



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS**

*Obtención de toxinas recombinantes ricas en puentes disulfuro para estudios de la relación estructura- función*

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**M. en C. Georgina Estrada Tapia**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete**



**CUERNAVACA, MORELOS 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

A mis padres.

A Fer.

A mis abuelos Nicolás y Aida.

A Marco, Santi, Edgar y Jade.

A Marco y Yesenia, Jorge y Ali, Sergio y Paulina, Magui y Braulio, Oscar y Ruth.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete.

El jurado de examen estuvo integrado por:

Dr. Mario Soberón Chávez.  
Dr. Enrique Rudiño Piñera  
Dr. Armando Gómez Puyou  
Dr. Gerardo A. Corzo Burguete  
Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera.

Durante el desarrollo de este trabajo recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 163392) y una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. También agradezco los fondos aportados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN226006 y por el CONACyT 49773/24968.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete por su asesoría y por su participación activa en la realización de este trabajo. Finalmente, fue una suerte coincidir en nuestra llegada al laboratorio del Dr. Possani. Muchas gracias por la amistad.

Al Dr. Lourival Possani por aceptarme en su grupo y permitirme trabajar con la expresión de toxinas.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Jorge Paniagua Solís y Dr. Lourival Possani, por sus aportaciones durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Ernesto Ortiz Suri y la Dra. Blanca Inés García por su colaboración en este proyecto.

A la Dra. Gloria Saab por su ayuda en los ensayos de discoisismo circular.

A la Dra. Lidia Riaño y al Dr. Fernando Martínez por su asesoría experimental.

Al M. en C. Timoteo Olamendi Portugal, al Biol. Cipriano Balderas, al Dr. Fernando Zamudio y al Sr. Fredy Coronas por el apoyo técnico en el laboratorio.

A la Dra. Diego por la implementación de los seminarios extraordinarios.

A los integrantes del laboratorio Possani-Becerril: Carmen, Gina Gurrola, Zam, Fredy, Ricardo, Cipriano, Ernesto, Blanca, Elia, Rita, Pável, Mary, Paty, Lidia G., Sergio, Itzel, Brenda, Martha, Cinthya, Verna, Omar, Kenya, Lidia R., Rosalba, Luis, Citlalli, Oscar, Miriam, Verónica, Rivelino, Juan, Santos y Baltazar. Gracias por la convivencia y la disposición para hacer menos difícil la rutina.

A mis amigos: María, Alina, Gaby, Angie, Alinka, Katya, Rita, Elia, Gerardo, Vanesa, Chelo, Victor, Brenda, Heber, Itzel, Martha, Enrique, Mary y Carmen. Por todo.

Gracias a ti Fernando por enseñarme a compartir en pareja.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario.
CI	Cuerpos de inclusión.
CFA	Adyuvante completo de Freund
DO	Densidad Óptica.
DC	Dicroísmo Circular.
DTT	Ditiotreitol.
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
FXa	Factor Xa
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
hNa <sub>v</sub>	Subunidad $\alpha$ de canal de sodio dependiente de voltaje de humano.
HEPES	Ácido 4-(2hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
IC <sub>50</sub> .	Concentración inhibitoria 50%
IFA	Adyuvante incompleto de Freund.
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido.
K <sub>v</sub> AP	Canal de potasio dependiente de voltaje de <i>Aeropyrum pernix</i> .
LB	Medio Luria Bertani.
MES	Ácido 2-(N-morpholino)etanosulfónico.
Na <sub>v</sub>	Canal de sodio dependiente de voltaje
nCssII.	Toxina CssII nativa.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina (Phosphate Buffered Saline)
PBST	PBS con 0.1 % de Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
rCssII	Toxina CssII recombinante.
rpHPLC	Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa.
SN	Sobrenadante.
SOC	Medio con 2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, NaCl 8.6 mM, KCl 2.5 mM, MgSO <sub>4</sub> 20 mM y Glucosa 20 mM.
TE	Solución de: 10 mM Tris, ácido etilendiamino tetra-acético 1 mM, pH 7.5.
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris.	2-amino-2- hidroximetil-1-3 propanediol.
T <sub>m</sub>	Temperatura de desnaturalización.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
ÍNDICE	1
1. ABSTRACT	3
2. RESUMEN	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. ANTECEDENTES	5
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	15
7.1 Clonación del gen que codifica para C <sub>ss</sub> II	15
7.2 Purificación de ADN plasmídico	17
7.3 Amplificación por PCR	17
7.4 Mutagénesis sitio-dirigida	18
7.5 Análisis de secuencias	18
7.6 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	18
7.7 Cepas y medios de cultivo	18
7.8 Condiciones de expresión	19
7.9 Purificación de proteínas	19
7.10 Digestión proteolítica	19
7.11 Espectrometría de masas	20
7.12 Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i>	20
7.13 Plegamiento <i>in vitro</i>	20
7.14 Dicroísmo circular	20
7.15 Protocolo de inmunización	21
7.16 ELISA	21
7.17 Preparación de sinaptosomas de cerebro de rata	21
7.18 Marcaje radiactivo de toxinas	22
7.19 Ensayos de unión	22
7.20 Electroforesis de proteínas	22
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22

	Página
8.1 Recuperación de la toxina recombinante	22
8.2 Evidencia de varios patrones de puentes disulfuro	24
8.3 Plegamiento <i>in vitro</i>	25
8.4 Rendimientos durante la purificación	26
8.5 Estructura secundaria	27
8.6 Toxicidad	28
8.7 Evaluación de HisrCssII y rCssII como inmunógenos	29
8.8 Electrofisiología y afinidad	31
8.9 Importancia funcional del ácido glutámico número 15	33
9. CONCLUSIONES	35
10. PERSPECTIVAS	36
11. REFERENCIAS	37
12. Anexo 1: Otras toxinas recombinantes	41
13. Artículos	49



## 1. ABSTRACT

CssII is a 66 amino acid toxin stabilized by four disulfide bridges. This neurotoxin affects voltage-gated sodium channels ( $\text{Na}_V$ ). The native CssII (nCssII) is the major toxic component of the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and it is pharmacologically classified as a  $\beta$  scorpion toxin (Martin *et al.*, 1987). For recombinant expression a synthetic gene of CssII was cloned into the plasmid, pQE-30 in a gene construction that contains a 6His-tag and the FXa enzymatic cleavage site. The expression vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. Five hundred milliliters LB/ampicilin cultures were carried out at several temperatures after IPTG induction. The protein was found only in inclusion bodies with no evidence of HisrCssII in the soluble fraction. The protein HisrCssII was extracted from inclusion bodies using a 0.05 M Tris buffer pH 8.0 containing 6 M Gnd-HCl. The HisrCssII was purified by affinity and hydrophobic interaction chromatography. The yield of the affinity purified fusion protein (HisrCssII) was as high as 24 mg/L of culture medium. The reverse-phase HPLC profile, and the single molecular mass of 9,392.2 Da in several proteic fractions indicated that the expressed HisrCssII had multiple disulfides arrangements. All HisrCssII structural forms were reduced using 0.05 M Tris buffer pH 8.0 containing 50 mM DTT to obtain a single proteic fraction with molecular mass of 9,400.6. The *in vitro* folding process generated a single HisrCssII form with the expected molecular mass of 9,392.2 Da. After enzymatic cleavage with FXa, the recombinant CssII (rCssII) was obtained. The molecular mass of rCssII was 7,538.6 Da as expected. Circular dichroism spectra of rCssII and nCssII were very similar, suggesting that they have the same secondary structure. Because of the natural C-terminus amidation of nCssII, the molecular weight of nCssII and rCssII differ in 1 Da. Nevertheless, both had similar  $\text{LD}_{50}$ s in mice when injected intracranially and intraperitoneally. The peptides were tested to determine their specificity on  $\text{hNa}_V$ s 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 and 1.6 expressed in the HEK 293 cellular line. All nCssII, rCssII and also de fusion protein HisrCssII, were specific for  $\text{hNa}_V$  1.6. Using the patch clamp technique in the whole cell mode to analyze their electrophysiological effects on  $\text{hNa}_V$  1.6, we observed a left shift of activation (opening to more negative potentials) and reduction in peak current, both classical effects of scorpion  $\beta$  toxins. For structure-function analysis the point mutant E15R was expressed in the same culture conditions and had a similar yield. The mutant E15R was not toxic at concentrations equivalent to  $100\text{LD}_{50}$ s of rCssII when injected intracranially to mice, and its affinity in binding assays decays only 2.5 fold compared to that of the rCssII. HisrCssII and rCssII were capable to generate polyclonal antibodies in mice that recognize specifically nCssII. In summary, we have obtained a functional four disulphide scorpion toxin using a bacterial expression system that could be used to produce rCssII and its variants to elucidate key residues in the toxin- $\text{Na}_V$  interaction. Moreover, the recombinant toxins rCssII and HisrCssII could be used as antigens for antivenom production.

## 2. RESUMEN

La toxina C<sub>ss</sub>II es un péptido neurotóxico de 66 aminoácidos de los cuales 8 son cisteínas que se encuentran formando cuatro puentes disulfuro. Afecta a canales de sodio de mamíferos y farmacológicamente se clasifica como una toxina de alacrán tipo  $\beta$ . Ha sido reportada como el componente más tóxico y abundante del veneno del alacrán mexicano *Centruroides suffusus suffusus* (Martin *et al.*, 1987). Como resultados de este proyecto de tesis se presentan la expresión de la toxina C<sub>ss</sub>II en *Escherichia coli* con rendimientos en el orden de miligramos por litro de medio de cultivo, su plegamiento *in vitro* y la caracterización funcional del péptido recombinante (rC<sub>ss</sub>II). Se demuestra por primera vez que la limitante principal en la expresión heteróloga de toxinas ricas en puentes disulfuro en sistemas bacterianos es la formación de varios patrones de puentes disulfuro. Se reporta que ambas toxinas, nativa (nC<sub>ss</sub>II) y recombinante (rC<sub>ss</sub>II) se unen a un mismo subtipo de canal de sodio, el hNa<sub>v</sub> 1.6 y que su toxicidad se encuentra en el mismo orden de magnitud. La toxina rC<sub>ss</sub>II difiere de la nativa en la amidación del extremo carboxilo terminal, por lo cual se concluye que la amidación no es indispensable para su función, sin embargo, le podría conferir mayor afinidad hacia su receptor. Como parte del análisis estructura-función, se generó la mutante de C<sub>ss</sub>II E15R que se une al mismo sitio que nC<sub>ss</sub>II, pero no ocasiona la muerte en ratones a concentraciones equivalentes a 100 LD<sub>50</sub> de nC<sub>ss</sub>II. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de generar anticuerpos que reconocen a la toxina nativa usando como inmunógenos a la toxina recombinante rC<sub>ss</sub>II y a la proteína de fusión que tiene 16 aminoácidos más en el extremo amino terminal (HisrC<sub>ss</sub>II). Por los resultados obtenidos, se propone el uso de este sistema de expresión para continuar los estudios de la relación estructura-función de la toxina C<sub>ss</sub>II con el canal Na<sub>v</sub> 1.6.

### 3. INTRODUCCION

Dentro de las especies de alacranes de México que ocasionan intoxicaciones graves en humanos se encuentra el alacrán *Centruroides suffusus suffusus*. Su hábitat se localiza al Noroeste del país y es también conocido como alacrán de Durango (Vega Franco *et al.*, 1966). Entre los componentes peptídicos del veneno de *C. suffusus suffusus* se encuentra la toxina C<sub>ss</sub>II, reportada como la más abundante del veneno, que afecta a canales de sodio de mamíferos y es la más tóxica por inyección subcutánea con una dosis letal (DL<sub>50</sub>) de 25 µg/Kg de peso en ratones (Martin *et al.*, 1987).

C<sub>ss</sub>II presenta una estructura tridimensional tipo  $\alpha/\beta$  estabilizada por cisteínas (cysteine stabilized  $\alpha/\beta$  motif o  $\alpha/\beta$  CS). En el veneno, la toxina nativa (nC<sub>ss</sub>II) se encuentra amidada en el extremo carboxilo terminal. Esta toxina, se une con afinidad nanomolar al sitio 4 de canales de sodio dependientes de voltaje (Na<sub>v</sub>), provocando la apertura del mismo a potenciales más negativos respecto al mismo en ausencia de toxina y la disminución de la corriente al pico, siendo estas dos, características electrofisiológicas de las toxinas de alacrán tipo  $\beta$  (Martin *et al.*, 1987).

En mamíferos, existen varios subtipos de Na<sub>v</sub> que han sido clonados y expresados en células animales (Goldin, 2001) lo cual permite ensayar la actividad biológica y determinar la especificidad de las toxinas, hacia un receptor en particular. Respecto a los canales de sodio dependientes de voltaje, no se ha obtenido su estructura tridimensional debido a las dificultades que representa trabajar *in vitro* con proteínas transmembranales y de gran tamaño. La subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio es una proteína de 220-260 kDa con cuatro dominios homólogos, cada uno compuesto por 6 segmentos transmembranales hidrofóbicos que participan en los mecanismo de apertura y cierre del canal y forman el poro de selectividad. A la subunidad  $\alpha$ , que constituye la unidad funcional del canal, se pueden asociar subunidades accesorias  $\beta$ , que pueden intervenir en la regulación de los mecanismo del canal. (Catterall *et al.*, 2007).

La expresión de toxinas ricas en puentes disulfuro en sistemas heterólogos procariotes ha sido limitada debido a que estos sistemas carecen de un mecanismo de plegamiento propio para este tipo de moléculas. Existe hasta la fecha un sólo reporte de toxinas de sodio tipo  $\beta$  publicado durante el desarrollo de este trabajo (Cohen *et al.*, 2005) que incluye el estudio de la relación estructura-función de la toxina C<sub>ss</sub>IV, la cual se encuentra también en la especie *C. suffusus suffusus* pero en menor cantidad.

#### 4. ANTECEDENTES

##### *Toxinas de sodio*

Los alacranes tienen aproximadamente 400 millones de años de evolución, durante los cuales han mantenido su morfología prácticamente sin alteraciones. Actualmente se conocen más de 1,500 especies distintas de alacranes (Lourenco, 1994). Parte de su éxito evolutivo se debe a que son animales que producen veneno, constituido por una mezcla compleja de componentes y les sirve para su defensa y alimentación. El veneno está formado por péptidos neurotóxicos, enzimas, lípidos, nucleótidos, entre otros, que ocasionan trastornos fisiológicos al ser inyectados a la presa o agresor (Possani *et al.*, 1999). Los alacranes que ocasionan intoxicaciones en humanos pertenecen a la familia Buthidae la cual comprende aproximadamente 500 especies. Los géneros representativos son *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus*, *Buthotus*, *Heterometrus*, *Parabuthus*, *Centruroides* y *Tityus*. El análisis exhaustivo de los componentes del veneno de alacrán, y en particular de las toxinas, se inició hace más de 30 años, proporcionando datos sobre su tamaño, estructura y especificidad filética. El creciente interés por obtener toxinas recombinantes se debe a que las toxinas provenientes de venenos animales que afectan canales iónicos dependientes de voltaje son herramientas esenciales para el estudio de la relación estructura-función de los canales, así como los importantes trastornos fisiológicos que ocasionan.

En general, las toxinas de alacrán que afectan canales de sodio son péptidos de 60 a 76 aminoácidos estabilizados por 4 puentes disulfuro. Casi todas las toxinas de alacrán conocidas presentan el motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteinas (en realidad por puentes disulfuro), aunque la conectividad entre las cisteinas y en número de aminoácidos entre ellas es variable. Este motivo estructural confiere a la proteína un arreglo empacado y resistente a varios factores como temperatura y degradación por algunas proteasas y también se extiende a péptidos con funciones diversas de organismos lejanamente relacionados en cuanto a su evolución como las defensinas de plantas (Possani, Rodríguez de la Vega. 2006). La superposición de varios modelos estructurales de toxinas que afectan canales de sodio se muestra en la figura 1.

