT ACA CTT GAA AAA CGC ACA GGT TCC TCC ATT GTG-3'

Oligo **K13A**

5'- CA CGA TGC GCA GCA TAT GGA TAC-3'

Oligo **Y14A**

5'- GA TGC GCA AAA GCT GGA TAC TAC-3'

Oligo **Y17A**

5'-CA AAA TAT GGA TAC GCC CAA GAG TG-3'

Oligo **F37A**

5'-CG ACT TGC GGC CGC ACG TGA TTA CGC ACA TTT ACA CTT GGC AAA CAT ACA GGT TCC-3'

Oligo **K38A**

5'-CG ACT TGC GGC CGC ACG TGA TTA CGC ACA TTT ACA CGC GAA AAA CAT ACA GGT TCC-3'

Se generaron diez variantes, 6 mutantes simples (K13A, Y14A, Y17A, M35A, F37A y K38A) y 4 dobles mutantes (K13A/F37A, K13A/K38A, Y14A/F37A, Y17A/F37A) a partir del plásmido pSyn1+Thioredoxina-EK-Ergtx1, el cual fue empleado como templado en la amplificación de cada una de las variantes y como vector de expresión.

A continuación se mencionará la forma en la que se realizó cada una de las construcciones, algunas de ellas fueron amplificadas por PCR de empalme (ver figura 10). Se determinó la secuencia nucleotídica de ambas cadenas de cada una de ellas para verificar que fueran correctas.

- a) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-K13A**. Esta construcción se obtuvo en dos pasos, primero se realizó un PCR, se amplificó el extremo 5' empleando el oligonucleótido

K13A, que permite introducir el cambio de la lisina 13 por alanina y para el extremo 3' se utilizó el oligo **Not-Erg**. Una vez amplificado el fragmento, se realizó una amplificación por empalme, en donde, se empleó como templado el plásmido pSyn1+Thioredoxina-EK-Ergtx1. El fragmento amplificado es utilizado como "megaprimer" y para amplificar el extremo 5' se empleó el oligo **BamH1-EntERG** y el oligo **Not-Erg** para el extremo 3' (Ver figura 10).

- b) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-Y14A**. Esta construcción fue realizada de la misma forma que la construcción anterior. Primero se realizó el cambio de la tirosina 14 por alanina, utilizando el oligo **Y13A** para amplificar el extremo 5' y el oligo **Not-Erg** para el extremo 3'. Una vez amplificado el fragmento, se siguió el mismo procedimiento que la construcción anterior (Ver figura 10).
- c) **pSyn1 + Thior-EK-Ergtx-Y17A**. La construcción fue obtenida en dos pasos, primero se realizó un PCR, en donde, se amplificó el extremo 5' empleando el oligonucleótido **Y17A**, que introduce el cambio de la tirosina 17 por alanina y para el extremo 3' se utilizó el oligo **Not-Erg**. Una vez amplificado el fragmento, se realizó una amplificación por empalme, en donde, fue empleado como templado el plásmido pSyn1+Thioredoxina-EK-Ergtx1. El fragmento amplificado es utilizado como "megaprimer" y para amplificar el extremo 5' se empleó el oligo **BamH1-EntERG** y el oligo **Not-Erg** para el extremo 3' (Ver figura 10).
- d) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-M35A**. Esta construcción se obtuvo en dos pasos, primero se realizó un PCR, en donde, se amplificó el extremo 5' empleando el oligonucleótido **BamH1-EntERG**, incluye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *BamH1*, los codones que codifican para los cinco residuos reconocidos por la enterocinasa (*DDDDK*) y los codones que codifican para los primeros seis aminoácidos del N-terminal de la toxina Ergtx1. Para introducir la mutación sitio

específica se empleó el oligonucleótido **M35A**, este incluye los codones que codifican para los últimos 13 residuos de la toxina Ergtx1. El fragmento amplificado fue usado como templado y ahora se uso el oligo **BamH1-EntERG** para el extremo 5' y el oligonucleótido **Not-Erg** para el extremo 3' (Ver figura 10).

- e) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-F37A**. La construcción fue obtenida utilizando oligonucleótido **BamH1-EntERG** para amplificar el extremo 5' e incluye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *BamH1*, los codones que codifican para los cinco residuos reconocidos por la enterocinasa (*DDDDK*) y los codones que codifican para los primeros seis aminoácidos del N-terminal de la toxina Ergtx1. Para introducir el cambio de la fenilalanina por alanina y amplificar el extremo 3' se utilizó el oligonucleótido **F37A**, este incluye los codones que codifican para los últimos 11 residuos de la toxina ErgTx1, 2 codones de paro y un sitio de corte para la endonucleasa *NotI*.

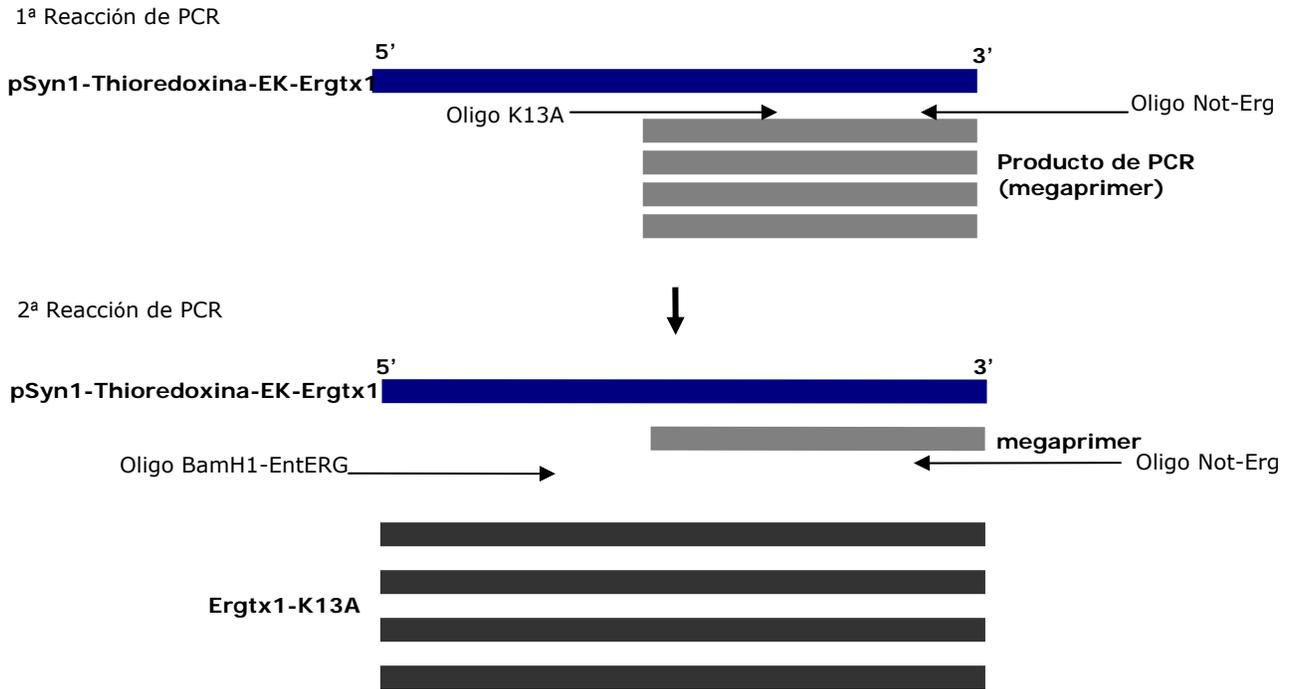
- f) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-K38A**. Para amplificar el extremo 5', se empleó el oligonucleótido **BamH1-EntERG** y para el extremo 3' el oligo **K38A**, que incluye los codones que codifican para los últimos 11 residuos de la toxina Ergtx1, el cambio de lisina 38 por alanina, 2 codones de paro y un sitio de corte para la endonucleasa *NotI*.

- g) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-K13A/F37A**. Esta construcción se obtuvo en dos pasos, primero se realizó un PCR, en donde, se amplificó el extremo 5' empleando el oligonucleótido **K13A**, que permite introducir el cambio de la lisina 13 por alanina y para el extremo 3' el oligo **F37A**, que incluye los codones que codifican para los primeros 11 residuos del C-terminal de la toxina Ergtx1, el cambio de fenilalanina 36 por alanina, 2 codones de paro y un sitio de corte para la endonucleasa *NotI*. Una vez amplificado el fragmento se realizó una amplificación por empalme, en

donde fue utilizado como templado el plásmido pSyn1+Thioredoxina-EK-Ergtx1. El fragmento amplificado es empleado como "megaprimer" y para amplificar el extremo 5' se empleó el oligo **BamH1-EntERG** y el oligo **F37A** para el extremo 3' (Ver figura 10).

- h) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-Y14A/F37A**. Esta construcción fue realizada de la misma forma que la construcción anterior. Primero se realizó el cambio de la tirosina 14 por alanina, utilizando el oligo **Y13A** para amplificar el extremo 5' y para el extremo 3' el oligo **F37A**. Una vez amplificado el fragmento se realizó una amplificación por empalme, en donde se empleó como templado el plásmido pSyn1+Thioredoxina-EK-Ergtx1. El fragmento amplificado es usado como megaprimer y para amplificar el extremo 5' se empleó el oligo **BamH1-EntERG** y el oligo **F37A** para el extremo 3' (Ver figura 10).
- i) **pSyn1 + Thior-EK-Ergtx-Y17A/F37A**. La construcción fue obtenida en dos pasos, primero se realizó un PCR, en donde, se amplificó el extremo 5' empleando el oligonucléotido **Y17A**, que introduce el cambio de la tirosina 17 por alanina y para el extremo 3' se utilizó el oligo **F37A**. Una vez amplificado el fragmento, se realizó el mismo proceso de amplificación que la construcción anterior (Ver figura 10).
- j) **pSyn1 + Thio-EK-Ergtx-K13A/K38A**. Esta construcción se obtuvo en dos pasos, primero se realizó un PCR, en donde, se amplificó el extremo 5' empleando el oligonucléotido **K13A**, que permite introducir el cambio de la lisina 13 por alanina y para el extremo 3' se empleó el oligo **K38A**, que incluye los codones que codifican para los primeros 11 residuos del C-terminal, el cambio de lisina 38 por alanina, 2 codones de paro y un sitio de corte para la endonucleasa *NotI*. Una vez amplificado el fragmento, se realizó una amplificación por empalme, en donde, se empleó como

templado el plásmido pSyn1+Thioredoxina-EK-Ergtx1. El fragmento amplificado es usado como "megaprimer" y para amplificar el extremo 5' se empleó el oligo **BamH1-EntERG** y el oligo **K38A** para el extremo 3' (Ver figura 10).