Por sus propiedades farmacológicas, se conocen dos categorías de toxinas que afectan a canales de sodio dependientes de voltaje, las  $\alpha$  y las  $\beta$ . Las  $\alpha$ -toxinas retardan la inactivación del canal, provocando un efecto depolarizante. Por otro lado, las toxinas  $\beta$  modifican el mecanismo de activación, promoviendo la apertura del canal a potenciales más negativos comparados con los potenciales de apertura en ausencia de toxina. Las toxinas CssII y CssIV han sido usadas como toxinas modelo para identificar modificadores de los canales de sodio dependientes de voltaje que se unen al sitio 4. Son típicamente  $\beta$  y aunque comparten 89% de identidad en su secuencia de aminoácidos, la especificidad de ambas es distinta, CssII (reportado en este trabajo) afecta al subtipo de canal  $Na_v$  1.6. En cambio, la toxina CssIV afecta, además del  $Na_v$  1.2, a los subtipos  $Na_v$  1.1, y  $Na_v$  1.6 (Schiavon *et al.*, 2007).

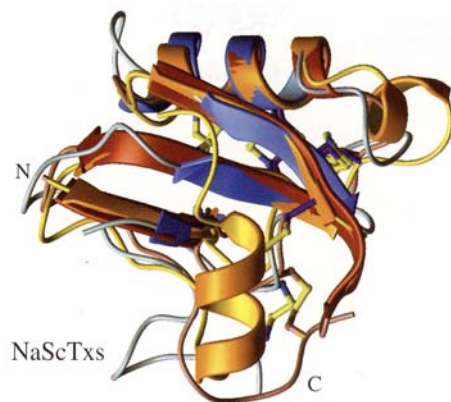


Figura 1. Motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas que presentan la mayoría de las toxinas de alacrán. En gris se observa el modelo de la toxina Cn2, en marrón el modelo de la toxina AaHII y en anaranjado el modelo de la toxina BjxtrIT. Los puentes disulfuro se observan en amarillo. N indica el extremo amino terminal y C el carboxilo terminal. NaScTxs se refiere a toxinas específicas para canales de sodio (Possani, Rodríguez de la Vega. 2006).

CssII comparte también 89% de identidad en secuencia de aminoácidos con la toxina Cn2 de *C. noxius*, así como su especificidad por el Na<sub>v</sub> 1.6. Cn2 presenta una DL<sub>50</sub> de 12.5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en inyección intraperitoneal, mientras que la de CssII es del doble. Las diferencias en la estructura primaria entre estas toxinas se observan en el alineamiento de la figura 2. La posibilidad de generar mutantes de la toxina CssII podría dar información sobre los aminoácidos determinantes de su especificidad y/o afinidad.

<b>CssII</b> (100%)	KEGYLVSKST	GCKYECLKLG	DNDYCLRECK	QQYGKSSGGY	CYAFACWCTH	LYEQAVVWPL	PNKTCN*
<b>CssIV</b> (89%)	KEGYLVNSYT	GCKFECKFLG	DNDYCLRECR	QQYGKSSGGY	CYAFGCWCTH	LYEQAVVWPL	PNKTCN*
<b>Cn2</b> (89%)	KEGYLVDKNT	GCKYECLKLG	DNDYCLRECK	QQYGKGAGGY	CYAFACWCTH	LYEQAIWVPL	PNKRCS*
<b>Ts1</b> (30%)	KEGYLMDHE	GCKLSCFIRPSG	YCGRECGIK	KGSSGY	CAWPACYCYG	LPNWWKVWDRATNK	C*

Figura 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las toxinas CssII, Cn2, CssIV y Ts1 donde se muestran los porcentajes de identidad de cada una respecto a CssII. Las cisteínas se resaltan en rojo y el asterisco indica la amidación del extremo carboxilo terminal.

La caracterización completa de venenos y los estudios de la relación estructura-función están condicionados a las pequeñas cantidades de toxina que, en general, son recuperadas del veneno y a la obtención de toxinas análogas a las nativas a partir de sistemas de expresión heteróloga. Fue hasta finales de la década de los 80s cuando se reportó la primera toxina de alacrán obtenida de manera recombinante con rendimientos de 0.2  $\mu\text{g}/10^6$  células. A pesar de los bajos rendimientos en dicho trabajo se reportó la semejanza funcional e inmunogénica de la toxina AaHII recombinante con la nativa (Bougis *et al.*, 1989), sin embargo, no se ha encontrado ningún reporte posterior a la expresión utilizando esta toxina recombinante, ni de la expresión de otras toxinas en el mismo sistema.

#### *Expresión heteróloga vs síntesis química de toxinas*

Los primeros estudios de toxinas de bajo peso molecular y su efecto sobre canales iónicos se realizaron exitosamente gracias a la facilidad de sintetizar químicamente dichos

péptidos como las llamadas “anatoxinas” y algunas variantes que permitieron identificar residuos importantes para su función. Sin embargo, existen limitaciones para la síntesis en fase sólida dentro de las cuales se encuentran: la insolubilidad de la forma reducida de los péptidos en los sistemas oxidativos de síntesis, el plegamiento inadecuado que da formas oxidadas inactivas y sobre todo, el bajo rendimiento de síntesis proporcional al tamaño de la molécula (Lecomte *et al.*, 1998).

A pesar de las dificultades que presentan los sistemas de expresión (como la obtención de péptidos inactivos o un bajo nivel de expresión) se han logrado obtener de manera heteróloga toxinas de alacranes y de arañas en *E. coli*. Las características principales de los sistemas utilizados con éxito son: la expresión de genes sintéticos bajo el control de un promotor inducible, la expresión del péptido de interés como proteína de fusión, la purificación del producto expresado por cromatografía de afinidad y el uso de cepas bacterianas modificadas, como la cepa Origami, que favorecen la formación de puentes disulfuro en el citoplasma (Bessette *et al.*, 1999). Algunos ejemplos de estas toxinas, sus características principales y el sistema de expresión utilizado se presentan en la tabla 1.

#### *Estudios de la relación estructura-función de toxinas*

Hasta la fecha los datos experimentales sobre los aminoácidos críticos involucrados en la interacción toxina-canal de sodio son muy limitados (ver tabla 2). Esta situación se ha dado, probablemente, por la dificultad de llevar a cabo estudios de la relación estructura-función con toxinas de cadena larga, que exceden de 40 aminoácidos, ya que son difíciles de producir por métodos recombinantes y por síntesis química (Lecomte *et al.*, 1998).

Como se puede observar, los trabajos realizados con toxinas de araña son aún más recientes y escasos que los de toxinas de alacrán. No en todos los casos se ha realizado el plegamiento *in vitro* de los péptidos expresados y a pesar de que en muchos trabajos se reporta semejanza funcional de las toxinas recombinantes, en la mayoría no se presentan datos de estructura que apoyen su analogía con las toxinas nativas. La obtención de múltiples fracciones protéicas, cuando las toxinas recombinantes son purificadas por HPLC, fue reportado por Swartz y MacKinnon (1995). Las fracciones plegadas incorrectamente probablemente son más la regla que la excepción y corresponden a mezclas de patrones de puentes disulfuro que pueden ser tóxicos, pero distintos a las toxinas nativas.

Por su importancia bioquímica, el estudio de las toxinas de arañas demanda la obtención de péptidos recombinantes y mutantes que permitan identificar los residuos importantes para su función.

Tabla 1.- Toxinas recombinantes de araña y de alacrán.

aa.-num. de aminoácidos; PD.-puentes disulfuro NaCh.- afecta canales de sodio; KCh.- afecta canales de potasio; MSCh.- afecta canales mecano-sensibles; ASIC afecta canales sensibles a pH; Vector.- vector de expresión; NI.-no inducible; CI.-cuerpos de inclusión; Rfld plegamiento *in vitro*.

Tipo	Proteína Mutada	Ligando	Mutaciones	Referencia	
TOXINA	CARACTERÍSTICAS	VECTOR	HUESPED	INDUCTOR/ SOLUBILIDAD	REFERENCIA
<b>ALACRÁN</b>					
NTX	39 aa, KCh, 3PD	pCSP105	BL21	IPTG/soluble	Martinez .et al. 1996
Lqh $\alpha$ IT	62 aa, NaCh, 4PD	pET-11cK	BL21	IPTG/ CI	Zilberberg, et al. 1996
LqhIT <sub>2</sub>	61 aa, NaCh, 4PD	pET-11cK	BL21	IPTG/ CI	Turkov, et al. 1997
CssII	66 aa, NaCh, 4PD	pET15b	BL21	IPTG/soluble	Johnson et al. 2000
BmKIM	61 aa, NaCh, 4PD	pGEX-5x-1	BL21	IPTG/soluble	Peng et al. 2002
BmTXK $\beta$	66 aa, KCh, 3PD	pGEX-5x-1	BL21	IPTG/soluble	Zhijian et al. 2003
Lqh $\beta$ 1	61 aa, NaCh, 4PD	pET-11c	BL21	IPTG/soluble	Gordon et al. 2003
Bj-xtrIT	76 aa, NaCh, 4PD	pET-11c	BL21	IPTG/soluble	Cohen et al. 2004
BotIII	64 aa, NaCh, 4PD	pEZZ-18	HB101	NI/soluble	Benkhadir et al. 2004
CssIV	66 aa NaCh 4PD	pET14b	BL21	IPTG/CI	Cohen et al., 2005
<b>ARAÑA</b>					
$\alpha$ -latrotoxina	1177 aa, lib.neurotrans.	pFASTBAC	Sf9/High-five	NI/Soluble	Ichchenko et al. 1998
Huwentoxina-1	33 aa, NaCh, 3PD	pGEX-KT	DH5 $\alpha$	IPTG/Rfd	Li et al. 2000
J-ACTXHv1c	37 aa, KCh, 4PD	pGEX-2T	BL21	IPTG/soluble	Maggio et al. 2002
PnTx-3-1	40 aa, KCh, 4PD	pMAL-c2	BL21	IPTG/soluble	Carneiro et al. 2003
GsMTx4	34 aa, MSCh, 3PD	pGEM/pET32a	BL21	IPTG/soluble	Ostrow et al. 2003
PcTx1	40 aa, ASIC, 3PD	pGEM	DrosophilaS2	NI	Escoubas et al. 2003
ProTx-II	30 aa, NaCh, 3PD	pMAL	BL21	IPTG/soluble	Smith et al. 2007

Tabla 2. Toxinas de venenos de animales y canales iónicos mutados para el estudio de la relación estructura-función.

Proteína-Proteína	Dendrotoxina K	Canal K <sup>+</sup>	8	Smith et al. 1997
Proteína-Proteína	$\kappa$ -conotoxina PVIIA	Canal shaker K <sup>+</sup>	15	Jacobsen et al., 2000

Proteína-Proteína	Canal shaker K+	Agitoxina	3	Gross y MacKinnon, 1996
Proteína-Proteína	Canal shaker K+	CTX	1	Goldstein <i>et al.</i> , 1992
Proteína-Proteína	Canal shaker K+	Hanatoxina	43	Swartz y MacKinnon, 1997
Proteína-Proteína	Canal Na <sub>v</sub> 1.2	CssIV	11	Cestèle, <i>et al.</i> , 1998
Proteína-Proteína	Toxina CssIV	rNaV 1.2	48	Cohen <i>et al.</i> , 2005
Proteína-Proteína	ProTX-II/ Na <sub>v</sub> 1.5	ProTX-II/ Na <sub>v</sub> 1.5	23/76	Smith <i>et al.</i> , 2007

Para estudiar la interacción de las toxinas y sus ligandos, es necesario no sólo que tengan una alta afinidad entre sí, sino obtener cantidades suficientes del péptido para realizar los estudios posteriores. La cantidad es limitante cuando se trabaja sólo con toxinas purificadas a partir de veneno. Además, es necesario generar variantes que aporten información sobre la función de cada aminoácido en dichas toxinas.

Hasta hoy, el éxito limitado obtenido en cuanto al estudio de los procesos fisiológicos en los que participan estos péptidos, se debe a la falta de un sistema de expresión heteróloga general para la obtención de péptidos estructural y funcionalmente semejantes a las toxinas nativas, en cantidades suficientes y plegados correctamente (Possani *et al.*, 1999).

#### *Estructura del canal de sodio y localización del sitio 4*

En mamíferos, los impulsos eléctricos controlan funciones como la contracción muscular, secreción de hormonas, percepción del ambiente, procesamiento de información en el cerebro y respuesta del mismo hacia los tejidos. A nivel celular, tienen una influencia importante en el metabolismo intracelular, la transducción de señales, la expresión genética, así como en la síntesis, degradación y redireccionamiento de proteínas. En todos estos casos, las señales eléctricas son controladas por proteínas miembros de la superfamilia de los canales iónicos. Dicha superfamilia está conformada por más de 140 proteínas formadoras de poros, relacionadas estructuralmente y con características de selectividad a diferentes iones (Catterall, *et al.*, 2007).

Los canales de sodio dependientes de voltaje son los responsables de la entrada rápida de iones sodio al inicio de la fase depolarizante de los potenciales de acción en el sistema nervioso, muscular y en células endócrinas. Los canales de sodio dependientes de voltaje contienen los elementos para sensar el voltaje y formar el poro de selectividad en un sólo complejo protéico formado por la subunidad  $\alpha$ , aunque cuentan con una o dos subunidades auxiliares  $\beta$  de aproximadamente 33-36 kDa. La subunidad  $\alpha$  esta conformada por 4 dominios homólogos y cada uno a su vez, por 6 segmentos transmembranales hidrofóbicos y las asas extra e intracelulares que los unen. El asa que une a los segmentos 5 y 6 forma el extremo extracelular del poro, mientras que la hélice transmembranal que conforma al segmento 6 es considerado el extremo intracelular del mismo. El poro de



selectividad completo esta formado por los 4 dominios homólogos que se unen en un arreglo seudossimétrico tridimensional. La subunidad  $\alpha$  es suficiente para percibir cambios de voltaje y modificar su estructura abriendo y cerrando el poro regulando, de tal forma, el paso de los iones a través de la membrana plasmática. Las subunidades auxiliares  $\beta$  interactúan con las diferentes subunidades  $\alpha$  y alteran sus propiedades fisiológicas y su localización subcelular, tienen un sólo dominio transmembranal y un fragmento largo en el extremo amino terminal que se orienta al lado extracelular y presenta una estructura tipo inmunoglobulina. Los extremos extracelulares de la subunidad  $\beta$  son los que interactúan con la subunidad  $\alpha$  modulando su función o incrementando su expresión en la superficie. Como otras proteínas que presentan plegamiento tipo inmunoglobulina sirven como moléculas adhesivas por su interacción con proteínas de la matriz extracelular. Las subunidades  $\beta$  son adquisiciones recientes a la familia de las proteínas asociadas a canales iónicos y sólo se han identificado en vertebrados. Por su importancia fisiológica, los canales de sodio dependientes de voltaje son blancos para un gran número de moléculas producidas en el reino animal, que se traducen en ventajas de los organismos que las producen para su alimentación y/o defensa. En los canales de sodio se han descrito al menos 6 sitios distintos de unión a modificadores de su función, todos localizados en la subunidad  $\alpha$ , como se señala en la figura 3. En la tabla 3 se señalan las moléculas que se unen a cada sitio y el efecto que ocasionan en el funcionamiento del canal. Cabe mencionar que los efectos en el funcionamiento son distintos y que la mayoría de los mecanismos de acción se desconocen. En el caso de la interacción entre las toxinas de alacrán y los canales de sodio se sabe que se unen ya sea al sitio 3 (toxinas  $\alpha$ ) o al sitio 4 (toxinas  $\beta$ ) modificando el proceso de inactivación en el caso de las primeras y el proceso de activación en el caso de las  $\beta$ .

Hasta la fecha, se han clonado y caracterizado funcionalmente 9 subunidades  $\alpha$  de canales de sodio dependientes de voltaje de humanos: del hNa<sub>v</sub> 1.1 al 1.9. Estas proteínas comparten alrededor del 70% de identidad de secuencia de aminoácidos en los segmentos transmembranales. Sus genes fueron expresados funcionalmente en células animales, lo que permitió, mediante técnicas electrofisiológicas y genéticas, el análisis sistemático de su funcionamiento de manera independiente. Esto ha facilitado el estudio de los mecanismos de interacción con sus ligandos.

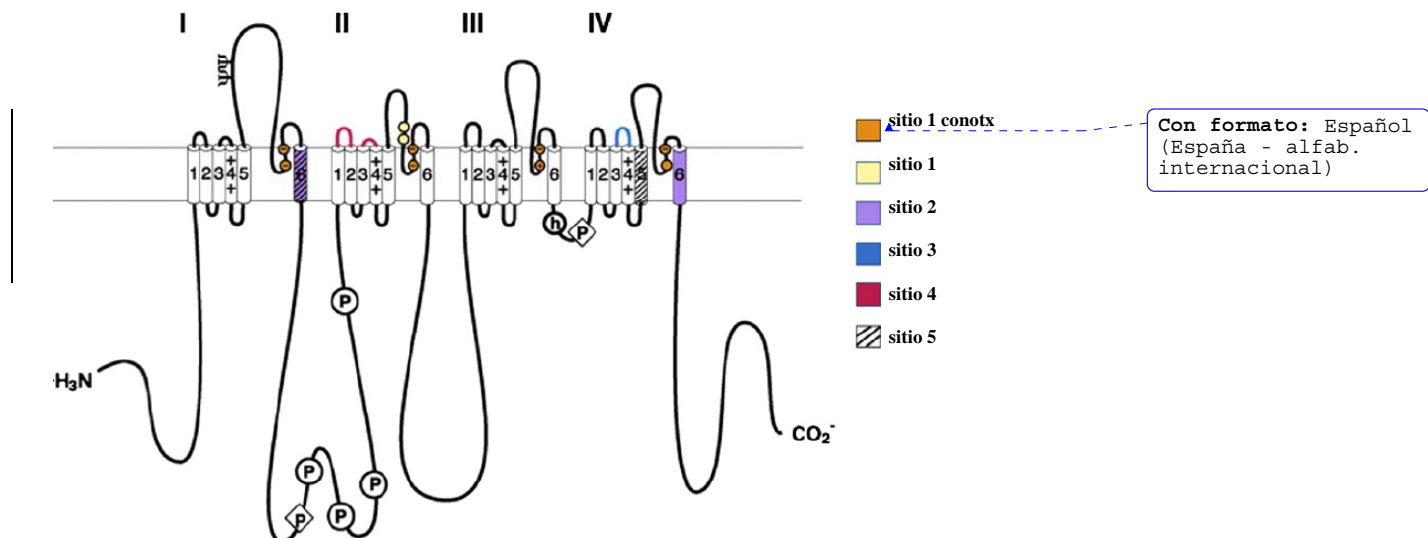


Figura 3. Esquema del canal de sodio y sus principales sitios de unión a ligandos que modifican la apertura y cierre del canal. El código de colores muestra la región que corresponde a cada sitio. Se observan los cuatro dominios homólogos (I-IV) y los 6 segmentos transmembranales (1-6) que conforman cada dominio. De los segmentos 1-5 se considera el dominio del sensor de voltaje, siendo el segmento 4 realmente el sensor y los segmentos 6 forman el dominio del poro. P corresponde a sitios de fosforilación y Ψ a sitios de glicosilación.

Tabla 3. Ligandos que afectan a canales de sodio dependientes de voltaje.

Sitio receptor	Neurotoxina	Efecto funcional
Sitio1	Tetrodoxina Saxitoxina μ-conotoxina	Bloqueo del poro
Sitio2	Batracotoxina Veratridina Grayanotoxina Aconitina	Activación persistente, activación facilitada y bloqueo de la activación
Sitio 3	Toxinas α de alacrán Toxinas de anemona marina Atracotoxinas (arañas)	Retardan la inactivación
Sitio 4	Toxinas β de alacrán y araña	Activación facilitada
Sitio 5	Brevetoxinas Ciguatoxinas	Activación facilitada Bloqueo de la inactivación
Sitio 6	δ-conotoxinas	Retardan la inactivación

*Modelo para el mecanismo de acción de toxinas β de alacrán que afectan canales de sodio.*

Como se mencionó anteriormente, las toxinas típicamente α y β se unen a sitios físicamente distintos en el canal de sodio, siendo para las α el definido como sitio 3 y para las β el sitio 4 (Gordon, 1997). El modelo más aceptado para el mecanismo de acción de las toxinas β que fue descrito por Cestèle *et al.* (1998, 2001) es conocido como el modelo de “trampa del sensor de voltaje” (“Voltage Sensor Trapping”). Los datos experimentales que

dieron origen a este modelo, fueron generados por la interacción entre mutantes puntuales del subtipo de canal de sodio  $\text{Na}_v 1.2$  y la toxina nativa C $\text{ssIV}$  midiendo su afinidad por ensayos de competencia y la actividad de C $\text{ssIV}$  con las mutantes del canal. Entre otras interacciones finas que se describen, la de mayor relevancia corresponde al ácido glutámico en la posición 15 de la toxina. En la interacción de C $\text{ssIV}$ , se describió que después de aplicar un breve prepulso depolarizante (+50 mV por 5 ms), el residuo E15 interactúa con las argininas 850 y 853 en el segmento transmembranal S4 del dominio II, manteniendo al segmento S4 en la posición que favorece al estado “activado” del canal. Como parte del mecanismo fisiológico de activación, el segmento S4 (sensor de voltaje), se mueve en respuesta al cambio de potencial de la membrana, causando modificaciones conformacionales de toda la proteína. En presencia de una toxina tipo  $\beta$  el movimiento del sensor (S4 dominio II) promueve la interacción del residuo E15 de la toxina con las 2 argininas mencionadas del S4 del dominio II, quedando facilitado el movimiento del mismo hacia el lado extracelular de la membrana. Por tal motivo, se dice que el sensor del dominio II queda “atrapado” en un estado que favorece la activación del canal. Datos de estudios de la relación estructura-función reportados para la toxina recombinante C $\text{ssIV}$  y su interacción con el canal  $\text{hNa}_v 1.2$  apoyan el modelo de trampa de sensor de voltaje (Cohen *et al.*, 2005). Por otra parte, recientemente se realizaron estudios midiendo el movimiento de las cargas durante la apertura y cierre de canales de sodio de músculo esquelético de rata (rSkM1 o  $\text{rNa}_v 1.4$ ), en presencia y ausencia de la toxina Ts1 del alacrán de Brasil *Tityus serrulatus*. En el mismo trabajo, se utilizó el marcaje con fluoróforos para seguir los movimientos de los sensores de los 4 dominios. Los resultados indican que la interacción de la toxina corresponde a 1 molécula por cada subunidad  $\alpha$ , uniéndose en el estado de reposo del canal (estado cerrado). Se detectó la permanencia del segmento S4 del dominio II en estado activado después de la apertura del canal. Además, se observó un efecto de cooperatividad de los segmentos S4 de los otros dominios (DI, DIII y DIV) que favorece también la activación del canal (Campos *et al.*, 2007). La toxina Ts1, de 61 aminoácidos, comparte sólo el 30% de identidad con C $\text{ssII}$  (ver figura 2) y funcionalmente difiere de esta en que no requiere de un prepulso depolarizante para producir el efecto de activación a potenciales más negativos, además de su amplio rango de ligandos, pues afecta a varios subtipos de canales de sodio.

Se han descrito interacciones toxina-canal gracias a un modelo de acoplamiento o “docking” estructural realizado con el programa Rosetta (Catterall, *et al.*, 2007) donde se tomaron como plantillas la estructura del canal KvAP (canal de potasio dependiente de voltaje de *Aeropyrum pernix* de los segmentos S1 al S4) y la toxina II del alacrán *Centruroides sculpturatus*. El modelo indica que la superficie de interacción de C $\text{ssIV}$  con el canal incluye al residuo E779 del canal que interactúa directamente con la L19 de la toxina y tiene una interacción de tipo carga  $\pi$  con la F44 también de la toxina, el residuo E837 forma un puente salino con la R27 de la toxina y tiene una interacción de tipo carga  $\pi$  con la Y24 (toxina). El residuo L840 tiene una interacción directa con el E28 de la toxina e indirectamente con la Y24 (toxina). Estas interacciones son las señaladas en la figura 4 apartados C y D. El modelo apoya la importancia funcional del residuo G845 (como se había descrito anteriormente) y supone un impedimento estérico con la N7 y la F14 de la toxina, cuando se cambia dicha G por N. Experimentalmente, esta mutación impide la

interacción con toxina CssiV a concentraciones hasta de  $1\mu\text{M}$  de toxina. Es importante señalar que el modelo del mecanismo *detrampa del sensor de voltaje* describe una interacción primaria de la toxina con el canal, en estado de reposo (figura 4 A y B), cuyos contactos son los indicados en el modelo estructural. Cuando hay un cambio de potencial que provoca el movimiento del sensor de voltaje, la toxina tiene interacciones adicionales que le permiten “atrapar” al sensor de voltaje favoreciendo el estado activado, esta interacción secundaria no está incluida en el modelo estructural.

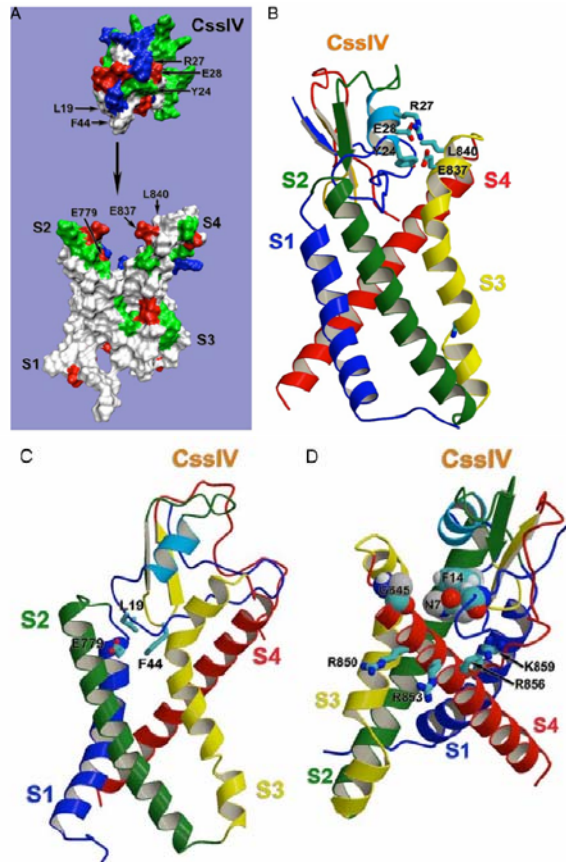


Figura 4. Modelo de “docking” para la interacción de los S1-S4 del dominio II del Nav 1.2 y CssiV. A) Vista de superficie para resaltar la complementariedad morfológica del sitio de interacción, los aminoácidos hidrofóbicos se presentan en color blanco, los ácidos en rojo, los básicos en azul y los polares sin carga en verde. B) Interacciones principales de los residuos Y24, R27 y E28 de la toxina con E837 y L840 del canal. C) Giro de  $60^\circ$  de la estructura con relación al panel B, para resaltar las interacciones de L19 y F44 con E779. D) Localización del residuo G845, N7 y F14 que suponen impedimento estérico cuando la G845 es cambiada por N. Se resaltan las cadenas laterales de los aminoácidos básicos en el sensor de voltaje. (Cestele *et al.*, 2006)

### *Toxinas recombinantes como inmunógenos*

Los primeros estudios inmunoquímicos de toxinas provenientes de venenos de alacranes de la familia *Buthidae* del Norte de África revelaron un principio general: existen grupos estructurales de toxinas capaces de generar reactividad cruzada; es decir, un anticuerpo generado contra un inmunógeno reconoce y neutraliza los efectos de toxinas que pertenecen a su grupo estructural mejor que a toxinas de otros grupos. Las toxinas de alacrán de mayor importancia médica han sido estudiadas por diversos grupos científicos entre los cuales se encuentran los de Rochat y El Ayeb en Francia y Túnez, respectivamente, que han estudiado a las especies del Norte de África como *Androctonus australis* Hector y *Buthus occitanus* (Legros *et al.*, 2001; Aubrey *et al.*, 2004). En México se encuentra el grupo de Possani que estudia a alacranes del género *Centruroides* de América del Norte centrándose en la especie *C. noxius* (Possani *et al.*, 1981; Calderon-Aranda *et al.*, 1999; Selisko *et al.*, 1999) y en Sudamérica, Chávez-Olortegui que colabora con varios grupos dedicados al estudio del género *Tityus* (Maria *et al.*, 2005; Alvarenga *et al.*, 2005). Estos grupos de investigación se han centrado en la detección, purificación, caracterización farmacológica y estructural de toxinas, así como en la clasificación de sus familias y la obtención de antisueros y anticuerpos monoclonales de buena calidad. Han sido pioneros en la caracterización y descripción estructural de determinantes antigénicas y epítopes relativos a “sitios tóxicos”. En algunos casos se han descrito las propiedades de neutralización y protección contra toxinas o veneno completo de los respectivos alacranes (Gazarian *et al.*, 2005).

En el caso de El Ayeb, con la especie *Buthus occitanus tunetanus* se produjo una toxina recombinante en la búsqueda de toxoides relacionados estructural y antigénicamente. A partir de una biblioteca de ADNc de la glándula venenosa se aislaron por hibridación genes con regiones conservadas del grupo estructural de las toxinas Bot I-Bot II. Dicho grupo excluye a la toxina Bot III que pertenece a otro grupo antigénico, pero incluye al resto de las toxinas de este alacrán y a la toxina Lqq III de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* y Lqh-alpha-IT de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. De *B. occitanus tunetanus*, la toxina Bot XIV fue clonada y expresada en *E. coli*. Esta toxina fue usada como inmunógeno en ratones. Los anticuerpos generados presentaron reactividad cruzada con todo el grupo Bot I, pero no reconocen a otros grupos. El suero inmune, obtenido por medio de Bot XIV, es capaz de neutralizar los efectos de la toxina cuando es inyectado en ratones en forma de complejo anticuerpo-toxina. Los ratones que fueron inmunizados con Bot XIV recombinante resultaron insensibles a la toxina (Benkhadir *et al.*, 2002). El péptido Bot XIV no ha sido encontrado en el veneno y es distinto estructuralmente al grupo antigénico Bot I con porcentajes de identidad entre 32 y 41%. Los epítopes responsables de la neutralización aún se desconocen.

Uno de los propósitos de obtener toxinas análogas es el de prescindir de la extracción de venenos que depende de la disponibilidad de los especímenes. De tal manera, los inmunógenos recombinantes para el desarrollo de antisueros eliminarían la necesidad de colectas, transporte y mantenimiento de los animales y se podría mejorar el rendimiento con respecto a las separaciones que se hacen del veneno.