Las condiciones de la 2ª reacción de PCR fueron:
En un volumen final de 100µl

Buffer para Taq polimerasa	10µl
dNTP's	4µl
Oligonucleotidos	2µl c/u
DNA templado	0.001µl
Megaprimer	12 ul
Agua	
Taq Polimerasa	0.2µl

Programa empleado en esta reacción de PCR:

Un ciclo		
95° C	5 minutos	
30 ciclos		
95° C	1 minutos	
55° C	1 minutos	
72° C	1 minutos	
Un ciclo		
72 ° C	10 minutos	

Figura 10. Ejemplo de como se lleva a cabo la amplificación de las variantes K13A, Y14A, Y17A, M35A, K13A/F37A, Y14A/F37A, Y17A/F37A, K13A/K38A por PCR de empalme.

Para la clonación, secuenciación, expresión y purificación de cada una de las mutantes se siguió el mismo protocolo empleado en la expresión de la toxina recombinante Ergtx1 en el sistema de TG1.

5. Ensayos electrofisiológicos

Con el fin de registrar las corrientes de potasio de estudio en este trabajo se utilizó la técnica "*Patch-clamp*" en su configuración "*whole-cell*". Esta técnica desarrollada a principios de los ochenta (Hamill et al., 1981), permite fijar el potencial de membrana de una célula o parte de su membrana y registrar las corrientes iónicas que aparecen al aplicar potenciales hiperpolarizantes y despolarizantes. El fundamento de esta técnica consiste en formar un sello de alta resistencia entre una micropipeta de vidrio con un microelectrodo en su interior y la membrana de la célula. La micropipeta se llena con la solución interna cuya composición varía dependiendo de la corriente a estudiar. Al poner la pipeta sobre la superficie de la célula se aplica una presión negativa mediante una ligera succión de tal forma que la porción de la membrana localizada en la luz de la pipeta se invagina formando un sello de alta resistencia. A partir de este punto, para conseguir la configuración de célula completa "*whole-cell*" se aplica una succión adicional rompiendo la porción de la membrana invaginada. Tras la rotura del parche de la membrana están en contacto la solución interna y el citoplasma celular cambiando inmediatamente la composición de este último. En estas condiciones se fija el potencial de membrana al potencial deseado y mediante distintos protocolos se registra la corriente deseada. La corriente resultante es la suma de todos los canales presentes en la membrana activables con las condiciones determinadas o también llamadas corrientes microscópicas. El equipo

utilizado, las soluciones empleadas y el protocolo realizado para los distintos registros se describirán a continuación.

5.1 Cultivo Celular

Los registros electrofisiológicos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Enzo Wanke (Departamento de Biotecnología y Biociencia, Universidad de Milano-Bicocca, Milano, Italia). El cDNA que codifica para el canal de potasio *herg1*, se expresó en células HEK ("Human Embryonic Kidney") y fueron cultivadas en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 4.5 g/l de glucosa y suero fetal bovino al 10%. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

5.2 Soluciones

La solución extracelular contiene: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM buffer HEPES-NaOH, 5mM D-Glucosa, pH7.4.

Durante los ensayos biofísicos, las células fueron perfundidas con la solución extracelular concentrada de iones K⁺ (40 mM), en la cual el NaCl fue remplazado por cantidades equimolares de KCl.

La solución intracelular (pipeta) contiene: 130 mM Aspartato-K⁺, 10mM NaCl, 2mM MgCl₂, 10mM EGTA-KOH y 10 mM HEPES-KOH, pH 7.3 y una concentración normal de iones Ca⁺² (~50 mM).

La toxina fue disuelta en la solución extracelular inmediatamente antes de los experimentos. Se emplearon 50 nM de toxina en cada ensayo.

5.3 Registros de "Patch-Clamp"

Las corrientes fueron registradas a temperatura ambiente en las células HEK establemente transfectadas por medio del MultiClamp 700A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La resistencia de la pipeta fue aproximadamente de 1.5 -2.2 MΩ. Los errores de capacitancia celular y de resistencia en serie fueron compensados entre un 85-90% antes de cada protocolo de "voltage clamp". Las corrientes fueron filtradas con un filtro pasabajas a 5 KHz. La adquisición y procesamiento de datos se realizó utilizando los programas pClamp (versión 7.0, Axon Instruments Co., U.S.A.) y Origin (versión 4.1, Microcal Software, Nothampton, MA). La frecuencia de adquisición fue de 10 KHz.

5.4 Protocolo experimental y análisis de datos

La toxina se perfundió disuelta en la solución extracelular a una concentración de 50 nM.

Una de las primeras pruebas para observar si la toxina tiene efecto sobre el canal HERG fue aplicar un pulso de -120 mV con un potencial de mantenimiento de -70mV, posteriormente se dejó perfundir la toxina y se repite el protocolo anterior.

Para determinar si el efecto de la toxina sobre el canal es dependiente del potencial, se aplicó un pulso de -120 mV y durante la aplicación de la toxina y en el lavado se usó un potencial de mantenimiento de -70 mV y de +30 mV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Clonación del gen Ergtx1 dentro de dos diferentes vectores de expresión

Las construcciones en pThioC y pSyn1 fueron generadas mediante la clonación de productos de PCR con extremos cohesivos, se eligieron al azar las clonas resultantes y se

Las corrientes fueron registradas a temperatura ambiente en las células HEK establemente transfectadas por medio del MultiClamp 700A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La resistencia de la pipeta fue aproximadamente de 1.5 -2.2 MΩ. Los errores de capacitancia celular y de resistencia en serie fueron compensados entre un 85-90% antes de cada protocolo de "voltage clamp". Las corrientes fueron filtradas con un filtro pasabajas a 5 KHz. La adquisición y procesamiento de datos se realizó utilizando los programas pClamp (versión 7.0, Axon Instruments Co., U.S.A.) y Origin (versión 4.1, Microcal Software, Nothampton, MA). La frecuencia de adquisición fue de 10 KHz.

5.4 Protocolo experimental y análisis de datos

La toxina se perfundió disuelta en la solución extracelular a una concentración de 50 nM.

Una de las primeras pruebas para observar si la toxina tiene efecto sobre el canal HERG fue aplicar un pulso de -120 mV con un potencial de mantenimiento de -70mV, posteriormente se dejó perfundir la toxina y se repite el protocolo anterior.

Para determinar si el efecto de la toxina sobre el canal es dependiente del potencial, se aplicó un pulso de -120 mV y durante la aplicación de la toxina y en el lavado se usó un potencial de mantenimiento de -70 mV y de +30 mV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Clonación del gen Ergtx1 dentro de dos diferentes vectores de expresión

Las construcciones en pThioC y pSyn1 fueron generadas mediante la clonación de productos de PCR con extremos cohesivos, se eligieron al azar las clonas resultantes y se

realizó PCR en colonia. De las clonas que resultaron positivas se purificó plásmido y se hicieron digestiones con las enzimas de restricción correspondientes, para verificar la clonación del fragmento en cada construcción. Y por último para comprobar que las construcciones tuvieran la orientación y fase correcta se determinó la secuencia nucleotídica.

2. Expresión y purificación de la rErgtx1 en la cepa Origami

El DNA que codifica para el péptido maduro de la Ergtx1 presenta codones que codifican para ocho residuos de cisteínas, las cuales en condiciones nativas están formando puentes disulfuro, y dan estabilidad a la estructura del péptido. En bacterias con citoplasma reductor se han expresado proteínas que contienen cisteínas, obteniéndose productos desplegados. Nosotros usamos la cepa Origami de *Escherichia coli*, que a diferencia del resto de las bacterias, presenta una doble mutación en el gen *trxB/gor*, confiriéndole un citoplasma oxidante y permitiendo la formación de puentes disulfuro de las proteínas expresadas en este compartimento.

La expresión de la rErgtx1 fue variable dependiendo del vector de expresión empleado.

2.1. pThioC + rErgtx1

Los cultivos transformados con el plásmido recombinante fueron inducidos con 1 mM de IPTG por un período de 4 horas a 30° C. La proteína se expresó en cantidades muy bajas por lo que solo fue posible detectarla por ensayos de ELISA. Se han realizado varios ensayos modificando las condiciones de expresión, pero aún no se ha logrado mejorar la producción de la toxina recombinante sin fusión.

2.2. pThioC + His6X-EK-Ergtx1

Con este sistema se usaron diferentes condiciones de expresión, pero sólo se logró detectar la proteína por ELISA.

2.3. pThioC + Thioredoxina-EK-Ergtx1

El gen que codifica para la toxina Ergtx1 se expresa como proteína de fusión: thioredoxina-EK-Ergtx1. La producción de la proteína de fusión fue inducida con 1 mM de IPTG. La inducción de la proteína de fusión se confirmó en un gel de SDS-PAGE al 18%, como se indica en la figura 11A, en la cual se observan bandas que presentan un peso molecular al esperado (**17,338 Da**, 12,607.7 Da, de la thioredoxina más 4,730.4 Da, de la toxina recombinante).

Para la purificación de la proteína de fusión se usó la resina de afinidad Ni⁺²-NTA en la cual se obtienen 3 fracciones: el extracto cargado a la columna, el lavado y la elución. En condiciones óptimas la fracción de elución debería de contener una mayor concentración de la proteína de fusión en comparación al resto de las fracciones, pero como se observa en la figura 11B, esto no es así, se observa que la mayor cantidad de la proteína de fusión se concentra en mayor proporción en la fracción de lavado.

Para comprobar la identidad de la proteína de fusión se realizó un "Western blotting" utilizando anticuerpos policlonales anti-Ergtx1 de conejo, resultando una señal positiva como se observa en la figura 11C.

La fracción de lavado se pasó a través de una columna semipreparativa C₄, obteniéndose varias fracciones, como se observa en la figura 12, cada una de ellas fueron analizadas por ELISA obteniendo un resultado positivo en el tiempo de retención **57.16**. A

esta fracción se le determinó un peso molecular de **17,338 Da** (peso esperado, que además sugiere que la proteína de fusión está plegada) y secuencia de aminoácidos, obteniéndose los primeros 8 residuos del N-terminal de la proteína de fusión (**SDKIIHLT**).

Al hacer la digestión de la proteína de fusión purificada por HPLC con la enterocinasa, se obtiene una banda correspondiente al tamaño esperado de la proteína acarreadora (thioredoxina, 12.607.7 KDa, ver figura 13), mientras que en la posición en donde se espera la toxina recombinante se observa un barrido similar al de la toxina nativa, lo cual sugiere la presencia de la toxina recombinante.

Este sistema es el que mejor ha funcionado en comparación a los dos anteriores, la presencia de la thioredoxina como proteína acarreadora nos proporcionó ciertas ventajas, debido a que está se sobreexpresa en *Escherichia coli*, aumenta la expresión de lo que vaya unido a ella. Es muy soluble, permitiendo una mayor recuperación de la proteína de fusión en la fracción soluble.