## 5. HIPÓTESIS

Usando sistemas de expresión bacterianos, es posible obtener toxinas recombinantes ricas en puentes disulfuro con estructura y función iguales a las de las toxinas nativas, en cantidades suficientes para identificar residuos importantes para la actividad y/o afinidad de las toxinas hacia su receptor y para ser utilizadas como inmunógenos en la producción de antivenenos.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo General

Obtener por expresión heteróloga a la toxina de cuatro puentes disulfuro C<sub>ss</sub>II verificando su semejanza estructural y funcional con la toxina nativa.

### Objetivos Particulares

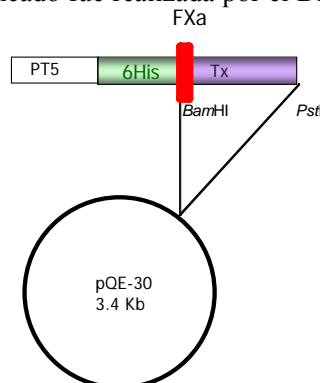
- Clonar y expresar en *E. coli* el gen que codifica para la toxina C<sub>ss</sub>II.
- Purificar la proteína recombinante.
- Realizar ensayos de actividad *in vivo*.
- Realizar su plegamiento *in vitro*.
- Verificar su estructura secundaria por dicroísmo circular.
- Verificar su semejanza funcional con la toxina nativa en ensayos de toxicidad *in vivo*.
- Determinar la afinidad de la toxina recombinante por ensayos de competencia con la toxina nativa.
- Evaluar la capacidad de las toxinas recombinantes para generar anticuerpos en ratón que reconozcan a la toxina nativa.
- Generar mutantes que permitan verificar datos de estructura y función de la toxina.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las enzimas de restricción, DNA ligasa, DNA polimerasa, fosfatasa alcalina, y marcadores de peso molecular fueron obtenidas de New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Boehringer Mannheim GmbH (Ohweiler, Germany) o Gibco-BRL (Rockville, MD, USA) y se utilizaron de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Todos los demás reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Química (Steinheim, Germany), Research Organics Inc. (Cleveland, OH, USA), Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Todas las manipulaciones de ADN, en general, se realizaron como se describe en Maniatis *et al.* (1989).

### 7.1 Clonación del gen que codifica para CssII

A partir de un banco de ADNc que se construyó aislando ARN total del telson de un alacrán de la especie *Centruroides suffusus suffusus* se obtuvo el gen que codifica para una toxina que difiere en un aminoácido respecto a CssII. El plásmido utilizado como templado para las reacciones de PCR, que contenía dicho gen, fue proporcionado por la Dra. Blanca I García. Con base en esa secuencia, se diseñaron oligonucleótidos para cambiar dos codones de bajo uso en *E. coli* así como la glicina 27 que corresponde a arginina en la secuencia aminoacídica reportada para CssII. Se amplificó por PCR el fragmento esperado de 230 pares de bases que corresponde al gen modificado e incluye la región que codifica para el sitio de reconocimiento del FXa (IEGR) antes de la toxina, así como las secuencias que reconocen las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I y dos codones de paro en el extremo 3'. La construcción del gen modificado fue realizada por el Dr. Ernesto Ortiz. La secuencia de



los oligonucleótidos diseñados para clonar dicho gen en fase en el plásmido pQE-30 se presentan en la tabla 4. La clonación se realizó primero en el sitio *Eco*RV utilizando el plásmido pBluscript KS+ (pKS+). A partir de esta construcción, se cortó con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I para subclonar direccionalmente en el plásmido pQE-30 digerido con ambas enzimas. Se identificaron por PCR las clonas con el inserto y se comprobó por secuenciación la clonación correcta. La proteína de fusión se obtuvo como se esquematiza en la figura 5.

Figura 5. Esquema de la construcción del plásmido pQE30C*css*II. El promotor PT5 es inducible por IPTG y la región marcada como 6His incluye una metionina inicial y 11 aminoácidos más, 6 de los cuales son histidinas. Después del sitio de restricción *Bam*HI se encuentra la región codificante de



los aminoácidos IEGR que reconoce la proteasa FXa seguidos del primer aminoácido de la toxina. Antes del sitio *PstI* hay dos codones de paro precedidos por el último aminoácido de la toxina.

#### Clonación de los genes de las toxinas Magi 4 y Ts1

Usando la misma estrategia se realizaron construcciones para expresar los genes de otras toxinas de interés de 4 puentes disulfuro. Para realizar la construcción del vector pQE-30-Ts $\gamma$ , se diseñaron un par de oligos que generan los mismos sitios *BamHI* y *PstI*, además del sitio de reconocimiento del FXa. Se usó como templado un plásmido (pKS+) en el cual había sido previamente clonado el gen sintético que codifica para Ts $\gamma$  con la secuencia modificada para obtener el uso de codones preferencial de *E. coli*. El producto de PCR se clonó en el pGEM (Promega) y a partir de éste se subclonó en el pQE-30. Para la construcción de pQE-30-Magi4 precedido por el sitio de corte del FXa se diseñaron un par de oligonucleótidos que generan los mismos sitios de restricción *BamHI* y *PstI*. Se amplificó por PCR a partir de ADNc el fragmento esperado de 194 pb. El fragmento amplificado por PCR se clonó primero en el vector pGEM, se digirió con las mismas enzimas de restricción para subclonarlo en el pQE-30. En ambos casos se analizaron las clonas positivas por PCR y se comprobó la clonación correcta por secuenciación. La secuencia del gen de Magi 4 no fue modificada para obtener los codones de uso preferencial en *E. coli*. Los datos obtenidos de la expresión en el mismo sistema de las toxinas Ts $\gamma$  y Magi 4 se muestran en el anexo1.

#### 7.2 Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo a partir de cultivos de 5 ml que crecieron durante toda la noche a 37°C y 250 rpm en medio LB adicionando ampicilina. Las células se colectaron por centrifugación por 1 min a 14,000 rpm y se resuspendieron en 1 ml de solución SET (sacarosa 20%, 50 mM de Tris-HCl pH 7.6 y 50 mM de EDTA) para lavar. Se centrifugaron y resuspendieron en 150  $\mu$ l de la misma solución. Posteriormente se adicionaron 10  $\mu$ l de RNasa (10 mg/ml) agitando y 350  $\mu$ l de SDS (2%)/NaOH (0.4 M) en relación volumétrica 50:50, se mezcló por inversión e incubó en un baño de hielo por 10 minutos. Se agregaron 250  $\mu$ l de 3 M de acetato de sodio pH 4.8 y se mezcló antes de incubar en hielo por 30 minutos. Se centrifugó 10 minutos y el sobrenadante (SN) se transfirió a un tubo estéril, para precipitar se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua. El ADN plasmídico de *E. coli* para secuenciación se extrajo con el Plasmid Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Tabla 4. Subrayadas se muestran las secuencias que reconocen las enzimas de restricción *BamHI* (GGATCC) y *PstI* (CTGCAG) en rojo la secuencia que codifica para los aminoácidos reconocidos por el FXa.

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Longitud (No. nucleótidos)
<b>Para modificar el gen C<sub>ss</sub>II del banco de ADNc</b>		
Forward	ATAAAGAGGGCTATCTGG	18
CDS 3'	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG	27

<b>Para generar los sitios de restricción y el sitio de corte de FXa</b>		
CssIIB	<u>GGATCC</u> ATCGAGGGAAGGAAAGAGGGCTATCTGGTAA	37
CssIIP	<u>CTGCAGT</u> TACTAGTTGCATGTTTTATTAGGAAGG	32
<b>Para generar la mutante E15R</b>		
	GGCTGCAAATACCGCTGCCTTAAATTG	27

### 7.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para obtener las amplificaciones por PCR para la síntesis de ADN y para la mutagénesis sitio-dirigida se utilizó la enzima *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Las amplificaciones necesarias para clonar en el vector pGEM fueron realizadas con la enzima *Taq* DNA polymerase y utilizadas inmediatamente para la clonación de productos de PCR. De manera general, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl con 100 µM de dNTP's, 20 pM de oligonucleótidos y 1.5 mM de Mg<sup>2+</sup>. Las reacciones se realizaron en un Termociclador Perkin Elmer 9600. Los ciclos de amplificación del ADN fueron diferentes de acuerdo con la temperatura de desnaturalización (T<sub>m</sub>) de los oligonucleótidos en cada caso y el tamaño de los fragmentos a amplificar, las condiciones estándar con la enzima *Taq* se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación del gen de C<sub>ss</sub>II.

<sup>a</sup>La temperatura de alineamiento depende de la T<sub>m</sub> de los oligos utilizados.

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura <sup>a</sup> (°C)
1	desnaturalización	30 s	94
	desnaturalización	15 s	94
30	alineamiento	40 s	55
	extensión	40 s	72
1	extensión final	5 min	72

### 7.4 Mutagénesis sitio-dirigida

Para la generación de mutantes de C<sub>ss</sub>II se utilizó la técnica de “megaprimer” en un sólo tubo de reacción, reportada por Ke y Madison (1997). Únicamente se modificó la temperatura de extensión de los últimos 25 ciclos considerando la T<sub>m</sub> del oligo C<sub>ss</sub>IIB por lo que se utilizaron 66 °C en lugar de 72 °C. El oligo mutagénico E15R y los oligos externos C<sub>ss</sub>IIP y C<sub>ss</sub>IIB se muestran en la tabla 4.

### 7.5 Análisis de secuencias

Las comparaciones de las secuencias tanto nucleotídicas como de aminoácidos con las bases de datos se realizaron utilizando las distintas versiones del programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

### 7.6 Transformación de *E. coli*.

La cepa *E. coli* DH5α fue transformada por electroporación en un aparato Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en las siguientes condiciones: 2.5 kV, 25 µF y 200 Ω. Entre 2 y 5 µl de la reacción de ligación se pusieron en contacto

con 100 µl de células electrocompetentes en una celda de 0.2 mm, después de la electroporación la celda fue puesta en hielo y se agregó 1 ml de medio SOC, las células se transfirieron a un tubo de 1.5 ml y fueron incubadas por 1 h a 37°C y 250 rpm para que se recuperaran. Posteriormente se plaquearon 100 µl en cajas de LB con 200 µg/ml de ampicilina.

Las células químico-competentes de *E. coli* BL21(DE3) se transformaron adicionando de 2 a 4 µl de ADN plasmídico concentrado a un tubo con 200 µl de células. Se incubaron en hielo por 30 min, después en un baño a 42°C sin agitación durante 2 min y por último en hielo por 10 min. Se adicionó 1 ml de LB y se incubó a 37°C con agitación por 1 h para que se recuperaran. Se plaquearon de 20 a 50 µl de cada tubo en cajas de LB adicionado con ampicilina, incubando a 30°C de 8 a 12 h.

#### 7.7 Cepas y medios de cultivo.

La cepa *E. coli* DH5- $\alpha$  fue utilizada como huésped para las clonaciones realizadas en este estudio. El genotipo de esta cepa es:  $\Delta(mcrA)183$ ,  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB*, *lacI*<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10(*tet*<sup>r</sup>)]. La cepa creció a 37°C y 250 rpm en medio LB (Ausubel *et al.*, 2001). Al medio se adicionaron 200 µg/ml de ampicilina, 1.5 % de agar fue adicionado para la preparación de placas.

La cepa *E. coli* BL21(DE3) fue utilizada como huésped para la expresión de las toxinas con las que se trabajó en este estudio.

#### 7.8 Condiciones de expresión

Se crecieron cultivos de 500 ml de LB a 37°C y 250 rpm de la cepa BL21 transformada con el plásmido de expresión. Previamente, se adicionó ampicilina al medio de cultivo para obtener una concentración final de 200 µg/ml. Después de crecer hasta una DO entre 0.4-0.6, medida a 550 nm, se indujo la expresión con IPTG a concentración final de 1 mM por un periodo de de 6 a 8 h manteniendo los cultivos de 21 a 37°C en experimentos independientes para evaluar la solubilidad de la proteína sobreexpresada. Posteriormente se centrifugó a 5,000 x g durante 20 min a 4°C en tubos para centrifuga de 250 ml. Se lavó con 200 ml de una solución de Tris 50 mM, pH 8 y se centrifugó nuevamente a 5,000 x g por 20 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 25 ml de la misma solución. Las células se rompieron utilizando una prensa de French. Se obtuvieron aprox. 20 ml de extracto concentrado. El extracto se centrifugó a 5,000 x g por 10 min desechando el sobrenadante, ya que en todas las condiciones de expresión probadas, la proteína se encontró en la fracción insoluble. El precipitado se lavó tres veces con 20 ml de Tris 20 mM, pH 8 y posteriormente se trató con 15 ml de una solución desnaturizante de Tris 50 mM, 6 M de cloruro de guanidina a pH 8 para extraer la proteína. Posteriormente se centrifugó a 2,000 x g a 4°C durante 1 hora. Este extracto se utilizó para la purificación por afinidad.

#### 7.9 Purificación de proteínas

Las proteínas de fusión expresadas se purificaron por afinidad con la resina Ni-NTA agarose (QIAGEN) en condiciones desnaturizantes y siguiendo las recomendaciones del proveedor. El protocolo seguido una vez obtenido el extracto en cloruro de guanidina 6 M

fue: Poner en contacto dicho extracto con Ni-NTA agarose equilibrada con la solución de extracción por 4 h a 4°C con agitación constante. Se centrifugó a 1,000 x g durante 1 min para recuperar la resina y realizar 3 lavados de la misma con la solución de extracción o hasta observar la desaparición de espuma (otras proteínas). Una vez lavada, se empacó la resina en una columna adecuada al volumen usado (para 1-2 ml de resina, se usó una jeringa de 3 o 5 ml) y se eluyó con Tris 50 mM, cloruro de guanidina 6 M a pH 8 adicionando 400 mM de imidazol. Se colectaron de 5 a 7 fracciones de 1 ml cada una. Posteriormente se realizó la repurificación por rpHPLC, usando como solvente A 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O y solvente B 0.1% TFA en acetonitrilo. Los péptidos obtenidos fueron separados en una columna C18 (25mm x 4.1mm) con un gradiente de 20 a 60% de solvente B en un lapso de 40 min (1%/min.). Para la repurificación de los péptidos después del plegamiento *in vitro* y la proteólisis se usaron las mismas condiciones de rpHPLC.

#### 7.10 Digestión proteolítica

Las digestiones de las proteínas de fusión se realizaron con la proteasa Factor Xa (FXa) (Roche Applied Science, Alemania) adicionando una relación de 50:1 de proteína de fusión y proteasa respectivamente. La reacción de proteólisis se llevó a cabo después del plegamiento *in vitro* con la proteína de fusión con aprox. 98 % de pureza. La concentración final de proteína de fusión para la proteólisis fue de 1mg/ml en una solución de Tris 10 mM, pH 8. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 14 h.

#### 7.11 Espectrometría de masas

Las masas moleculares de los péptidos obtenidos fueron determinadas en la unidad de proteómica del IBt por MALDI-TOF o ESI-ION-TRAP.

#### 7.12 Ensayos de toxicidad *in vivo*

Los ensayos de toxicidad se realizaron por vía intracraneal (IC) en ratones CD1 machos de 20 g en promedio previamente anestesiados en una cámara con éter etílico. Los péptidos a ensayar se disolvieron en un volumen final de 5 µl de una solución de albúmina bovina (20 mg/ml en 0.9% NaCl). Los ratones fueron inyectados con una microjeringa de 10 µl. Se colocó a la aguja un capilar de plástico, de modo que la aguja penetrara solamente 3 mm en el cráneo de los ratones. La inyección se realizó en la parte media entre el ojo izquierdo y la oreja izquierda. Todas las fracciones purificadas por HPLC (correspondientes a un máximo) fueron evaluadas para determinar su actividad tóxica. Se inyectaron por separado 10 fracciones de aproximadamente 20 µg de proteína cada una. Se observaron los efectos de cada fracción durante los 30 min post-inyección, y de manera intermitente hasta 24 horas. Se inyectó BSA (20 mg/ml en 0.9% NaCl) como control negativo y 15 ng (3DL<sub>50</sub>) de la toxina nativa como control positivo. La inyección intraperitoneal se llevó a cabo en grupos de 5 ratones CD1 machos de 20 g de peso en promedio, con 4 µg por ratón de toxina nativa como control positivo. Se observaron los efectos directamente hasta 3 horas después de la inyección e intermitentemente hasta 24 h después.

#### 7.13 Plegamiento *in vitro*

Las reacciones de plegamiento se realizaron en un volumen de 15 ml con 1 mg de proteína de fusión que se redujo con 50 mM DTT y se purificó por HPLC previamente. Las condiciones de plegamiento fueron las siguientes: Tris 0.2 M, cloruro de guanidina 2 M, pH 8 con GSH:GSSG 1 mM:0.1mM a 4°C durante 24 h. Posteriormente, la toxina plegada se purificó por rHPLC para eliminar los reactivos y sales.

#### 7.14 Dicroísmo Circular (DC)

Los ensayos de dicroísmo circular se realizaron en el equipo JASCO-J725. El espectro fue medido de 260 a 189 nm en 60% de trifluoroetanol para promover la interacción de puentes de hidrógeno. La solución amortiguadora se preparó con Tris a una concentración 0.1 M pH 7.1, y las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La longitud de la celda utilizada fue de 1 mm. Los datos se colectaron a 0.1 nm con velocidad de “scan” de 50 nm/min y una constante de tiempo de 0.5 s. La concentración y pureza de la proteína fue de 250 µg/ml y superior al 98 %, respectivamente. Las mediciones fueron hechas por triplicado.

#### 7.15 Protocolo de Inmunización

Se inmunizaron inicialmente dos grupos de 15 ratones de la cepa CD1 de 20 g en promedio. Los antígenos utilizados fueron la proteína de fusión HisrCssII plegada correctamente y la rCssII uno para cada grupo. La inyección de las toxinas acopladas a tiroglobulina se realizó por vía subcutánea. El acoplamiento se llevó a cabo con 75 µg del péptido en presencia de 1 mg de tiroglobulina disuelto en MES 0.1 M, pH 7.4 en un volumen final de 300 µl. 10 mg de carbodiimida se disolvieron en 75 µl de agua y se mezclaron con la solución de toxina y tiroglobulina. Se incubó a temperatura ambiente por 4 h con agitación ocasional. La solución anterior se llevó a 750 µl con PBS. La emulsión se preparó con la toxina disuelta en solución MES/PBS al 50% con adyuvante completo de Freund (aceite mineral y Mycobacterias muertas) en la primera inmunización, e incompleto (aceite mineral) en las siguientes inmunizaciones. La inmunización se realizó inyectando una concentración final de toxina de 5 µg en 100 µl de emulsión por ratón en cada ocasión, con un periodo de aproximadamente 10 días entre una inmunización y la siguiente. Se detalla la preparación de los inmunógenos en la tabla 8. Se comprobó la generación y el incremento de anticuerpos en suero contra la toxina CssII nativa por ensayos de ELISA. Después de la sexta inmunización con títulos alrededor de 10,000 se realizaron pruebas de neutralización de 3 LD<sub>50</sub> con grupos de 2 ratones. En este primer ensayo murieron todos los ratones incluso a tiempos más cortos que el ratón control con suero preinmune. Después de este resultado se inmunizó con los antígenos sin acoplar a tiroglobulina con la emulsión al 50% de la toxina en solución PBS y el adyuvante incompleto inyectando 5 µg del péptido por ratón en cada inmunización subsecuente.

#### 7.16 ELISA

Los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA) se realizaron en placas de polivinilo de 96 pozos (Costar, Cambridge MA. U.S.A.) acoplado 300 ng por pozo de la toxina

nativa C<sub>ss</sub>II disuelta en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0.02 M pH 9.6 incubado a 37°C por 2 h. Se realizaron 3 lavados con PBS adicionado con 0.1% de tween 20 (PBST). Los sitios de unión no específica fueron bloqueados con una solución de gelatina al 1% en PBS colocando 200 µl por pozo e incubando a 37°C durante 1 h ó a 4°C durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados con PBST. Se prepararon diluciones seriales del suero con PBS colocando 100 µl de cada dilución por duplicado e incubando a 37°C durante 1 h. Después de los correspondientes 3 lavados con PBST se adicionaron 100 µl de una dilución 1:2,000 (v/v) del anticuerpo cabra-antiratón acoplado a peroxidasa en PBS incubando a 37°C durante 1 h. Para la reacción enzimática se preparó una solución de fosfatos 0.1 M a pH 5 adicionado con 0.4 µg de orto-fenildiamina, y 0.4 µl de peróxido de hidrógeno al 30% por mililitro. Se colocaron 100 µl por pozo. Se incubó protegiendo de la luz por 10 min a 37°C y se detuvo la reacción adicionando 100 µl de HCl 6 N en cada pozo. Se midió la absorbancia a 492 nm inmediatamente, ya que la reacción de oxidación continúa.

#### 7.17 Preparación de sinaptosomas de cerebro de rata.

Los sinaptosomas fueron preparados a partir de cerebros de ratas adultas albinas de la cepa Wistar. Una vez extraído el cerebro completo se realizó el protocolo de separación manteniendo una temperatura de 0 a 4 °C. Primero, se homogenizó el cerebro con 10 volúmenes de HEPES-Tris 20 mM, sacarosa 0.32 M, pH 7.4. Posteriormente se centrifugó a 1,000 x g por 5 min recuperando el SN y centrifugándolo a 10,000 x g por 20 min. El precipitado, que contiene los sinaptosomas, se resuspendió en la misma solución y se alícuotó tubos con 50 µl para su uso o almacenamiento a temperatura de -70 °C.

#### 7.18 Marcaje radiactivo de toxinas

La toxina C<sub>ss</sub>II fue marcada radiactivamente como se reportó anteriormente (Cestèle *et al.*, 1998) usando iodo 125 (<sup>125</sup>I) por reacción con lactoperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno con 1 nmol de toxina y 1 mCi de Na<sup>125</sup>I. La toxina monoiodada se purificó por HPLC.

#### 7.19 Ensayos de unión

Los ensayos de competencia en equilibrio fueron realizados usando concentraciones crecientes de toxina no marcada radiactivamente en presencia de la toxina marcada a concentración baja constante. La composición del medio para los ensayos de unión fue: Cloruro de colina 130 mM; KCl, 5.4 mM; Glucosa, 5.5 mM; HEPES, 50 mM; y BSA 2 mg/ml, pH 6.5. Los sinaptosomas de cerebro de rata fueron resuspendidos en 0.2 ml de la solución anterior conteniendo a la <sup>125</sup>I-C<sub>ss</sub>II. Después de incubar por 1 h a temperatura ambiente la mezcla se resuspendió en 3 ml de solución de lavado fría y filtrada a vacío usando filtros GF/C (Whatman). Los filtros se lavaron rápidamente 2 veces con 3 ml de la misma solución. El pegado no específico se determinó en presencia de 70 mM de C<sub>ss</sub>II no marcada y consistió típicamente del 5 al 9% del pegado total. Cada experimento se realizó al menos tres veces (Martin *et al.*, 1987).

#### 7.20 Electroforesis de proteínas

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara Mighty small II, con geles de 1 mm de espesor. Un gel concentrador al 4 % precede al gel de separación al 12% o al 15%. Las muestras a analizar se incubaron durante 5 min a 95 °C en presencia de una solución de desnaturización que contiene Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05 % (v/v). La migración se efectuó a corriente constante entre 30 y 50 mA. Después de la migración el gel siguió el tratamiento de tinción. El gel se incubó en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) y azul de Coomassie (0.2% v/v). Posteriormente se realizaron lavados del gel en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) para quitar el exceso de colorante.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Recuperación de la toxina recombinante

El gen que codifica para la toxina C<sub>ss</sub>II fue amplificado por PCR usando como templado el plásmido proveniente de un banco de ADNc previamente purificado e indentificado (por secuenciación) que contenía el gen de una toxina que difiere de C<sub>ss</sub>II en un aminoácido. Por medio del diseño de oligonucleótidos y PCR se optimizó la secuencia eliminando dos codones de bajo uso en *E. coli* y modificando el codón del residuo G27

para obtener R27 ya que es el correspondiente a la secuencia de la base de datos para C<sub>ss</sub>II clave de acceso: P08900. El gen modificado se clonó y se cortó eficientemente a partir de la construcción en un vector de clonación (pKS-C<sub>ss</sub>II). La purificación del vector pQE-30 y el gen digeridos con las enzimas correspondientes permitió realizar la ligación usando una relación molecular 1:10 vector:inserto. Una vez verificada la clonación en fase en el vector de expresión pQE-30 y transformada la cepa BL21, se hicieron cultivos de 500 ml a partir de los cuales se obtuvo la toxina C<sub>ss</sub>II fusionada a 16 aminoácidos en el amino terminal. De los aminoácidos fusionados a la toxina, 6 son histidinas (en verde en la figura 6A) y 4 corresponden al sitio de corte para el FXa (HisrC<sub>ss</sub>II) (en rojo en la figura 6A). Los cultivos fueron realizados a 21, 30 y 37 °C, induciendo con IPTG y al alcanzar una DO de 0.5 medida a 550 nm. No se observaron diferencias en la solubilidad de la proteína a temperaturas de inducción menores a 37°C. Se cosecharon las células a las 6 h post-inducción. Se verificó la sobreexpresión de la proteína por geles SDS-PAGE con las células completas, observando una banda mayoritaria correspondiente a la proteína de fusión. El peso molecular que se observa en gel no corresponde al del marcador utilizado, debido probablemente a que el péptido recombinante interactúa con la matriz del gel de manera distinta a las proteínas del marcador (ver figura 6B). Una posibilidad es que a la proteína recombinante, que tiene 6 histidinas se pegue más SDS, consecuentemente habría una diferencia en su carga que la haría migrar más rápido. La integridad de la proteína de fusión y la ausencia de multímeros unidos por enlaces covalentes fueron verificadas por espectrometría de masas. La misma muestra de la proteína de fusión que se utilizó para realizar el gel de SDS fue a la que se le determinó la masa molecular dando como resultado 9,392.6 Da. Las múltiples bandas que se observan en el carril que corresponde a la proteína pura (P en la figura 6B) podrían deberse a una interacción hidrofóbica entre los monómeros de la misma proteína. La exposición de grupos hidrofóbicos también podría ser responsable de la insolubilidad de la proteína ya que las proteínas que no están correctamente plegadas tienden a agregarse. Por los valores de masas sabemos que no se trata de multímeros unidos por enlaces covalentes (por ejemplo: puentes disulfuro intramoleculares). Es importante señalar que al modificar las condiciones de expresión, bajando la temperatura de incubación, disminuyendo la velocidad de agitación o la densidad celular del cultivo para la inducción, no se evitó que la mayor parte de la proteína recombinante se obtuviera en forma de cuerpos de inclusión.



**A** MRGSHHHHGS**I**EGRKEGYLVSKSTGCKYECLKLGNDYCLRECKQYQYKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN

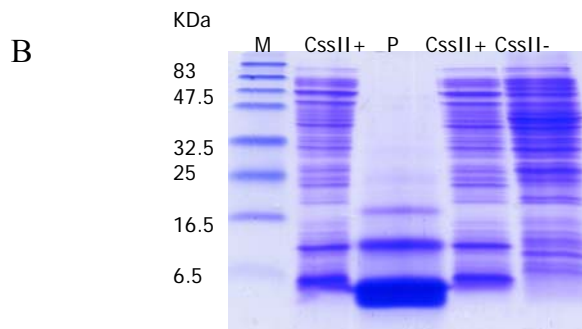


Figura 6. **A)** Estructura primaria de la proteína HisrCssII producto de la construcción realizada en el plásmido pQE-30. **B)** SDS-PAGE 15% de la expresión de HisrCssII en BL21(DE3) M.-marcador de peso molecular, CcssII+.- BL21 expresando la proteína de fusión después de la inducción con IPTG, CcssII-.- BL21 sin el plásmido de expresión pQE30-CcssII. P.- Proteína de fusión HisrCssII purificada por afinidad con Ni-NTA agarose en condiciones desnaturizantes y por HPLC.

## 8.2 Evidencia de varios patrones de puentes disulfuro

Como se mencionó anteriormente, la proteína recombinante forma cuerpos de inclusión. Para su purificación se rompieron las células y se lavó la fracción insoluble con Tris 50 mM, pH 8. Para disolver los cuerpos de inclusión se utilizó la solución desnaturizante o de extracción (Tris 50 mM con 6 M de cloruro de guanidina a pH 8). La proteína HisrCssII fue purificada a partir de dicho extracto por afinidad en condiciones desnaturizantes como se describe en materiales y métodos, posteriormente se repurificó por HPLC. A partir de la separación por HPLC se obtuvieron aproximadamente 10 fracciones proteicas correspondientes a los máximos observados en el cromatograma de HPLC, este resultado se discutirá en la siguiente sección.

Tanto la proteína expresada, como la proteína purificada por afinidad, se observan en la figura 6B. Como evidencia de varios arreglos de puentes disulfuro se observan en la repurificación por HPLC (proteína obtenida por afinidad) varias isoformas. Las múltiples fracciones que se obtienen al separar por HPLC se presentan en la figura 7. Se afirma que dichas fracciones corresponden a isoformas porque todas las fracciones del cromatograma 7A son proteínas con la misma masa molecular de 9,392.6 Da. Dicha masa corresponde al valor teórico esperado si las 8 cisteínas están formando puentes disulfuro. Además de tener el mismo valor de masa en estado oxidado, otra evidencia de que el péptido HisrCssII presenta varios patrones de puentes disulfuro, se obtiene cuando las múltiples fracciones

señaladas en el cromatograma se reducen con 50 mM de DTT. Después de reducir la proteína, se observa en la repurificación por rpHPLC, una fracción homogénea de masa molecular de 9,400.6 Da. Este valor corresponde al valor teórico para el péptido reducido. Los múltiples arreglos de puentes disulfuro pueden explicarse si se calcula el número de arreglos en el que las 8 cisteínas presentes en la toxina pueden formar 4 puentes disulfuro, considerando únicamente que cada puente disulfuro está formado por dos cisteínas. Entonces, el número de arreglos está dado por:  $N!/PD! A^{PD}$  donde  $N$  es el número de medias cistinas,  $PD$  es el número de cistinas y  $A$  es el número de cisteínas necesario para formar un puente disulfuro, es decir 2. Para cualquier proteína con 8 cisteínas y con 4 puentes disulfuro el número teórico de arreglos distintos es de 105. El número teórico de patrones de disulfuros está muy alejado del número real de múltiples formas que se obtienen (aprox. 10) ya que no contempla otras variables como la longitud del péptido, distancias moleculares, impedimiento estérico, etc.