Los rendimientos obtenidos de proteína de fusión en este sistema de expresión se muestran en la tabla 4, en la cual las dos últimas columnas de la derecha indican el porcentaje y concentración de toxina recombinante en relación al porcentaje de proteína de fusión recuperada en cada etapa. Sin embargo, debido a los problemas que surgieron en cada etapa de purificación solo fue posible ver la toxina en gel.

Tabla 4.- Rendimientos de proteína de fusión y toxina recombinante en el sistema de expresión pThioC

<i>Etapas de Purificación</i>	<i>Total de Proteína de fusión</i>	<i>Rendimiento Proteína de fusión</i>	<i>% de Toxina teórico</i>	<i>Toxina teórico</i>
Extracto de células completas	15 mg/lit de cultivo	100%	27%	4 mg/lit

Purificación por columnas de Ni ²⁺ -NTA	1 mg/lt de cultivo	6.7%	1.8%	0.260 mg/lt
Purificación por HPLC	0.75 mg/lt de cultivo	5%	1.3%	0.190 mg/lt
Purificación por HPLC después de digerir con enterocinasa	0.15 mg/lt de cultivo	1%	1%	0.180 mg/lt

De acuerdo a los resultados obtenidos con este sistema de expresión se confirma que la purificación es el punto clave, por lo que se requiere trabajar más en este punto y probar otras opciones de purificación primaria, como filtración en gel o precipitación diferencial con sulfato de amonio, para evitar tantas pérdidas de proteína.

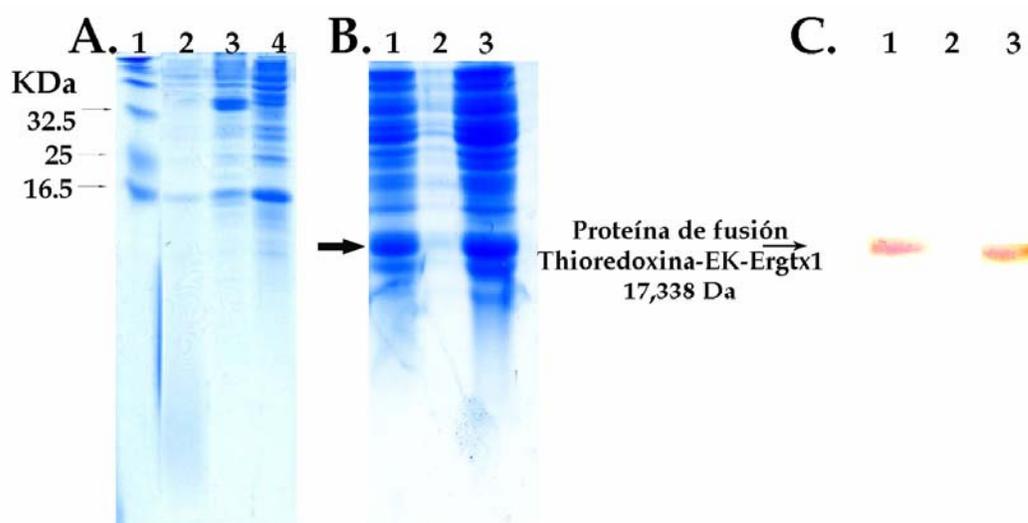


Figura 11. SDS-PAGE al 18% y Western blot. (A) Expresión de la proteína de fusión Thioredoxina-EK-Ergtx1. En el carril 1). Marcador de peso molecular; 2). Medio de cultivo, 3). Fracción insoluble; 4). Fracción soluble, que contiene la proteína de fusión. **(B). Purificación de la proteína de fusión Thioredoxina-EK-por columna de Ni²⁺-Nta.** En el carril 1). Fracción de lavado; 2). Elución; 3). Extracto cargado a la columna. **(C). Western blot de B con anticuerpos de conejo α -Ergtx1.**

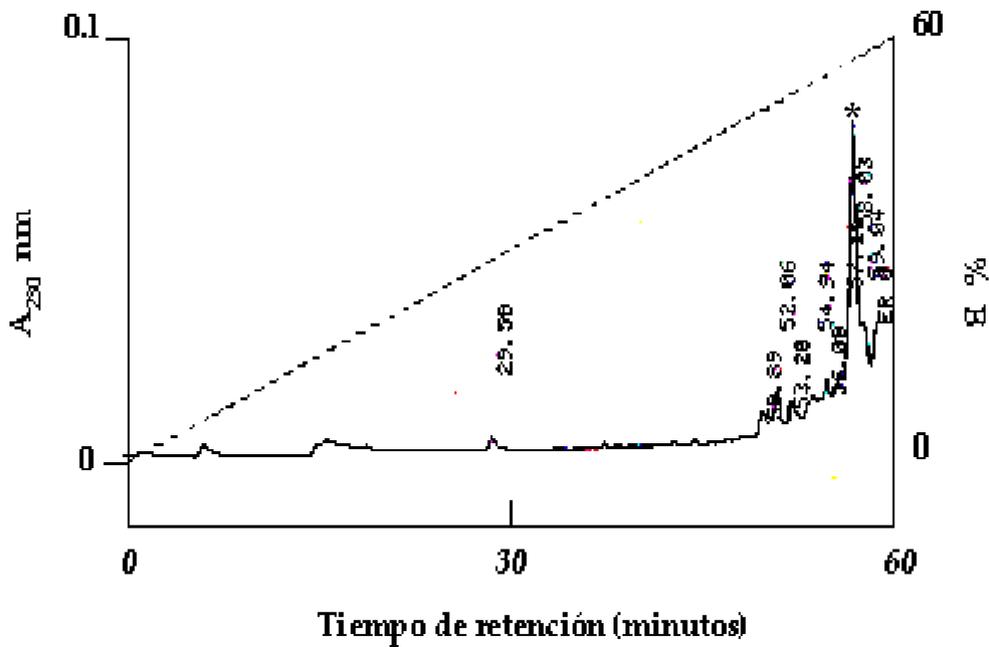


Figura 12

160µg de

proteína de la fracción de lavado en una columna semipreparativa C₄, el cromatograma muestra un pico mayoritario al minuto 57.16*, correspondiente a la proteína de fusión.

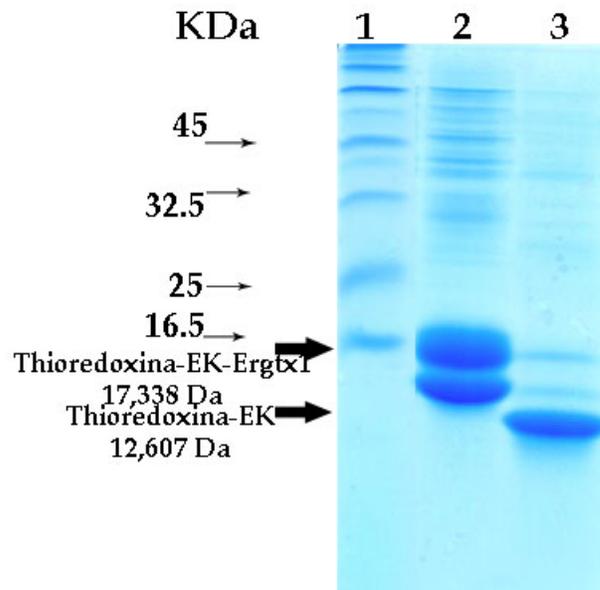


Figura 13. Digestión de la proteína Thioredoxina-EK-Ergtx1 con EKMax, SDS-PAGE al 20%.

En el carril 1). Marcador de peso molecular; carril 2). Proteína de fusión purificada por HPLC sin digerir; Carril 3). Proteína de fusión digerida a 37°C con 0.2 U de enterocinasa por 50 µg de proteína.

3. Expresión y purificación de la rErgtx1 en la cepa TG1

La expresión de la rErgtx1 fue variable dependiendo del vector de expresión empleado.

3.1 pSyn1 + Ergtx1, pSyn1 + His6X-EK-Ergtx1

En la expresión de ambos plásmidos, en la cepa TG1 de *Escherichia coli*, el extracto periplásmico fue recolectado al aplicar un choque osmótico a las células con PPB y MgSO₄. las proteínas fueron monitoreadas con geles de tricine-SDS-PAGE y confirmadas por ensayos de ELISA. Aunque no se observan claramente bandas que presenten un peso similar al de la toxina recombinante Ergtx1 o al de la proteína de fusión His6X-EK-Ergtx1 (4,738. Da y 6,149.7 Da, ver figura 14), el ensayo de ELISA da resultados positivos.

Se realizaron varios ensayos modificando las condiciones de expresión, sin embargo no se ha logrado mejorar el resultado.

3.2 pSyn1 + Thioredoxina-EK-Ergtx1

La toxina rErgtx1 fue expresada como proteína de fusión, al ser inducida con 1mM de IPTG a 37°C. Se estima que la concentración de proteína de fusión producida fue de 6 mg por litro de cultivo. En la figura 14, se logró apreciar claramente una banda que presenta el peso molecular de la proteína de fusión (**17,338 Da**) y esta representa aproximadamente el 15% de las proteínas expresadas en periplasma.

El extracto periplásmico es dializado para eliminar el EDTA, posteriormente se pasó a través de la columna de afinidad Cu⁺²-NTA. La limitante que se sigue presentando en este sistema es el primer paso de purificación, aunque en la elución se logra concentrar una

mayor cantidad de la proteína de fusión que en la fracción de lavado, obteniéndose mejores resultados que con el uso de la resina Ni-NTA (ver figura 15A).

La elución fue digerida con 0.1 U de enterocinasa por cada 50 μ g de proteína a 37°C por 16 horas (ver figura 15B). La digestión fue concentrada y pasada por el HPLC en una columna semipreparativa C₄ (ver figura 16A). De las fracciones obtenidas se realizó un gel de Tricine-SDS-PAGE, observándose que en el tiempo de retención **32.08** min se encuentra la toxina recombinante Ergtx1 y en el tiempo **58.32** min la proteína de acarreadora (Thioredoxina-EK, ver figura 15B).

Las fracciones obtenidas en el tiempo de retención **32.08** fueron recromatografiadas utilizando una columna C₁₈ analítica. Entre las fracciones obtenidas, se encontró un pico mayoritario en el tiempo de retención **30.19** (ver figura 17), al cual se le determinó un peso molecular de **4,730.3 Da** (lo cual indica que la toxina se encuentra plegada) y la secuencia de los primeros 30 residuos del N-terminal (**DRDSCVDKSRCAKYGYQECQDCCKNAGHN**), que corresponden a la toxina Ergtx1.