### 8.3 Plegamiento *in vitro*

Aproximadamente 20  $\mu\text{g}$  de cada una de las fracciones separadas por HPLC que corresponden a cada uno de los picos que se muestran en la figura 7 (cromatograma A) fueron inyectados en ratones CD-1, de 20 g de peso, por vía intracraneal. Las fracciones señaladas con un asterisco (picos 6 y 7) en dicha figura fueron letales a esa concentración. Aunque otras fracciones fueron tóxicas, los ratones se recuperaron después de cierto tiempo. La toxicidad de las fracciones obtenidas a partir de la primera separación fue mucho menor a la toxicidad ya reportada de la nC<sub>ss</sub>II, de 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por vía intracraneal, indicando indirectamente que el plegamiento de esas isoformas podría ser incorrecto. Por tal motivo, después de reducir todas las fracciones de HisrC<sub>ss</sub>II, se oxidó el péptido en condiciones controladas esperando obtener el patrón de puentes disulfuro correcto. El plegamiento *in vitro* permitió recuperar principalmente una fracción homogénea por su perfil de HPLC (figura 8), oxidada, y más tóxica que las formas encontradas antes del plegamiento mostradas en la figura 7A. La masa determinada de la fracción plegada es de 9,392.6 Da. Estos datos son indicio de que el plegamiento *in vitro* en las condiciones utilizadas genera el patrón de disulfuros de la toxina nativa. La mayoría de los reportes presentados en la tabla 3 incluyen el plegamiento *in vitro* de los péptidos recombinantes, sin embargo, las condiciones de oxidación/reducción para cada péptido son distintas y en varios casos se indica que la determinación de las condiciones óptimas de plegamiento debe hacerse a prueba y error.

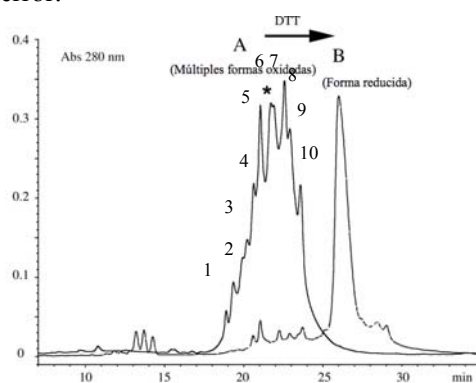


Figura 7. Superposición de perfiles de HPLC de aprox. 1 mg de HisrC<sub>ss</sub>II con múltiples formas del péptido expresado después de la purificación por afinidad (A) y 0.5 mg de la misma después de reducir con 50 mM de DTT obteniendo un solo pico (B). En A (múltiples formas oxidadas) se obtuvo un valor de masa molecular de 9,392.6 Da, el asterisco señala las fracciones que fueron letales al inyectar aprox. 20µg de cada una por vía intracraneal. B la masa obtenida para el péptido reducido fue de 9,400.6 Da.

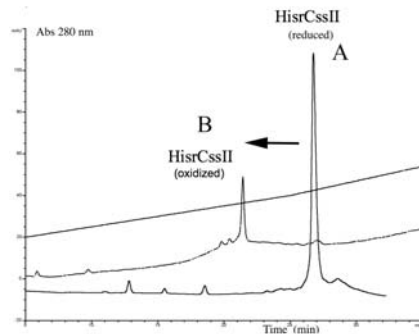


Figura 8. Perfiles de HPLC (columna C18 analítica) con 300 µg del péptido HisrC<sub>ss</sub>II reducido (A) y 100 µg del mismo posterior al plegamiento *in vitro* (B). Los péptidos fueron separados usando un gradiente de 20 a 60% de B durante 40 min, después de equilibrar durante 5 min con 20% de B.

Para evaluar el efecto de los 16 aminoácidos “extras” en el extremo amino terminal en el ensayo de plegamiento *in vitro*, se redujo la toxina nC<sub>ss</sub>II en las mismas condiciones que HisrC<sub>ss</sub>II y se realizó la oxidación *in vitro* de ambas. La nC<sub>ss</sub>II se pliega en una fracción homogénea, bajo las mismas condiciones que HisrC<sub>ss</sub>II (datos no mostrados) por lo cual concluimos que, en este caso, no hay un efecto significativo de los aminoácidos extras en el amino terminal sobre el plegamiento *in vitro*.

Los resultados obtenidos de la reducción y el plegamiento *in vitro* con toxina nativa, nC<sub>ss</sub>II, indican que las condiciones de oxidación/reducción óptimas podrían determinarse empíricamente para otras toxinas recombinantes con las toxinas nativas. Esto podría ser un experimento previo a los intentos por expresar otras toxinas ricas en puentes disulfuro en el sistema pQE-30/BL21 ya que el plegamiento correcto es el paso limitante para la obtención de péptidos con toxicidad comparable a los nativos.

#### 8.4 Rendimientos durante la purificación.

Dentro de los reportes encontrados sobre expresión de proteínas ricas en puentes disulfuro, se ha hecho énfasis en la cantidad de proteína recuperada al final del proceso de producción ya que de ello depende la posibilidad de realizar la caracterización funcional y estructural de la proteína recombinante. La tabla 6 muestra los rendimientos alcanzados en cada paso para la obtención de la toxina recombinante rC<sub>ss</sub>II. Cabe mencionar que, en el caso de la obtención de C<sub>ss</sub>IV recombinante reportada por Cohen *et al.* (2005), los ensayos comparativos entre las mutantes y la toxina análoga a la nativa, se realizaron con la proteína

de fusión (CssIV unida a un péptido con 6 histidinas). En nuestro caso, los rendimientos permiten recuperar 5.6 mg/L de HisrCssII después del plegamiento, mientras que después de la proteólisis se recupera alrededor del 50%. Aún así los rendimientos de rCssII, de 2.6 mg/L de cultivo, son de los más altos reportados. rCssII es la primera toxina recombinante sin aminoácidos extras ya sea en el extremo amino o en el carboxilo terminal obtenida y reportada hasta ahora.

Tabla 6. Rendimientos de proteína por litro de medio de cultivo. Los rendimientos representan el valor medio de  $\pm 20\%$ .

Proteína expresada	Rendimiento (mg)	Rendimiento (%)
HisrCssII (ox, múltiple)	24.6	100
HisrCssII (reducida)	16.4	66.6
HisrCssII (ox, <i>in vitro</i> )	5.6	22.7
rCssII (corte FXa)	2.6	10.5

### 8.5 Estructura Secundaria

Las proteínas utilizadas fueron obtenidas después de varios pasos de purificación alcanzando alrededor del 98% de pureza. Por los datos obtenidos de la espectrometría de masas sabemos que no hay multímeros unidos por enlaces covalentes en la muestra, aunque antes del plegamiento *in vitro* la proteína purificada por HPLC tiende a agregarse. En este paso es necesario mantenerla soluble con Tris 50mM con 2M de cloruro de guanidina. La solubilidad aumenta considerablemente después del plegamiento *in vitro*. Una vez plegada la proteína de fusión se realizaron los ensayos de dicroísmo circular. Al comparar los espectros de dicroísmo circular entre la toxina HisrCssII, rCssII y nCssII, se observa que todas muestran espectros con un mínimo a 208 y a 222 nm indicativo de estructura secundaria  $\alpha$  hélice, siendo estos mínimos característicos de la estructura  $\alpha/\beta$  estabilizada por cisteínas que presentan la mayoría de las toxinas de alacrán (Figura 9).

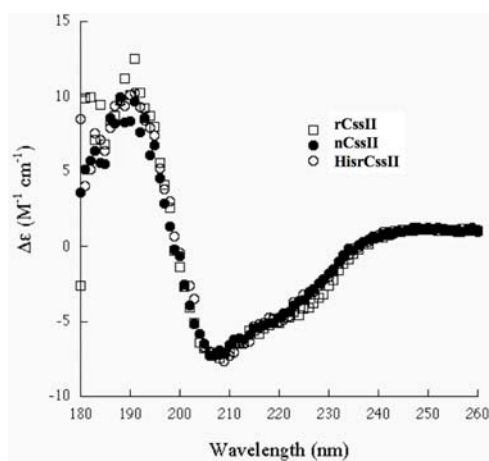


Figura 9. Espectro de CD de las proteínas plegadas HisrCssII, rCssII y nCssII. La concentración y pureza de la proteína fue de 250 µg/ml y superior al 98 %, respectivamente. Se observa un espectro típico de la estructura  $\alpha/\beta$  que presentan las toxinas de sodio de alacrán.

## 8.6 Toxicidad

Una vez plegado, el péptido HisrCssII puede solubilizarse en Tris 50 mM, pH 8 para ser cortado con el FXa. Como se mencionó, después del plegamiento la solubilidad fue considerablemente mayor, pero no se evitó completamente la agregación. La agregación se observa durante la reacción de proteólisis a temperatura ambiente y es un factor importante que afecta al rendimiento. Para la separación en HPLC de los péptidos, después de la reacción de proteólisis, fue necesario centrifugar todo el volumen de reacción, para eliminar la proteína agregada que se separó entonces en forma de una pastilla, inyectando a la columna C18 sólo el sobrenadante. El corte proteolítico produjo una fracción con el mismo tiempo de retención en la columna C18 que la nCssII y otra fracción que corresponde a la proteína de fusión (no cortada). Ambos péptidos HisrCssII y rCssII fueron letales en ratones. Las dosis letales ( $DL_{100}$ ) mínimas calculadas de los péptidos HisrCssII, rCssII y de la toxina nCssII se muestran en la tabla 7. Las concentraciones utilizadas fueron elegidas con base en la  $DL_{50}$  reportada para nCssII, que es de 5 ng por vía intracraneal y 1.2 µg por vía intraperitoneal para un ratón de 20 g. Concentraciones de múltiplos de la  $LD_{50}$  fueron inyectados para determinar la mínima  $DL_{100}$  (valor aceptado por la IUPAC). El uso de la mínima  $DL_{100}$  en nuestro caso, tiene dos ventajas: la primera es que nos permite hacer una comparación entre la toxicidad de los neuropéptidos ensayados, y segunda, es que se necesitan menos animales para determinar la  $DL_{100}$ , lo cual satisface uno de los requerimientos de la Comisión de Bioética del Instituto de Biotecnología. Como se puede observar los valores obtenidos para rCssII están en el mismo orden de magnitud que los de la toxina nativa. El incremento en la toxicidad de rCssII observado después del plegamiento *in vitro*, indica que el patrón de puentes disulfuro corresponde al de la toxina nativa. Sin embargo, la rCssII y la nCssII, aún son estructuralmente distintas ya que la nCssII está amidada en el extremo carboxilo terminal. La función de la amidación en las toxinas no ha sido estudiada sistemáticamente, pero existen reportes de toxinas recombinantes no amidadas funcionalmente comparables con las nativas (Benkhadir *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2005) así como reportes donde la amidación en el carboxilo terminal le confiere mayor afinidad a algunas toxinas (Lebrun, *et al.*, 1997; Benkhadir, *et al.*, 2004). Es evidente que para la toxina CssII, la amidación no es indispensable para su actividad, pero podría conferirle mayor afinidad hacia su receptor. El péptido HisrCssII presenta una dosis letal mayor. Esta diferencia se atribuye a los 16 aminoácidos extras en el extremo amino terminal. Por los datos obtenidos en los ensayos de competencia en sinaptosomas de rata sabemos que la proteína de fusión tiene menor afinidad y el extremo amino podría interferir estéricamente en la interacción toxina-canal.

Tabla 7. Dosis letales de HisrCssII y rCssII después del plegamiento *in vitro* y de toxina CssII nativa por vía intracraneal (IC) e intraperitoneal (IP).

Toxina	DL <sub>100</sub> Intracraneal (ng)	DL <sub>100</sub> Intraperitoneal (µg)
nCssII	15	3.6
rCssII	15	6
HisrCssII	75	15

### 8.7 Evaluación de HisrCssII y rCssII como inmunógenos

Después de verificar la estructura secundaria y la toxicidad de la proteína recombinante previamente plegada, se inició el esquema de inmunización tanto con HisrCssII como con rCssII. Se inmunizaron 2 grupos de ratones de la cepa CD1 siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos y la tabla 8. La inmunización dio como resultado la generación de anticuerpos que reconocen específicamente a la toxina nCssII que fueron titulados por ELISA como se describió en materiales y métodos (datos no mostrados). En la figura 10 se muestran los resultados de las pruebas de neutralización de los sueros de los ratones que presentaron mayor título de anticuerpos, considerando que se tituló el suero de cada ratón, para los dos grupos de 15 ratones. Se desecharon los ratones con menores títulos (datos no mostrados), quedando dos grupos de 9 ratones. Los títulos finales de la mezcla de suero de cada grupo de 9 ratones (de acuerdo al protocolo descrito en la tabla 8) fueron de 20,000 para los inmunizados con HisrCssII y de 9,000 para el grupo inmunizado con rCssII. Los ensayos de neutralización se realizaron con 3 grupos de 6 ratones cada uno. El primero fue el grupo control, en el cual cada ratón fue inyectado por vía intraperitoneal con 200 µl de suero preinmune que se incubó, previamente, durante 30 min a 37°C con 2 DL<sub>50</sub>s de la toxina nativa (nCssII), en este ensayo murieron 6 de 6 ratones. De la misma manera se trataron los otros dos grupos para probar los sueros obtenidos inmunizando con HisrCssII y con rCssII. Con el suero HisrCssII murieron 2 de 6 ratones y con rCssII 4 de 6. No se tienen argumentos que expliquen las diferencias en la respuesta individual de los ratones en la inmunización, ni para la obtención de títulos mayores de anticuerpos contra la nCssII en el suero HisrCssII. Sin embargo, esto último, podría deberse a una eliminación rápida de rCssII debido a su menor tamaño. Cuando se encuentra como proteína de fusión podría eliminarse más lentamente. Se sabe que el tiempo de vida media para la eliminación en conejos de fracciones del veneno de alacrán donde se encuentran las toxinas es de aprox. 2 h, mientras que cuando se utilizan fracciones con proteínas de mayor tamaño el tiempo se extiende hasta 5 h (Calderón-Aranda *et al.*, 1999)

Los resultados de ELISA indican que la proteína de fusión HisrCssII promueve la generación de títulos más altos de anticuerpos contra la toxina nCssII, lo cual correlaciona con la neutralización. Hay neutralización de los efectos de 2DL<sub>50</sub>s de la toxina nativa para el suero de HisrCssII ya que el valor de probabilidad (p) es de 0.012. En los ensayos con suero obtenido inmunizando con la toxina rCssII el análisis de varianza indica que no hay neutralización de 2DL<sub>50</sub> con 200 µl, aunque se deben considerar que los títulos obtenidos en cada suero son diferentes.

Tabla 8. Protocolo de inmunización utilizado para la generación de anticuerpos contra nCssII en la cepa de ratón CD1.

INMUNIZACIÓN	FECHA	NÚMERO DE RATONES	TOXINA/RATÓN (µg)	TOXINA TOTAL (µg)	H2O (µl)	MES (µl)	PBS (µl)	VOL. DE ADYUVANTE (µl)	TIPO DE ADYUVANTE	VOL. FINAL (µl)
<b>Toxinas acopladas a tiroglobulina</b>										
1	06/06/06	15	5	75	75	300	375	750	CFA	1500
2	16/06/06	15	5	75	75	300	375	750	IFA	1500
3	28/06/06 Sangría	15	5	75	75	300	375	750	IFA	1500
4	11/07/06 Sangría	15	5	75	75	300	375	750	IFA	1500
5	17/08/06 Sangría	15	5	75	75	300	375	750	IFA	1500
6	06/09/06 Sangría	15	5	75	75	300	375	750	IFA	1500
<b>Toxinas sin acoplar (libre)</b>										
7	19/09/06	9	5	45	75	0	375	450	IFA	900
8	11/10/06 Sangría	9	5	45	75	0	375	450	IFA	900
9	03/11/06	9	5	45	75	0	375	450	IFA	900
20/11/06 Sangría a blanco										

En el análisis de varianza del ensayo con el suero inmune con rCssII se obtuvo un valor de p de 0.087. Por lo tanto, los anticuerpos presentes en 200 µl de suero de ratones inmunizados con rCssII, aunque reconocen a la toxina nativa, no son capaces de neutralizar los efectos tóxicos de 2LD<sub>50</sub> de nCssII. Es importante señalar que la diferencia en los títulos entre el suero inmune generado con HisrCssII y el generado con rCssII es de 2:1. Esta relación se mantiene respecto al número de animales sobrevivientes en el ensayo de neutralización en cada caso. Respecto a los títulos de anticuerpos que se han obtenido contra otras toxinas de alacrán en nuestro laboratorio, usando otros protocolos de inmunización, los títulos de 9,000 y 20,000 se encuentran dentro del rango esperado (Dra. Georgina Gurrola, comunicación personal) ya que con un protocolo estandar ya sea usando veneno completo o toxinas purificadas los títulos que se obtienen varían entre 5,000 y 20,000. Sin embargo, para saber si la cantidad de anticuerpos presente en los sueros determina su capacidad de neutralización o si dicha capacidad está en función de las propiedades de los anticuerpos generados (afinidad o estabilidad) se tendrían que purificar los anticuerpos y normalizar la cantidad de los mismos en los ensayos de neutralización. Para probar que la menor respuesta inmune cuando se utiliza rCssII está relacionada con el menor tamaño de la proteína, se podría inmunizar con la toxina nativa y comparar los resultados entre rCssII y nCssII pues tienen el mismo tamaño. Además del control con la toxina nativa, se propone implementar protocolos distintos de inmunización considerando de gran importancia utilizar las toxinas no acopladas, pues el acoplamiento a tiroglobulina podría “esconder” epítopes importantes para la generación de anticuerpos neutralizantes.

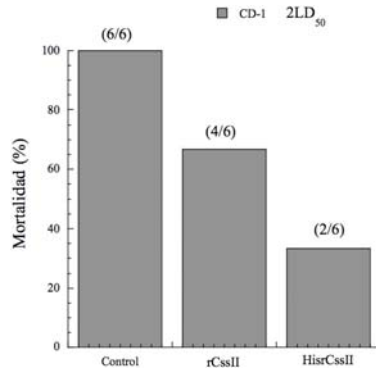


Figura 10. Las barras representan porcentaje de ratones muertos al inyectar por vía intraperitoneal  $2LD_{50}$  de toxina nativa preincubada a  $37^{\circ}C$ , durante 30 min con 200  $\mu$ l del suero correspondiente. Para el grupo control se usó suero preinmune, rCssII indica que se usó el suero inmune generado con rCssII como inmunógeno y para HisrCssII se usó la proteína de fusión plegada como inmunógeno. En cada grupo el total de ratones usados en las pruebas de neutralización en tercetos fue de 6. Entre paréntesis se indica el número de ratones muertos respecto al total para cada grupo.

### 8.8 Electrofisiología y afinidad

Dentro de la caracterización funcional de la toxina recombinante se incluye el escrutinio para determinar la especificidad hacia 6 subtipos de subunidades  $\alpha$  de canales de sodio de humanos. Por las diferencias observadas en los valores de las dosis letales determinadas, se ensayaron electrofisiológicamente por “patch clamp” la toxina nativa, nCssII, la recombinante, rCssII, y la proteína de fusión, HisrCssII, en las mismas condiciones comparando su especificidad en primer lugar y después los efectos sobre la activación del canal humano Nav 1.6 expresado en células HEK. Los canales probados fueron hNav 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6. Se encontró que, tanto la toxina nCssII como las toxinas recombinantes HisrCssII y rCssII sólo afectan la función del hNav 1.6. Los efectos que ocasionan los tres péptidos son los típicos de las toxinas de alacrán tipo  $\beta$  que son la apertura del canal a potenciales más negativos y la disminución de la corriente de sodio. Aunque el efecto fue el mismo a la misma concentración de 560 nM, la magnitud de dicho efecto con cada péptido fue distinta. Como se menciona en los antecedentes, para observar el efecto de apertura de los canales a potenciales más negativos es necesario dar un prepulso depolarizante para que el sensor se mueva e interactúe favoreciendo nuevos contactos con la toxina que permiten la ‘activación facilitada’. Cuando se pone en contacto la toxina sin dar dicho prepulso con la célula de prueba (pulse, en la figura 11) sólo se observa el efecto de disminución de la corriente, se sabe que hay una interacción primaria con los canales en el estado cerrado y el efecto de bloqueo observado podría deberse a dicha interacción. Los dos efectos electrofisiológicos típicos de las toxinas  $\beta$  son identificables en los esquemas mostrados, tanto la disminución de la corriente como la apertura a potenciales más negativos. En los recuadros se muestran las curvas de corriente de sodio en la célula control a voltajes de -50 y -10 mV, mostrando las diferencias esperadas para una célula sin toxina, y las de prueba con 560 nM de toxina con prepulso y sin prepulso. En los recuadros, cuando se da el prepulso, se observa que alrededor de -50



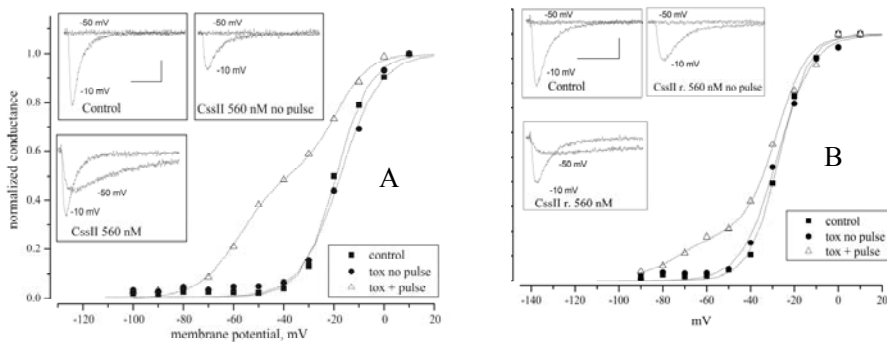


Figura 11. Efecto típico de apertura del canal a potenciales más negativos de las toxinas tipo  $\beta$  (de *Centruroides*) en el canal  $\text{Na}_V 1.6$  con A) nCsslI y B) rCsslI a una concentración de 560 nM.

mV ya hay corriente de sodio, mientras que en el control no la hay. La diferencia corresponde a la apertura de una población de canales que se da a potenciales más negativos, por efecto de la toxina. Este efecto también se observa comparando la dependencia del voltaje de las curvas de activación en la célula control sin toxina y la misma con toxina. Las curvas corriente-voltaje se obtienen normalizando la corriente para graficar el valor de la misma a diferentes potenciales y ajustando a la suma de 2 ecuaciones de Boltzmann. En presencia de toxina y prepulso los canales empiezan a abrirse a potenciales más negativos (por ejemplo alrededor de -70 mV en la figura 11) esta condición es observada tanto con las toxinas recombinantes, como con la nativa. El efecto mayor corresponde a la toxina nativa y se interpreta como un número mayor de canales capaces de abrirse en presencia de esta toxina respecto a los afectados por la toxina recombinante, ver figura 11. Esto podría deberse a la diferencia en afinidad que se determinó por ensayos de competencia en sinaptosomas de cerebro de rata y que es 15 veces menor para rCsslI respecto a la toxina nativa, los resultados de afinidad se discutirán más adelante.

La afinidad de los péptidos se determinó por ensayos de unión (o competencia) en sinaptosomas de cerebro de rata. Por medio de esta técnica se comprobó que la toxina nCsslI no desplaza completamente a la “toxina modelo” marcada con yodo radiactivo  $\text{I}^{125}$ -CsslI (datos no mostrados). Lo anterior correlaciona con el hecho recientemente reportado de que CsslI se une a varios subtipos de canales de sodio (Schiavon *et al.*, 2007) mientras que CsslII, es específica para el subtipo  $\text{Nav}1.6$ . La toxina CsslI afecta al  $\text{Nav}1.2$  al  $1.1$  y al  $1.6$ . Cuando los desplazamientos se llevaron a cabo marcando con  $\text{I}^{125}$  a la toxina nCsslI ( $\text{I}^{125}$ -CsslII) y se utilizó toxina nativa fría o sin marcar (nCsslII) como competidor, se obtuvo el valor de la afinidad de la toxina nativa. De igual manera se realizó el desplazamiento de  $\text{I}^{125}$ -CsslII con las toxinas HisrCsslII y rCsslII frías. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  determinados en este estudio son de  $0.1 \pm 0.03$  nM para la nCsslII,  $1.54 \pm 0.03$  nM para rCsslII y  $3.6 \pm 0.07$  nM para HisrCsslII. Las curvas de desplazamiento de la toxina marcada con cada péptido se pueden ver en la figura 12. La  $\text{IC}_{50}$  corresponde al punto medio de la sigmoide que da un valor de concentración en el rango nM y es una medida de la afinidad relacionada inversamente con la concentración por regresión no lineal de la ecuación de Hill. Los resultados de los ensayos de unión y la electrofisiología muestran una menor afinidad de la toxina recombinante por el mismo receptor que la nativa. La diferencia de 15 veces en la constante de afinidad de la toxina nativa respecto a la recombinante en ensayos de competencia, no se refleja en la toxicidad, pues la dosis letal de la toxina recombinante es

semejante a la de la nativa, por lo tanto, se considera a la toxina recombinante como funcionalmente análoga a la nativa. Una diferencia entre ambas toxinas es la amidación del carboxilo terminal en la nCssII. La incapacidad del sistema de expresión utilizado para realizar modificaciones postraduccionales a las proteínas hace imposible la obtención de este péptido amidado. Si con base en los datos estructurales y funcionales presentados afirmamos que el plegamiento *in vitro* promueve el patrón de disulfuros correcto en la toxina recombinante, se podría atribuir la diferencia en la afinidad sólo a la amidación del extremo carboxilo terminal. El efecto de la amidación sobre la afinidad (determinada por ensayos de unión) en una “anatoxina” fue reportado para la toxina sintética HsTx1. El péptido no amidado en el carboxilo-terminal presenta una afinidad 306 veces menor que el amidado (Lebrun *et al.*, 1997). Una alternativa para la obtención de neuropéptidos amidados es la amidación *in vitro*, utilizando a la enzima peptidil-glicin- $\alpha$ -monooxigenasa amidante recombinante (rPAM) que requiere como sustrato al péptido con una glicina extra en el carboxilo terminal (Eipper *et al.*, 1992).

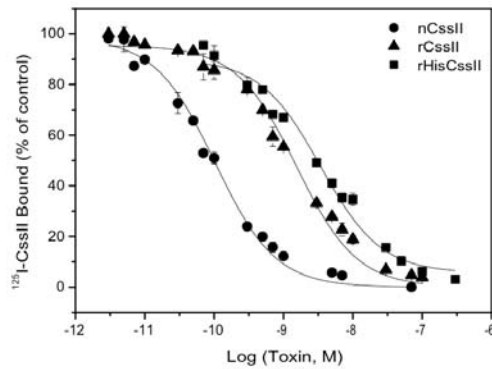


Figura 12. Desplazamiento de  $^{125}\text{I}$ -CssII por las toxinas nCssII, rCssII y la fusión HisrCssII. La cantidad de  $^{125}\text{I}$ -CssII unida se expresa como el porcentaje del pegado específico máximo. El pegado no específico se determinó en presencia de 70 nM de nCssII y se restó a todos los datos. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  determinados fueron:  $0.1 \pm 0.03$  para nCssII,  $1.54 \pm 0.03$  para rCssII y  $3.66 \pm 0.075$ .

### 8.9 Importancia funcional del ácido glutámico número 15.

Con respecto al análisis estructura-función de la toxina CcssII y los  $\text{Na}_V$ , se expresó la toxina HisrE15R. Esta mutante se eligió para verificar la importancia del ácido glutámico en la posición 15 que al ser cambiado por arginina modificaría la toxicidad de CcssII. Esto se propuso con base en los datos reportados para la toxina CcssIV (Cohen *et al.*, 2005) y el modelo de *trampa del sensor de voltaje* en el que se propone que el E15 forma un puente salino con las argininas del S4 del dominio II del canal. Para CcssIV el E15 se señala como un aminoácido indispensable para la toxicidad, ya que el mencionado cambio por arginina modifica su función y en ese caso no fue posible observar el efecto de activación a potenciales más negativos en células CHO que expresaban el canal  $\text{hNa}_V 1.2$  con hasta 10  $\mu\text{M}$  del péptido. Mientras que, con His-CcssIV, el efecto se observa con 2.5  $\mu\text{M}$ . En el reporte de Cohen (Cohen *et al.*, 2005) y colaboradores la afinidad fue determinada por ensayos de competencia en sinaptosomas de cerebro de rata observando una disminución de

3 veces respecto a His-CssIV. Para el caso de CssII las variantes HisrE15R y rE15R no fueron letales en ratones aún inyectando 1  $\mu\text{g}$  de cada péptido por vía intracraneal, esto equivale a más de 100DL<sub>50</sub> respecto a la nCssII. Por medio de ensayos de competencia en sinaptosomas de cerebro de rata se determinó que rE15R compite con la toxina nCssII. La afinidad (IC<sub>50</sub>) de la mutante rE15R fue de 3.8 nM lo cual corresponde a 2.5 veces menor afinidad que rCssII y 38 veces menor que la de la toxina nativa (figura 13). Estos resultados son semejantes a los reportados para la mutante de la toxina CssIV E15R recombinante (Cohen *et al.*, 2005). Para la mutante de rCssII E15R se comprobó, por ensayos electrofisiológicos, la ausencia del efecto de apertura del canal a potenciales más negativos, aunque conserva el efecto de bloqueo de la corriente (figura 14).

Si consideramos que este péptido que no es tóxico a altas concentraciones, que se une en el rango nanomolar al mismo receptor que la toxina nCssII y que al ser plegado en las mismas condiciones que rCssII, tiene la misma estructura excepto por el residuo indispensable para mantener activado al sensor de voltaje del canal de sodio (Cestèle *et al.*, 1998), la mutante rE15R, podría ser usada como inmunógeno no tóxico para la generación de anticuerpos neutralizantes de la toxina nativa.

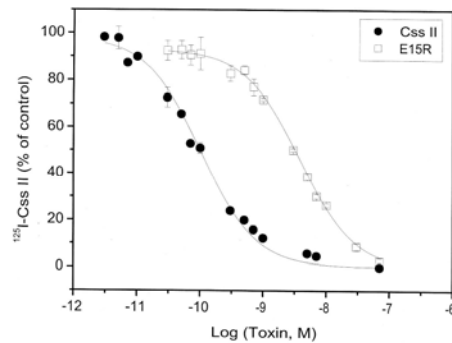


Figura 13. Desplazamiento de <sup>125</sup>I-CssII con diferentes concentraciones de la mutante rE15R fría en sinaptosomas de cerebro de rata. El valor de IC<sub>50</sub> para este péptido es de  $3.8 \pm 0.02$  nM que es 38 veces el de la toxina nativa y 3 veces el de rCssII.

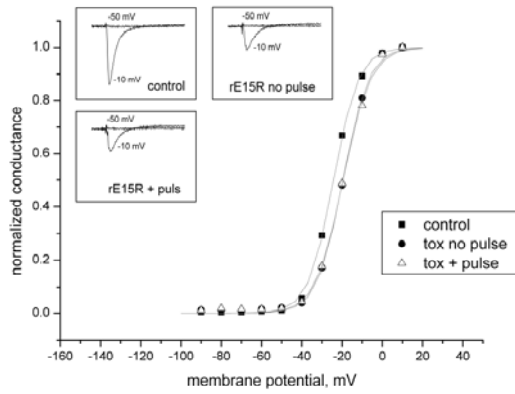


Figura 14. Curvas conductancia-potencial en células HEK que expresan el Nav1.6 en ausencia de toxina rE15R (control) y en presencia de 500 nM de la misma con y sin prepulso a + 50 mV. Se observa que aún en presencia de la toxina no hay efecto de apertura de los canales a potenciales más negativos. En los recuadros se observa la disminución de la corriente a -10 mV, sólo en presencia de la toxina.