También se realizaron ensayos electrofisiológicos de la fracción 30.19 en células HEK transfectadas establemente con el canal de potasio *herg1*, en la figura 18 se ilustran el efecto producido por la aplicación de la toxina recombinante Ergtx1 (50nM) sobre la corriente de potasio. En la figura A se muestra el bloqueo del canal de potasio por la rErgtx1 con recuperación de corriente, empleando un potencial de mantenimiento de -70 mV y un pulso de prueba de -120mV y en la figura B se ve como cambia la corriente al pico durante la aplicación de la toxina y en el lavado usando un pulso de prueba de -120mV y un potencial de mantenimiento de -70 mV y +30 mV.

Con este sistema de expresión se han obtenido buenos resultados, pero aún es necesario trabajar en la optimización del proceso de purificación, ya que en la primera parte se está perdiendo una gran cantidad de proteína de fusión (ver tabla 5), recuperando sólo **100 µg/l** de la toxina recombinante Ergtx1.

Tabla 5.- Rendimientos de proteína de fusión y toxina recombinante en el sistema de expresión pSyn1

<i>Etapas de Purificación</i>	<i>Total de Proteína de fusión</i>	<i>Rendimiento Proteína de fusión</i>	<i>% de Toxina</i>	<i>Toxina</i>
Extracto periplásmico	6 mg/lit de cultivo	100%	27%	1.6 mg/lit
Purificación por columnas de Cu ² -NTA	1 mg/lit de cultivo	16.7%	4.5%	0.27 mg/lit
Purificación por HPLC	0.75 mg/lit de cultivo	12.5%	3.3%	0.2 mg/lit
Purificación por HPLC después de digerir con enterocinasa	0.25 mg/lit de cultivo	4.2%	1.65%	0.10 mg/lit

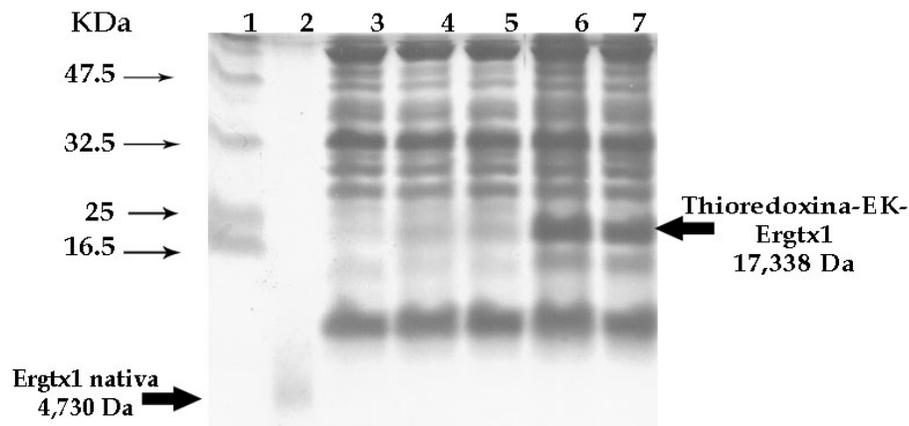


Figura 14. Gel de Tricine-SDS-PAGE de la rErgtx1 producida en los diferentes sistemas de expresión en el periplasma de la cepa TG1. En el carril 1). Marcador de peso molecular; 2). Toxina Ergtx1 nativa; 3). Extracto periplásmico de la expresión de la toxina rErgtx1; 4 y 5). Extracto periplásmico de la expresión de la proteína His6X-EK-Ergtx1; 6 y 7). Extracto periplásmico de la expresión de la proteína Thioredoxina-EK-Ergtx1

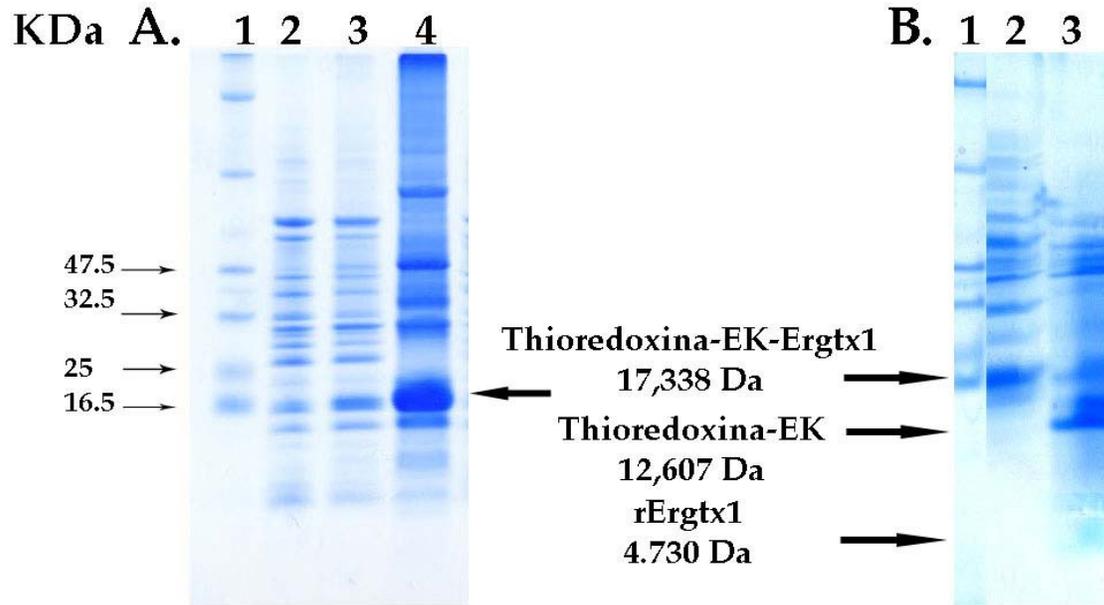


Figura 15. Geles de Tricine-SDS-PAGE. (A). Purificación de la proteína Thioredoxina-EK-Ergtx1 por columna de afinidad Cu^{+2} -NTA. En el carril 1). Marcador de peso molecular; 2). Fracción del extracto de proteína cargado a la columna; 3). Fracción de lavado; 4). Elución. **(B). Digestión de la proteína Thioredoxina-EK-Ergtx1 con EKMAX.** En el carril 1). Marcador de Peso Molecular; 2). Proteína de fusión no digerida; 3). Proteína de fusión digerida.

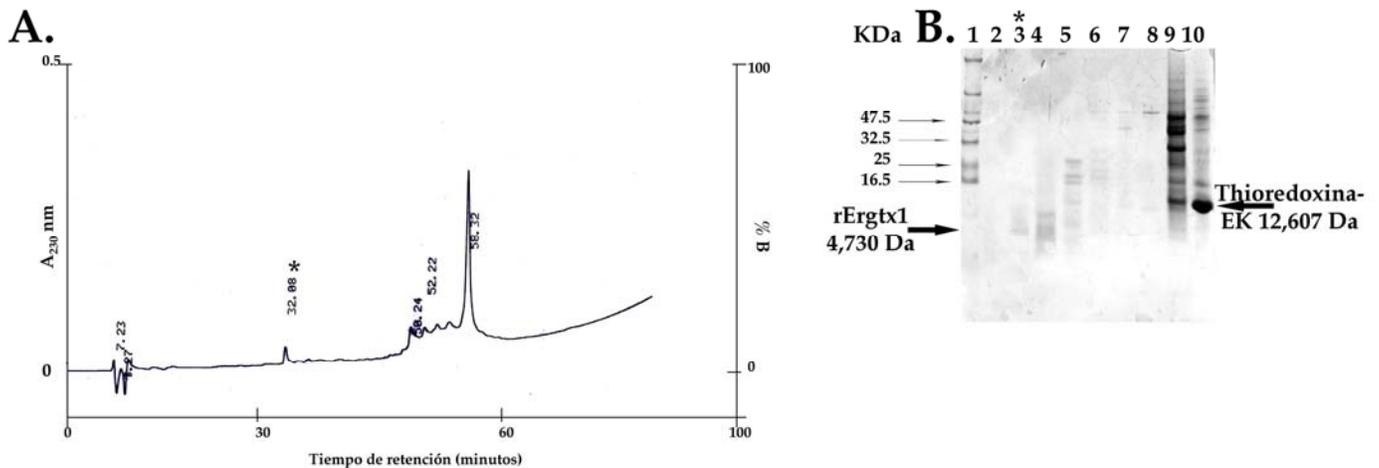


Figura 16. Purificación de la rErgtx1 por HPLC. (A). Cromatograma de HPLC correspondiente al producto de la digestión de Thioredoxina-EK-Ergtx1 (175 μg de proteína). Muestra dos picos en los tiempo de retención 32.08* y 58.32. **(B). Gel de Tricina-SDS-PAGE.** En el carril 1). Marcador de peso molecular; 3). Tiempo 32.08*, que corresponde a la toxina recombinante; 4-9). Tiempos 40-56; 10). Tiempo 58.32 que corresponde a la proteína acarreadora (Thioredoxina-EK).

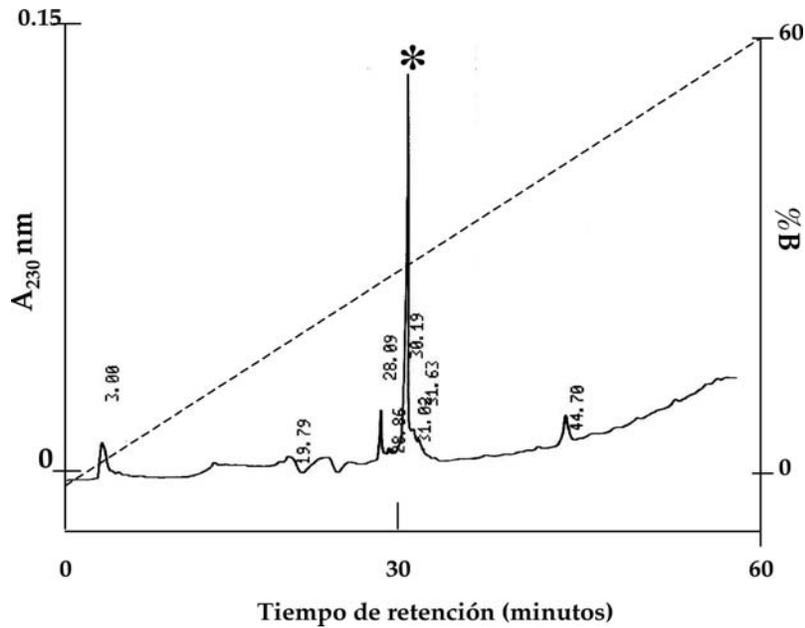


Figura 17. Purificación de rErgtx1 por HPLC. Recromatografía de la fracción obtenida en el tiempo 32.08 (133 μg de proteína) en la que se muestra un pico mayoritario al minuto 30.19*, correspondiente a la toxina recombinante Ergtx1.

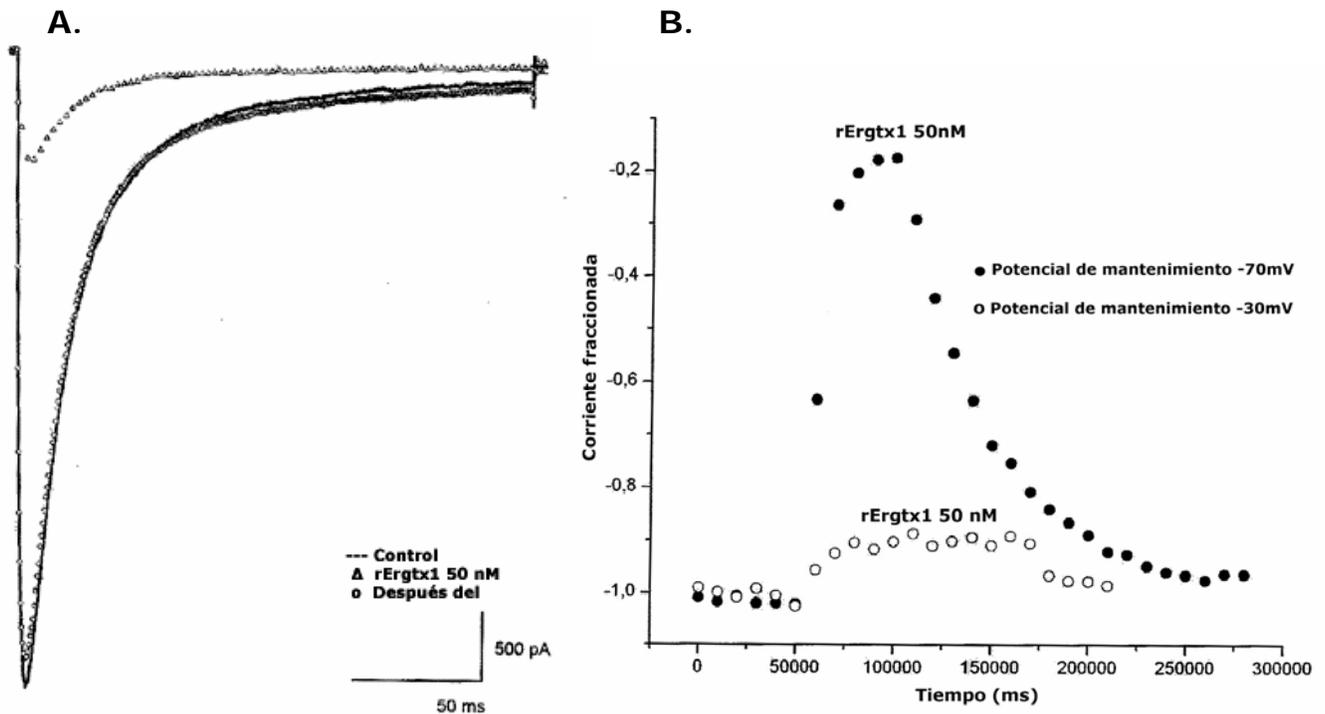


Figura 18. Efectos de la Toxina recombinante Ergtx1 sobre el canal *herg1*. (A). Ilustra el bloqueo con recuperación de la corriente (corresponde al pulso a -120 mV del protocolo con holding -70 mV). (B). Se ve como cambia la corriente al pico durante la aplicación de la toxina y en lavado usando holding a -70 mV y $+30$ mV.

4. Generación de variantes de la toxina Ergtx1

4.1 Consideraciones referentes a la interacción canal HERG y Ergtoxina1

Estudios realizados sobre las interacciones toxina Ergtx1-canal HERG han demostrado que el lazo que une al segmento transmembranal S5 con el poro del canal (residuos 583-597) presenta una forma de hélice α anfipática, en donde varios residuos de este segmento (W585, G590, Q592 y I593) son determinantes en la unión con la toxina Ergtx1, así como, el residuo P632 que forma parte de la unión del segmento transmembranal S6 con el Poro (Pardo-López et al., 2002).

Por otro lado, la toxina Ergtx1 presenta un parche hidrofóbico dentro de su estructura, formado por los residuos aromáticos Y14, F36, F37, además de un residuo cargado K13 que se encuentra a la mitad de este parche. Estos residuos pueden tener una contribución significativa en la interacción de la toxina con el segmento que forma la hélice α anfipática en el canal de potasio HERG.

También, existen varios residuos ácidos (D1, D3, D7, D22 y E19) localizados dentro o cerca de lado helicoidal, opuestos a la triple cadena plegada β de la toxina, por lo que es posible que estos estén interaccionando electrostáticamente con residuos cargados positivamente presentes en el canal (N582, K595, K608, K610 y K63; Torres et al., 2003). Aunque en estudios realizados por Pardo-López se observa que al mutar los residuos K595C y K638C hay una pérdida de afinidad por la toxina, en tanto que en las mutantes N582C, K608C y K610C no se ve afectada esta (Pardo-López et al., 2002).

Más adelante Frénal y cols., en el 2004, sugieren que el parche hidrofóbico esta formado por los residuos aromáticos Y14, Y16, Y17 y F36 en la Ergtx1 pueden unirse estrechamente a W585 e I593 sobre la hélice α anfipática del canal.

Además suponen la presencia de un parche hidrofílico formado por 2 residuos de lisina (K13 y K38), en donde sus aminas protonadas (RNH_3^+) pueden interactuar con las cadenas laterales de residuos aromáticos y formar una interacción catiónica de tipo π , que es comparable a un típico puente de hidrógeno. Así, K13 y K38 pueden tener una interacción con W585, mientras que el residuo P632 puede formar un puente de hidrógeno con el parche hidrofílico de la Ergtx1, la cual puede anclarse a alguna cara de la toxina sobre el fondo del vestíbulo externo del canal (Frenal et al., 2004).

En trabajos del grupo se tiene como antecedente que el residuo M35 de la Ergtx1 al oxidarse en la toxina nativa su afinidad por el canal se reduce a tres ordenes de magnitud, por lo que se piensa que este aminoácido puede estar estructuralmente expuesto, interactuando directamente con el canal o bien esta formando puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura secundaria de la toxina.

Alineamientos de las secuencias primarias de las toxinas que afectan al canal HERG, presentes en el veneno de alacranes del género *Centruroides*, muestran regiones muy conservadas, posiblemente involucradas en la interacción de la toxina con el canal (ver figura 2).

De acuerdo a las consideraciones anteriores se tomó la decisión de realizar mutaciones puntuales simples sustituyendo por alanina algunos residuos que forman parte del parche hidrofóbico, Y14, Y17 y F37; así como K13 y K38 que constituyen al parche hidrofílico. Y mutaciones dobles K13/F37, Y14/F37, Y17/F37, K13/K38 que afectarán a ambos parches. Las mutaciones pueden causar cambios significativos en la estructura secundaria de las variantes de la toxina comparadas con la toxina nativa y como consecuencia modificar la afinidad de la toxina por el canal de potasio HERG.

Los resultados de este proyecto pueden definir que residuos de la toxina Ergtx1 son responsables del bloqueo del canal, de que manera estan interaccionando con este y si hay un cambio conformacional al llevarse acabo la interacción toxina-canal.

Se generaron las 10 variantes del gen de la toxina Ergtx1, mediante técnicas de PCR. Se determinó la secuencia nucleotídica de cada una de ellas, comprobando con ello que presentan los cambios propuestos. A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos de cada una, la posición que lleva el cambio de residuo esta subrayada.

rErgtx1	DRDSCVDKSRCAKYGYYQECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA
rErgtx1 K13A	DRDSCVDKSRCA <u>Y</u> YGYYQECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA
rErgtx1 Y14A	DRDSCVDKSRCAK <u>G</u> YGYQECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA
rErgtx1 Y17A	DRDSCVDKSRCAKYG <u>Y</u> QECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA
rErgtx1 M35A	DRDSCVDKSRCAKYGYYQECQDCCKNAGHNGGTC <u>M</u> FFKCKCA
rErgtx1 F37A	DRDSCVDKSRCAKYGYYQECQDCCKNAGHNGGTCMFF <u>F</u> CKCA
rErgtx1 K38A	DRDSCVDKSRCAKYGYYQECQDCCKNAGHNGGTCMFF <u>K</u> CKCA
rErgtx1 K13A/F37A	DRDSCVDKSRCA <u>Y</u> YGYYQECQDCCKNAGHNGGTCM <u>F</u> AKCKCA
rErgtx1 Y14A/F37A	DRDSCVDKSRCAK <u>G</u> YGYQECQDCCKNAGHNGGTCM <u>F</u> AKCKCA
rErgtx1 Y17A/F37A	DRDSCVDKSRCAKYG <u>Y</u> QECQDCCKNAGHNGGTCM <u>F</u> AKCKCA
rErgtx1 K13A/F37A	DRDSCVDKSRCA <u>Y</u> YGYYQECQDCCKNAGHNGGTCMFF <u>K</u> CKCA

Figura 19. Alineamiento de secuencias primarias de la toxina Ergtx1 y de las variantes generadas. En los recuadros se muestran los residuos que fueron sustituidos por alaninas.

Las mutantes K13A, Y14A, Y17A, M35A, F37A, K38A, K13A/F37A, Y14A/F37A, Y17A/F37A, K13A/F37A fueron expresadas en las misma condiciones que la toxina silvestre (sistema de expresión en TG1). Se estima que la cantidad de proteína de fusión producida por absorbancia a 280nm es de 5 mg/l de cultivo. En la figura 20A se observan bandas que corresponden al peso molecular de las proteínas de fusión mutantes (\approx 17,200 Da), además se realizó un "Western blotting", para comprobar su identidad, utilizando anticuerpos policlonales anti-Ergtx1 de conejo, observándose una señal positiva, como se aprecia en la figura 20B.

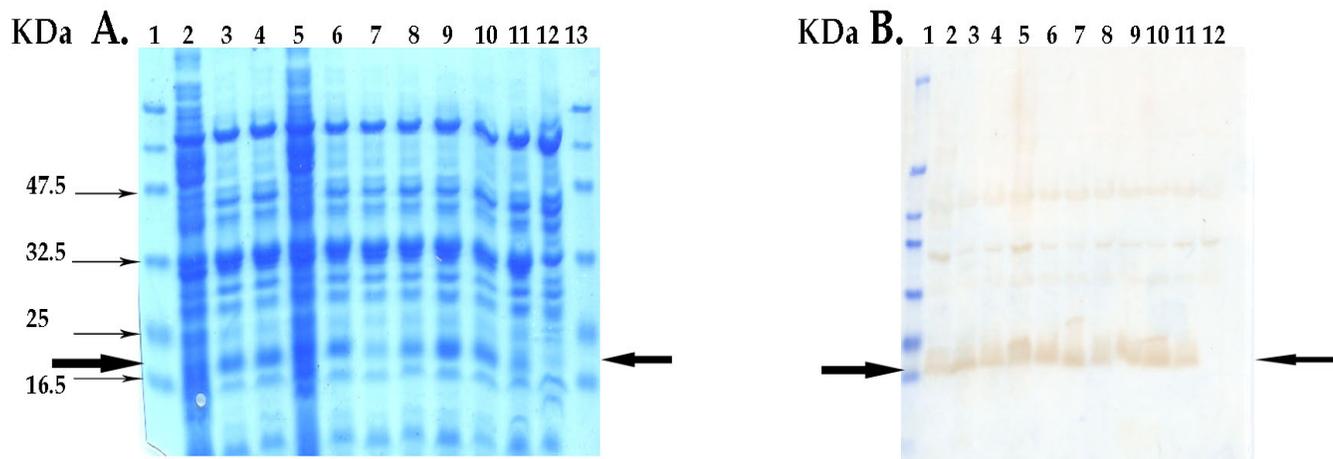


Figura 20. Gel Tricine-SDS-PAGE y Western blot de los productos de expresión de las variantes generadas fusionadas a la Thioredoxina. (A). Gel Tricine-SDS-PAGE. En el carril 1 y 13). Marcador de peso molecular; 2). K13A; 3). Y14A; 4). Y17A; 5). M35A; 6). F37A; 7). K38A; 8). K13A/F37A; 9). Y14A/F37; 10). Y17A/F37A; 11). K13A/K38A; 12). Extracto periplásmico de TG1. **(B). Western blot.** Las muestras fueron cargadas en el mismo orden.

Hasta ahora solo se han obtenido estos resultados de las variables mutagénicas, a excepción de la mutante M35A, con la cual hemos trabajado más tiempo y se han empleado varios métodos de purificación a parte de las columnas de níquel-cobre, obteniendo resultados no favorables. Los métodos empleados fueron filtración en gel, utilizando diferentes resinas (Biogel-P30, Sephadex G-75 mediano, Supherdex G-50 fino) y una columna de 2 mX1.2 cm de diámetro, además se probaron diferentes condiciones de separación (250 mM NaCl, 6M de cloruro de guanidinio, ácido acético pH 4.0, intercambio iónico y aniónico). Sin embargo ninguna de ellas resuelve el problema. También se realizó un gradiente de sulfato de amonio, que va del 10% de saturación al 75%, pero nuestra proteína comienza a precipitar al 15% de saturación juntos con otras proteínas del extracto periplásmico.

Por el momento la proteína de fusión M35A, fue semipurificada mediante las columnas de cobre, la fracción eluida fue digerida con 0.1 U de enterocinasa por cada 50 μ g de

proteína a 37°C por 16 horas (ver figura 21). La digestión fue concentrada y pasada por HPLC en una columna semipreparativa C₄, utilizando un gradiente lineal de 0-75% de B en 75 minutos (ver figura 22A). De las fracciones obtenidas se realizó un gel Tricine-SDS-PAGE, observándose que en los tiempos de retención **36.22**, **38.38**, **50.27** y **51.76** se observan bandas que corresponderían por la migración y el peso molecular a la mutante M35A y en el tiempo **57.52** se encuentra la proteínas acarreadora (Thioredoxina-EK) y la proteína de fusión que no fue digerida con la enzima, ver figura 22B.

Las fracciones obtenidas en los tiempos de retención **36.22** y **38.38**, fueron recromatografiadas utilizando una C₁₈ analítica. Entre las fracciones obtenidas se encontró un pico mayoritario en el tiempo de retención **33.41** (ver figura 23), se le determinó el peso molecular pero no corresponde a la masa de **4,670.2** Da. También se determinó el peso molecular del pico obtenido en el tiempo de retención **57.52** obteniéndose una masa de **17,410 Da** que corresponde a la proteína de fusión M35A, plegada y otra masa de **12,739 Da**, que corresponde a la proteína acarreadora.

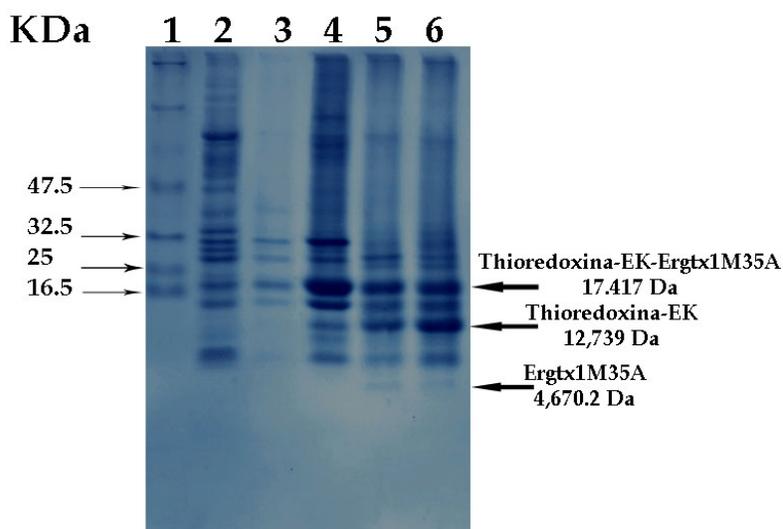


Figura 21. Gel de Tricine-SDS-PAGE de la purificación y digestión de la proteína Thio-EK-Ergtx1M35A. En el carril 1). Marcador de peso molecular; 2). Extracto periplásmico, 3 y 4). Elución de la columna de cobre; 5 y 6). Digestiones de la proteína de fusión con enterocinasa.

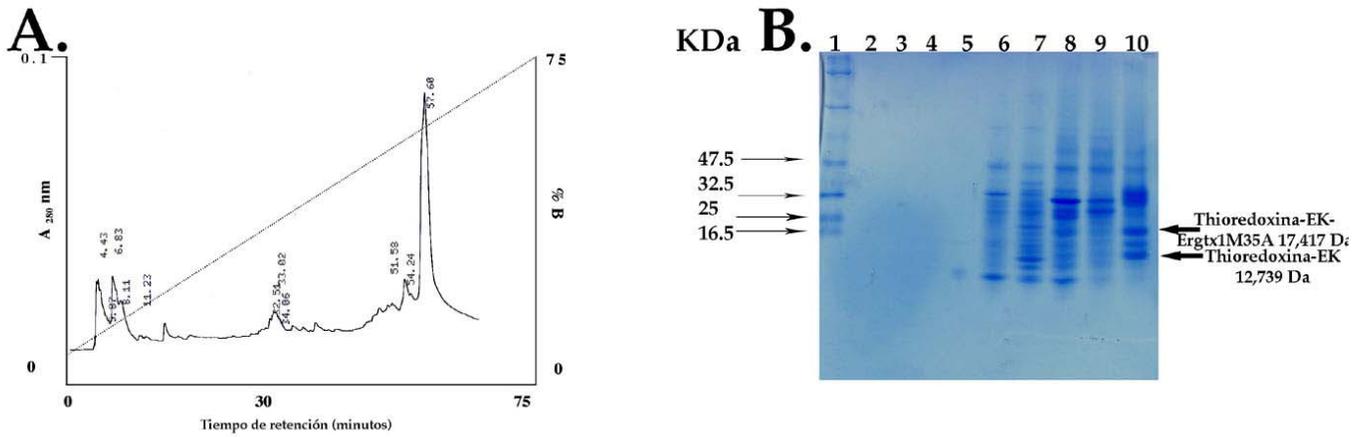


Figura 22. HPLC y Tricine-SDS-PAGE de la purificación de la rErgtx1-M35A. (A). HPLC del producto de la digestión de 169 µg de proteína Thioredoxina-EK-Ergtx1M35A. **(B)** Gel de Tricine-SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del HPLC. En el carril 1). Marcador de peso molecular; 2). 33.39; 3). 36.4; 4). 36.22, 5). 38.38; 6). 50.27; 7). 51.76; 8). 54.40; 9). 55.40; 10). 57.52.

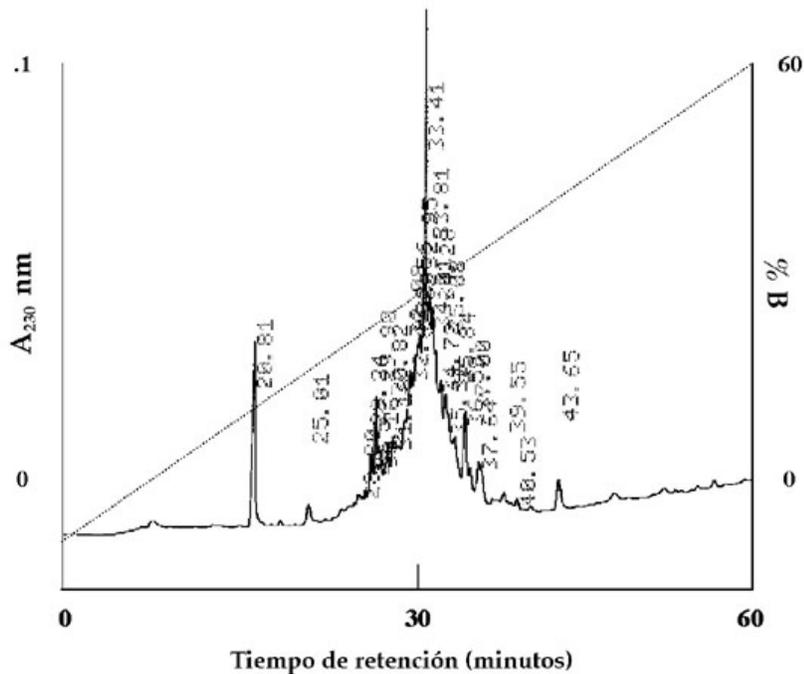


Figura 23. Recromatografía correspondiente a la fracción obtenida en el tiempo 36-38.38 En la que se muestra un pico mayoritario al minuto 33.41, pero la masa no corresponde con el peso de la recombinante Ergtx-M35A.

La limitante principal de este proyecto sigue siendo la purificación, por lo que la estrategia a seguir es el desarrollo de anticuerpos anti-thioredoxina, los cuales serán obtenidos al inmunizar dos conejos hembras de 3.2 Kg con thioredoxina, previamente purificada por filtración en gel. Una vez obtenidos los anticuerpos, estos son purificados y se prepara la columna de afinidad, con la cual esperamos obtener resultados favorables en la purificación de las recombinantes, para posteriormente realizar los ensayos de electrofisiología.

CONCLUSIONES

Se demostró que es posible la expresión en *Escherichia coli* de la toxina rErgtx1, con la misma capacidad de bloquear al canal HERG que la Ergtx nativa.

La toxina Ergtx1 fue un buen modelo para probar dos sistemas de expresión, que pueden ser usados posteriormente para producir otras toxinas en orden de miligramos por litro de cultivo, una vez que los procesos de purificación se han optimizado. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en estos sistemas de expresión no se llevan a cabo modificaciones postraduccionales que presentan algunas toxinas de alacrán, esenciales para la actividad de las mismas.

PERSPECTIVAS

- Optimización de los sistemas de expresión, para que posteriormente puedan ser empleados para la expresión de otras toxinas u otros componentes del veneno de alacrán de interés biológico.
- Realizar los ensayos electrofisiológicos de las mutantes de la toxina Ergtx1 generadas que permitan determinar su relación estructura-función con respecto al canal HERG.
- Determinar si en las variantes de la toxina se generaron modificaciones de la estructura secundaria, mediante dicroísmo circular y NMR.
- Para definir que aminoácidos del canal de potasio están involucrados en la interacción con la toxina es necesario generar mutantes complementarias (tanto de la toxina, como del canal), que permitan identificar el tipo de interacciones involucradas. Así como la posibilidad de demostrar sí estas son particulares de la toxina o bien son características de las toxinas a que afectan al mismo canal.

REFERENCIAS

- Balozet L.** (1971) Scorpionism in the old world. In *Venomous Animal and Their Venoms* (Bücherl, W. and Buckley, E. E. eds). *Academic Press, New York*, Vol III, 349-371.
- Banerjee S., Curto E. V., Ceckman m., Brown G. B., Zhong J., Krishna R.** (2005) Expression of functional scorpion neurotoxin Lqg-V in *Escherichia coli*. *Peptides* 27, 49-54.
- Bansal P., Alewood P., Torres A., Kuchel P., Vandenberg J.** (2003)
- Barona J., Batista V. V. F., Zamudio F. Z., Gómez-Lagunas F., Wanke E., Otero R., Possani L. D.** (2006) Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ and K⁺ channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus* 1764, 76-84.
- Batista C. V. F., D´Suze G., Gómez-Lagunas F., Zamudio F. Z., Encarnación S., Sevcik C., Possani L. D.** (2006) Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins, *Proteomics* 6, 3718-3727.
- Batista C. V. F., Gómez-Lagunas F., Rodríguez de la Vega R. C., Hadju P., Panyi G., Gáspár R., Possani L. D.,** (2002) Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* the book Kv 1.3 and Shaker B K^{*} channels with distinctly different affinities. *Biochem. Biophys. Acta* 1601, 123-131.
- Benkhadir K., Kharrat R., Cestele S., Mosbah A., Rochat H., Ayeb M. E. and Karoui H.** (2004) Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. *Peptides* 25, 151-161.
- Bessette P. H., Aslund F., Beckwith J., Georgiou G.** (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Biochemistry* 96, 13703-13708.
- Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., Ménez A., Toma F.** (1991) Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science* 254 (5037), 1521-1523.
- Bottiglieri C., Ferrara L., Corona M., Gurrola G. B., Batista C., Wanke E., Possani L. D.** (2000) Disulfide bridges of Ergtoxin a member of the new sub-family of peptides blockers of the ether-a-go-go related K⁺ channel. *FEBS Lett* 479, 155-157
- Bowden G. A. and Georgiou G.** (1990) Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 265, 16760-16766.
- Bücherl W.** (1971) Scorpionism in the old world. In *Venomous Animal and Their Venoms* (Bücherl, W. and Buckley, E. E. eds). *Academic Press, New York*, Vol III, 317-347.
- Calderón-Aranda E. S., Dehesa-Dávila M., Chavez-Haro A., Possani L. D.** (1996) Scorpion stings and their treatment in Mexico.
- Caliskan F, Garcia BI, Coronas FI, Batista CV, Zamudio FZ, Possani LD.** (2006) Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: Peptides and genes, *Toxicon* 48 (1), 12-22.
- Cao Z., Xiao F., Peng F., Jiang D., Mao X., Liu H., Li W., Hu D., Wang T.** (2003) Expression, purification and functional characterization of a recombinant scorpion venom peptide BmTXKβ. *Peptides* 24, 187-192.
- Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L. d. Maelicke A.** (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature (London)* 296, 90-91.

- Catterall W. A. and Beress L.** (1978) Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. *J. Biol. Chem.* 253, 7393-7396.
- Cestele S. and Catterall W. A.** (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochemistry* 82, 883-892.
- Choi J. H. and Lee S. Y.** (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 625-635.
- Cohen L., Karbat I., Gilles N., Froy O., Corzo G., Angelovici R., Gordon D., Gurevitz M.** (2004) Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative "Hot Spot" common to all scorpion β -toxins affecting Na^+ channels. *Journal of Biological Chemistry* 9, 8206-8211.
- Corona M., Gurrola G. B., Merino E., Restano-Cassulini R., Valdez-Cruz N. A., García B., Ramírez-Domínguez M. E., Cronovas F. I. V., Zamudio F. Z., Wanke E., Possani L. D.** (2002) A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K^+ channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Lett* 532, 121-126.
- Couraud F. Rochat H., Lissitzky S.** (1978) Binding of scorpion and sea anemone neurotoxins to a common site related to the action potential Na^+ ionophore in neuroblastoma cells. *Bioche, Biophys. Res. Commun* 83, 1525-1530.
- Darbon H., Blanc E., and Sabatier J. M.** (1999). Three-dimensional structure of scorpion toxins: towards a new model of interaction with potassium channels. *Perspectives Drug Disc. Design.* 15/16, 41-60.
- Debin J. A., Maggio J. E., Strichartz G. R.** (1993) Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* 264 (Cell. Physiol. 33), C361-C369.
- Debont T., Swerts A., van der Walt J. J., Müller G. J., Verdonck F., Daenens P. Tytgat J.** (1998) Comparison and characterization of the venoms of three *Parabuthus* scorpion species occurring in South Africa. *Toxicon* 36, 341-352.
- Dehesa-Dávila M. and Possani L. D.** (1994) Scorpionism and serotherapy in México. *Toxicon* 32 (9), 1015-1018
- Dehesa-Dávila M., Ramirez A. N., Zamudio F. Z., Gurrola-Briones G., Lievano A., Darszon A., Possani L. D.** (1996) Structural and functional comparison of toxins from and *Centruroides noxius*, *Comp. Biochem. Physiol. Sect B.* 113, 331-339.
- Derman A. I., Prinz W. A., Belin D., Beckwith J.** (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262, 1744-1747.
- Diego-García E., Batista C. V. F., García-Gómez B. I., Lucas S., Candido D. M., Gómez-Lagunas F., Possani L. D.** (2005) The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function, *Toxicon* 45, 273-283.
- Fet V., Sissom W. D., Lowe G., Braunwalder M. E.** (2000) Catalog of the scorpions of the world. *The New York Entomological Society*, New York, 1758-1998.
- Fontecilla-Camps J. C., Almassy R. J., Suddath F. L., Bugg C. E.** (1982) The three-dimensional structure scorpion neurotoxins. *Toxicon* 20, 1-7.
- Frénal K., Xu Ch. Q., Wolff N., Wecker K., Gurrola G. B., Zhu S. Y., Chi Ch. W., Possani L. D., Tytgat J., Delepierre M.** (2004) Exploring Structural Features of the Interaction Between the scorpion Toxin CnErg1 and ERG K^+ Channels. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* 56, 367-375.
- Froy O., Zilberberg N., Gordon D., Turkov M., Gilles N., Stankiewicz M., Pelhate M., Loret E., Oren D. A., Shaanan B., et al.** (1999) The putative bioactive surface of the insect-selective

scorpion excitatory neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 274, 5769-5776.

Fu Y., Yin L., Wang W., Chai B., Liang A. (2005) Synthesis expression and purification of a type of chlorotoxin-like peptide from the scorpion, *Buthus martensii* Karsch, and its acute toxicity analysis. *Biotechnology Letters* 27, 1597-1603.

García C., Calderon-Aranda E. S., Anguiano G.A., Becerril B., Possani L. D. (2003) Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius*. *Toxicon* 41, 417-427.

García M. L. Hanner M., Knaus H. G., Koch R., Schmalhofer W., Slaughter R. S. Kaczorowski G. J. (1997) Pharmacology of potassium channels. *Adv. Pharmacol.* 39, 425-471

Giangiacoimo K. M., Gabriel J., Fremont, V., Mullmann T. J. (1999) Probing the structure and function of potassium channels with alpha-K⁺ toxin blockers. *Perspectives Drugs Disc. Design.* 15/16, 167-186.

Gordon D., Ilan N., Zilberberg N., Gilles N., Urbach D., Cohen L., Karbat I., Froy O., Gaathon A., Kallen RG., Benveniste M., Gurevitz M. (2003) An 'Old World' scorpion beta-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels. *Eur. J. Biochem.* 270(12), 2663-70.

Gordon D. and Gurevitz M. (2003) The selectivity of scorpion α -toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. *Toxicon* 41, 125-128.

Gordon D., Moskowitz H., Eitan M., Warner C., Catterall W. A., Zlotkin E. (1992) Localization of receptor sites for insect-selective toxins of sodium channels by site-directed antibodies. *Biochemistry* 31, 7622-7628.

Gordon D., Gilles N., Bertrand D., Molgo J., Nicholson G. M., Sauviat M. P., Benoit E., Schichor I., Lotan I., Gurevitz M., Kallen R. G., Heinemann S. H. (2002) Scorpion toxins differentiating among neuronal sodium channel

subtypes: nature's guide for design of selective drugs. In: Menez A. (Ed). *Perspectives in Molecular Toxinology*, Wiley, Chichester, England, pp. 215-238.

Gordon D., Savarin P., Gurevitz M., Zinn-Justin S. (1998) Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J. Toxicol Toxin Rev* 17, 131-159.

Goudet C. , Chi C. W. Tytgat J. (2002) An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 40, 1239-1258.

Gurrola G. B., Rosati B., Rocchetti M., Pimienta G., Zaza A., Arcangeli A., Olivotto M., Possani L. D., Wanke A. (1999) A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *The FASEB Journal* 13, 953-962.

Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigwoeth F. J. (1981) *Pfluegers Arch* 391, 85-100.

Hockney R. C. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 12, 456-463.

Hoffman C. C. (1936) Distribución geografica de los alacranes peligrosos en la república Mexicana. *Bol. Inst. Hig. (Mex)* 2, 321-330.

Hoffman C. C. and Nieto D. R. (1939) Segunda contribución al conocimiento de los alacranes mexicanos. *Anal. Inst. Hig (Mex)*, 10,83-92.

Huys I., Olamendi-Portugal T., García-Gómez B. I., Vandenberghe I., Van B. J., Dyason K., Clynen E., Zhu S., van der Walt J., Possani L. D., Tytgat J. (2004) A subfamily of Acidic α -K⁺ Toxins. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (4), 2781-2789.

Jeong K. J. and Lee S. Y. (2000) Secretory production of human leptin in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 67, 398-407.

Johnson T. M., Quick M. W., Sakai T. T., Krishna N. R. (2000) Expression of functional recombinant scorpion β -neurotoxin C_{ss} II in *E. coli*. *Peptides* 21, 767-772.

- Jover E., Courand F. and Rochart H.** (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1607-1614.
- Kane J. F. and Hartley D. L.** (1998) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 6, 95-101.
- Kobayashi Y., Takashima H., Tamaoki H., Kiogoku Y., Lambert P., Kuroda H., et al.** (1991) The cysteine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers* 31, 1213-1220.
- Korolkova Y. V., Koslov S. A., Lipkin A. V., Pluzhnikov K. A., Hadley J. K., Filippov D. A. Brown K. Angelo, et al.** (2001) An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*, *J. Biol. Chem.* 276, 9868-9876.
- Legros C., Céard B., Bougis P. E., Martin-Eauclaire M. F.** (1998) Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett* 481, 375-380
- Legros C., Kaabi H., Ayeb M. E., Céard B., Vacher H., Bougis P. E., Martin-Eauclaire M. F.** (2002) Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine* 20, 934-942.
- Leipold E. Hansel A., Olivera B., Terlau S., Heinemann S. H.** (2005) Molecular interaction of delta-conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett.* 579, 3881-3884.
- Lester D. Lazarovici P., Pelhate M. Zlotkin E.** (1982) Purification, characterization and action of two insect toxins from the venom of the scorpion *Buthotus judaicus*. *Biochim Biophys Acta* 701, 370-381.
- Little M. J., Wilson H., Zappia C., Cestele S., Tyler M. I., Marti-Eauclaire, M. F., Gordon D., Nicholson G. M.** (1998) delta-Atractoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett.* 439, 246-252.
- Liu Y. F., Ma R. L., Wang S. L., duan Z. Y., Zhang J. H., Wu L. J., Wu C. F.** (2003) Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification* 27, 253-258.
- Loret E. P., Sampieri F., Roussel, A., Granier C. and Rochart H.,** (1990) Conformational flexibility of a scorpion toxin active on mammals and insects: A circular dichroism study, *Proteins* 8, 164-167.
- Lucic M. R., Forbes B. E., Grosvenor S. E., Carr J. M, Wallace J. C., Fosberg G.** (1998) Secretion in *Escherichia coli* and phage-display of recombinant insulin-like growth factor binding protein-2. *J Biotechnol* 61, 95-108.
- Mackinnon R. and Miller C.** (1989) Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245, 1382-1385.
- Makrides S. C.** (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol rev* 60, 512-538.
- Martínez F., Becerril, B., Gurrola G., Martín B. M. and Possani L. D.** (1996) Síntesis and expresión of the gene coding for noxiustoxin a K⁺ channel-blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Toxicon* 34, 1413-1419.
- Mazotti L. and Bravo-Becherelle M. A.** (1963) Scorpionism in the Mexican Republic. In: Keegan, H. L. and McFarlane, W. V. eds, *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Area*, Oxford, Pergamon Press, pp. 119-131.
- Ménez A., Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., Toma F.** (1992) Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 99B, 83-103.
- Miller C.** (1995) The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron* 15. 5-10.
- Miranda F., Kopeyan C., Rochart H., Rochat C., Lissitzky S.** (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of

eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis* Hector, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur J. Biochem.* 16, 514-523.

Mitcheson J. S., Chen J., Lin M., Culberson C., Sanguinetti M. C. (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 12329-12333.

Murby M. Uhlen M., Sthal S. (1996) Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification* 7, 129-136.

Nastainczyk W., Meves H., Watt D. D. (2002) *Toxicon* 40, 1053-1058.

Olamendi-Portugal T., Somodi S., Fernández J. A., Zamudio F. Z., Becerril B., Varga Z., Panyu G., Gáspar R., Possani L. D. (2005) Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv 1.3 over IKCa1K⁺ channels of T cells.

Oren D. A., Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., and Toma F. (1992) Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 99B, 83-103.

Pardo-López L., García-Valdés J., Gurrola G. B., Robertson G. A., Possani L. D. (2002) Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. *FEBS Letters* 510, 45-49.

Park C. S., Hausdorff S. F. and Miller C. (1991) Design, synthesis, and functional expression of a gene for charybdotoxin, a peptide blocker of K⁺ channels. *Biochemistry* 88, 2046-2050.

Peng F., Zeng X., He X., Pu J., Li W., Zhu Z. and Liu H. (2002) Molecular cloning and functional expression of a gene encoding an antiarrhythmia peptide derived from the scorpion toxin. *Eur. J. Biochem.* 269, 4468-4475.

Possani L. D. Merino E., Corona M., Bolivar F., Becerril B. (2000) Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochem.* 82, 861-868.

Possani L. D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J. (1999) Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287-300.

Pritchard M. P., Ossetian R., Li D. N., Henderson C. J., Burchell B., Wolf C. R., Friedberg T. (1997) A general strategy for the expression of recombinant human cytochrome P450s in *Escherichia coli* using bacterial signal peptides: Expression of CYP3A4, CYP2A6, and CYP2E1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 345, 342-354.

Proba K. Ge L. M., Pluckthun A. (1995) Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* 159, 203-207.

Restano-Cassulini R., Korolova Y. V., Dichot S., Gurrola G., Guasti L., Possani L. D., Lazdunski M., Grishin E. V., Arcangeli A., Wanke E. (2006) Species Diversity and peptides Toxins Blocking Selectivity of *Ether-á-go-go*-Related Gene Subfamily K⁺ Channels in the Central Nervous System. *Mol Pharmacol* 69 (5),1673-83.

Rhouma R. B. H., Cérutti-Duonor M., Benkhadir K., Goudey-Perrière F., Ayeb M. E., Lopez-Ferber M., Karoui H. (2005) Insecticidal effects of *Buthus occitanus tunetanus* BotIT6 toxin expressed in *Escherichia coli* and baculovirus/insect cells. *Journal of Insect Physiology* 51, 1376-1383.

Roden D. M., (1998) *Am. J. Cardiol* 82, 491-571.

Rodríguez de la Vega R. C. and Possani L. D. (2004) Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. *Toxicon* 43, 865-875.

Rodríguez de la Vega R. C. and Possani L. D. (2005) Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* 46, 831-844.

Rodríguez de la Vega R. C., Merino E., Becerril B., Possani L. D. (2003) Novel interacciones between K channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol Sci* 24 (5), 222-227.

- Schiavon E, Sacco T, Cassulini RR, Gurrola G, Tempia F, Possani LD, Wanke E.** (2006) Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J Biol Chem.* 281 (29), 20326-37.
- Shao F., Xiong Y. M, Zhu R. H., Ling M. H., Chi Ch. W. and Wang D. Ch.** (1999) Expression and Purification of the BmK M1 Neurotoxin from the Scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Protein Expression and Purification* 17, 358-365.
- Shein C. H.** (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/technology* 7, 1141-1149.
- Shi W., Wymore R. S., Wang H. S., Pan Z., Cohen I. S., Mckinnon D., Dixon J. E.** (1997) Identification of two nervous system-specific members of the *erg* potassium channel gene family. *J. Neurosci* 17, 9423-9432.
- Shumann W. and Ferreira L. C. S.** (2004) Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology* 27, 3,442-3453.
- Srinivasan K. N., Sivaraja V., Huys I., Sasaki T., Cheng B., Kumar T. K., Sato K., Tytgat J., Yu C., San B. C., Ranganathan C., Bowie H. J., Kini R. M., Gapalakrishnakane P.** (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Hererometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J. Biol. Chem.* 277, 30040-30047.
- Strugatsky D. Zilberberg N., Stankiewicz M., Ilan N., Turkov M., Cohen L., Pelhate M., Gilles N., Gordon D., Gurevitz M.** (2005) Genetic Polymorphism and Expression of a Highly Potent Scorpion Depressant Toxin Enable Refinement of the Effects on Insect Na⁺ Channels and Illuminate the Key Role of Asn-58. *Biochemistry* 44, 9179-9187.
- Torres A. M., Bansal P. Alewood P. F., Bursill J. A., Kuchel P. W., Vandenberg J. I.** (2003) Solution structure of CnErg1 (ergtoxin), a HERG specific scorpion toxin. *FEBS Lett* 539, 138-142.
- Turkov M., Rashi S., Noam Z., Gordon D., Ben Khalifa R., Stankiewicz M., Pelhate M., Gurevitz M.** (1997) In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 10(1), 123-31.
- Uhlen M. and Moks T.** (1990) Gene fusions for purpose of expression introduction. *Methods in Enzymology* 185, 129-143.
- Valdivia H. H., Kirby m. S., Lederer W. J. and Coronado R.** (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 12185-12819.
- Wall J. G. and Pluckthun A.** (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 507-516.
- Warmke J. W. and Ganetzky B.** (1994) A family of potassium channel genes related to eag in drosophila and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3438-3442.
- Wheeler K. P., Watt D. D. and Lazdunski M.** (1983) Classification of Na⁺ channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflügers Arch* 397, 164-165.
- Wong W. R., Ali A. B., Ma M. C.** (2003) Cloning, expression and characterization of diuret hormone Manduca diuresin from manduca sexta in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification* 29, 51-57.
- Wu J. J., He L. L., Zhou Z., Chi C. W.** (2002) Gene expression, Mutation and Structure-Function Relationship old Scorpion Toxin BmP05 Active on SK_{Ca} Channels. *Biochemistry* 41, 2844-2849.
- Zheng X. C., Lus F. Li W. L.** (2006) Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: Identification and characterization of four disulfide-bridged venom peptides. *Peptides*. Article in Press.
- Zilberberg N., Gordon D., Pelhate M., Adams M. E., Norris T. M., Zlotkin E., Gurevitz M.**

(1996) Functional expression and Genetic Alteration of an Alpha Scorpion Neurotoxin. *Biochemistry* 35; 10215-10222.

Zlotkin E. (1997) in Toxins and Signal Transduction (Lazarovici, P. and Gutman, Y., eds). *Harwood Press, Amsterdam*, 95-117.

Zlotkin E., Gurevitz M., Fowler E. and Adams M. E. (1993) Depressant insect selective

neurotoxins from scorpion venom: Chemistry, action and gene cloning. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 22, 55-73.

Zlotkin E., Miranda F and Rochart H. (1978) Chemistry and Pharmacology of Buthidae scorpion venoms in Handbook of Experimental Pharmacology. 43, 317-369. Ed. Sergio bettini, Spinger verlaf, Berlín.