## 9. CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvo la toxina rCssII usando el sistema de expresión bacteriano BL21(DE3)/pQE30. En este sistema se expresó a la proteína de interés fusionada a un péptido de 16 aminoácidos entre los que están incluidos 6 histidinas y la proteína se obtiene en el citoplasma. Se encontraron múltiples arreglos de puentes disulfuro de la proteína purificada por afinidad, por lo que la toxicidad evaluada en el modelo *in vivo* fue mucho menor al compararla con la toxina nativa. Por lo anterior, fue necesario reducirla y realizar su plegamiento *in vitro* obteniendo un sólo arreglo de puentes disulfuro.

Los análisis biológicos, cromatográficos y de estructura secundaria confirmaron indirectamente que las toxinas recombinantes HisrCssII y rCssII se encuentran correctamente plegadas.

El corte proteolítico de HisrCssII correctamente plegada, permitió obtener a la toxina rCssII de 66 aminoácidos. rCssII es ligeramente más tóxica respecto a HisrCssII y su afinidad es 2.4 veces mayor por lo que concluimos que los 16 aminoácidos en el amino terminal interfieren en la interacción toxina-canal, sin eliminar la toxicidad del péptido HisrCssII. La rCssII es la primera toxina recombinante que se obtiene sin aminoácidos extras después de la proteólisis.

En este trabajo, se determinó la especificidad tanto de la toxina nativa nCssII, como de rCssII hacia el subtipo de canal de sodio Nav 1.6. Esta información permitirá comparar funcionalmente a las toxinas CssII y Cn2 pues comparten su especificidad y presentan sólo 6 cambios a nivel de estructura primaria.

Es importante señalar que la amidación del extremo carboxilo terminal en la toxina nativa (nCssII) no es indispensable para su función, pero podría ser responsable de la diferencia en afinidad entre nCssII y rCssII.

Los péptidos HisrCssII y rCssII son inmunogénicos, ya que generaron anticuerpos contra la nCssII en el modelo de ratón. El estudio realizado muestra una mejor respuesta en cuanto al título de anticuerpos, si se usa como inmunógeno la proteína de fusión HisrCssII en comparación con rCssII.

El sistema de expresión BL21(DE3)/pQE30 permite la generación de variantes de la toxina CssII para el estudio de la relación estructura-función con su receptor. Tal es el caso de la mutante rE15R, la cual se obtuvo en las mismas condiciones y rendimientos que rCssII con una afinidad semejante por el mismo receptor que rCssII, pero no tóxica a concentraciones equivalentes a 100DL<sub>50</sub>. En los ensayos electrofisiológicos en el canal Nav 1.6 no se observó el efecto típico de apertura del canal a potenciales más negativos indicando que el Glu15 en CssII es funcionalmente análogo a lo reportado para CssIV y correlaciona con el modelo de “trampa del sensor de voltaje”.

El presente trabajo es el primer reporte en México de expresión en bacterias de una toxina de alacrán que afecta canales de sodio de mamíferos, de tipo  $\beta$ . El sistema de expresión utilizado permite, además, la obtención de mutantes para realizar estudios de estructura-función.

Usando el sistema BL21(DE3)/pQE30 para la expresión de otras toxinas ricas en puentes disulfuro se recomienda determinar las condiciones de plegamiento *in vitro* de la toxina nativa antes de iniciar el aislamiento o síntesis del gen correspondiente, ya que si se tienen establecidas dichas condiciones, el plegamiento dejaría de ser el paso limitante para la obtención de la toxina activa a partir de cultivos de *E. coli*.

## 10. PERSPECTIVAS

Debido a los rendimientos obtenidos, en el orden de miligramos de toxina por litro de medio de cultivo y a la identidad funcional y estructural del péptido recombinante con la toxina nativa se propone el uso de este sistema de expresión para generar otras mutantes de CssII (además de rE15R) para estudios de la relación estructura- función con el subtipo de canal de sodio Nav<sub>v</sub> 1.6.

Se propone generar la variante de rCssII con un residuo de glicina en el extremo carboxilo terminal que permita la amidación *in vitro* con la enzima rPAM. Dicha variante se requiere para determinar si la amidación es responsable de la diferencia en afinidad observada en rCssII respecto a la toxina nativa.

Se propone generar variantes mutagénicas que incrementen la carga positiva del extremo carboxilo terminal, a manera de sustitución de la amidación, evaluando su efecto sobre la afinidad hacia el Nav<sub>v</sub> 1.6.

Debido a que rE15R es un péptido análogo de la toxina nCssII obtenido de manera recombinante, con alta afinidad por el mismo receptor y significativamente menos tóxico, se propone como inmunógeno en la producción de anticuerpos neutralizantes de la toxina nCssII. Además, podría utilizarse como marcador molecular previamente modificado con moléculas fluorescentes, para identificar a los Nav<sub>v</sub>1.6 en experimentos *in vivo*.

## 11. REFERENCIAS

- Aubrey N, Myzard J, Cristophe Peter J, Rochat H, Goyffon M, Devaux C, Billiald P. 2004. Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aa1I, and functional evaluation versus other antibody fragments. *Toxicon*. 43:233-41.
- Alvarenga LM, Machado de Avila RA, Amim PR, Martins MS, Kalapothakis E, de Lima ME, Santos RG, Granier C, Chavez-Olortegui C. 2005. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 46:664-71.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1;25:3389-402. Review.
- Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiu G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23;96:13703-8
- Benkhadir K, Mejri T, Bel Haj Rhouma R, El Ayeb M, Karoui H. 2002 [In vivo and in vitro protection against lethal activity of *Buthus occitanus tunetanus* venom with a recombinant protein] *Arch Inst Pasteur Tunis*. 79:19-26
- Benkhadir K, Kharrat R, Cestele S, Mosbah A, Rochat H, El Ayeb M, 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*. 25:151-61.
- Bougis PE, Rochat H, Smith LA. 1989. Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. *J Biol Chem*. 264:19259-65.
- Calderon-Aranda ES, Rivière G, Choumet V, Possani LD, Bon C. 1999. Pharmacokinetics of the toxic fraction of *Centruroides limpidus limpidus* venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific F(ab')<sub>2</sub>. *Toxicon*. 37:771-82.
- Calderon-Aranda ES, Selisko B, York EJ, Gurrola GB, Stewart JM, Possani LD. 1999. Mapping of an epitope recognized by a neutralizing antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. *Eur J Biochem*. 264:746-55.
- Carneiro AM, Kushmerick C, Koenen J, Arndt MH, Cordeiro MN, Chavez-Olortegui C, Diniz CR, Gomez MV, Kalapothakis E, Prado MA, Prado VF. 2003. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*. 41:305-13.
- Cestèle S, Catterall WA. 2000. Molecular Mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*. 82:883-892.
- Cestele S, Qu Y, Rogers JC, Rochat H, Scheuer T, Catterall WA. 1998. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*. 21:919-931.
- 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 beta-toxins affecting Na<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem.* 279(9):8206-11.
- Cohen L, Karbat I, Gilles N, Ilan N, Benveniste M, Gordon D. 2005. Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem.* 280:5045-5053.
- Eipper BA, Green CBR, Campbell TA, Stoffers DA, Keutmann HT, Mains RE, Ouafik L. 1992. Alternative splicing and endoproteolytic processing generate tissue-specific forms of pituitary peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 267:4008-15.
- Escoubas P, Bernard C, Lambeau G, Lazdunski M, Darbon H. 2003. Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1 a proton-gated cation channels. *Protein Sci.* 12:1332-43.
- Estrada G, Garcia BI, Schiavon E, Ortiz E, Cestele S, Wanke E. 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin C<sub>ss</sub>II: Heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770:1161-1168.
- Gazarian KG, Gazarian T, Hernandez R, Possani LD. 2005. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of antivenom vaccines. *Vaccine.* 23:3357-68.
- Gazarian TG, Selisko B, Gurrola GB, Hernandez R, Possani LD, Gazarian KG. 2003. Potential of peptides selected from random phage-displayed libraries to mimic conformational epitopes: a study on scorpion toxin Cn2 and the neutralizing monoclonal antibody BCF2. *Comb Chem High Throughput Screen.* 6(2):119-32
- Goldin AL. 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.* 63:871-94
- Goldstein SA, Miller C. 1992. A point mutation in a Shaker K<sup>+</sup> channel changes its charybdotoxin binding site from low to high affinity. *Biophys J.* 62(1):5-7
- Gordon D. 1997. A new approach to insect-pest control--combination of neurotoxins interacting with voltage sensitive sodium channels to increase selectivity and specificity. *Invert Neurosci.* 3:103-16. Review
- Gordon D, Ilan 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.* 270:2663-70.
- Ichtchenko K, Khvotchev M, Kiyatkin N, Simpson L, Sugita S, Sudhof TC. 1998. Alpha-latrotoxin action probed with recombinant toxin: receptors recruit alpha-latrotoxin but do not transduce an exocytotic signal. *EMBO J.* 17:6188-99.
- Jacobsen RB, Koch ED, Lange-Malecki B, Stocker M, Verhey J, Van Wagoner RM, Vyazovkina A, Olivera BM, Terlau H. 2000. Single amino acid substitutions in k-conotoxin PVIIA disrupt interaction with the shaker K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem* 275: 24639 - 24644.
- Johnson TM, Quick MW, Sakai TT, Krishna NR. 2000. Expression of functional recombinant scorpion beta-neurotoxin C<sub>ss</sub> II in *E. coli*. *Peptides.* 21:767-72.
- Karbat I, Cohen L, Gilles N, Gordon D, Gurevitz M. 2004. Conversion of a scorpion toxin agonist into an antagonist highlights an acidic residue involved in voltage sensor trapping during activation of neuronal Na<sup>+</sup> channels. *FASEB J.* 2004 Apr;18:683-9.
- Ke SH, L. ME. 1997. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucl. Ac. Res.* 25:3371-3372.



- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y. 1997. A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J*. 328:321-327.
- Lecomte C, Sabatier JM, Van Rietschoten J, Rochat H. 1998. Synthetic peptides as tools to investigate the structure and pharmacology of potassium channel-acting short-chain scorpion toxins. *Biochimie*. 80:151-4. Review.
- Li M, Li LY, Wu X, Liang SP. 2000. Cloning and functional expression of a synthetic gene encoding huwentoxin-I, a neurotoxin from the Chinese bird spider (*Selenocosmia huwena*). *Toxicon*. 38:153-62.
- Lourenco WR. 1994. Diversity and endemism in Tropical versus Temperate scorpion communities. *Biogeographica* 70:155-60.
- Maggio F, King GF. 2002. Scanning mutagenesis of a Janus-faced atracotoxin reveals a bipartite surface patch that is essential for neurotoxic function. *J Biol. Chem.*; 277:22806-13.
- Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF, *Molecular Cloning*, in Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989,
- Maria WS, Velarde DT, Alvarenga LM, Nguyen C, Villard S, Granier C, Chavez-Olortegui C. 2005. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon*. 46:210-7
- Martin MF, Garcia y Perez LG, el Ayeb M, Kopeyan C, Bechis G, Jover E. 1987. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *J. Biol. Chem*. 262:4452-4459.
- Martinez F., Becerril B., Gurrola GB., Martin BM., Possani LD. 1996. Synthesis and expression of the gene coding for noxiustoxin, a K<sup>+</sup> channel-blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Toxicon*. 34:1413-9.
- Ostrow KL, Mammoser A, Suchyna T, Sachs F, Oswald R, Kubo S, Chino N, Gottlieb PA. 2003. cDNA sequence and in vitro folding of GsMTx4, a specific peptide inhibitor of mechanosensitive channels. *Toxicon*. 42:263-74.
- Peng F, Zeng XC, He XH, Pu J, Li WX., Zhu ZH, Liu H. 2002. Molecular cloning and functional expression of a gene encoding an antiarrhythmia peptide derived from the scorpion toxin. *Eur J Biochem*. 269:4468-75.
- Possani LD, Becerril B, Delapierre M, Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur. J. Biochem*. 264:287-300.
- Possani LD, Fernandez de Castro J, Julia JZ. 1981. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius* Hofmann) venom. *Toxicon*. 19:323-9.
- Possani LD and Rodriguez de la Vega RC. 2006. Scorpion Venom Peptides. *Handbook of Biologically Active Peptides*. 339-56.
- Possani LD, Selisko B, Gurrola GB. 1999. Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup> channels. *Perspectives in Drug Discovery and Design*. 15:15-40.
- Schiavon E, Sacco T, Cassulini R, Gurrola G, Tempia F, Possani LD. 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.* 281:20326-20337.
- Selisko B, Licea AF, Becerril B, Zamudio F, Possani LD, Horjales E. 1999. Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hofmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins: Struct Funct Genet.* 37:130-43.
- Smith JJ, Cummins TR, Alphy S, Blumenthal KM. 2007. Molecular interactions of the gating modifier toxin ProTx-II with NaV 1.5: implied existence of a novel toxin binding site coupled to activation. *J Biol Chem.* 282:12687-97.
- Smith LA, Reid PF, Wang FC, Parcej DJ, Schmidt JJ, Olson MA and Dolly J. 1997. Site-directed mutagenesis of dendrotoxin K reveals amino acids critical for its interaction with neuronal K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 36: 7690 - 7696.
- Swartz KJ and Mackinnon R. 1995. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron.* 15:941-9.
- Swartz KJ and Mackinnon R. 1997. Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Neuron.* 18:675-82.
- 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 Expr Purif.*; 10:123-31.
- Vega Franco L., Lia Jaime M. 1966. Epidemiologic considerations on scorpion stings in Durango city. *Rev. Invest. Salud Publica* 26 .7-21
- Zhijian C, Yingliang W, Jiqun S, Wanhong L, Fan X, Xin M, Hui L, Dahe J, Wenxin L. 2003. Evidence for the existence of a common ancestor of scorpion toxins affecting ion channels. *J Biochem. Mol. Toxicol.* 17:235-8.
- Zilberberg N, Gordon D, Pelhate M, Adams ME, Norris TM, Zlotkin E, Gurevitz M. 1996. Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin. *Biochemistry.*; 35:10215-22.

## Anexo 1

### Expresión heteróloga de Magi 4 y Ts1: toxinas de cuatro puentes disulfuro.

El presente trabajo se inició con el interés de expresar en bacterias toxinas de alacrán o de araña que afectan canales de sodio de mamíferos para su uso en estudios de estructura-función y como inmunógenos en la producción de antivenenos. A diferencia de la toxinas de alacrán las toxinas de araña que afectan a canales de sodio de mamíferos son péptidos más pequeños que contienen de 29 a 43 aminoácidos y presentan de 3 a 5 puentes disulfuro. Debido a la experiencia de nuestro grupo en la caracterización de los péptidos del veneno de la araña *Macrothele gigas* y en particular por las características funcionales de la toxina Magi 4 se decidió comenzar con la expresión en bacterias de esta toxina.

Las arañas Australianas llamadas “funnel web” (Mygalomorphae: Hexathelidae: Atracinae) son un grupo diverso clasificado en 2 géneros, *Atrax* y *Hadronyche*, todas las arañas de esta subfamilia poseen péptidos potenciamente tóxicos para primates (Torda *et al.*, 1980). De este grupo de arañas fueron aislados los péptidos conocidos como atracotoxinas (ACTXs). Dentro de las ACTXs las que son letales, y provocan síntomas de envenenamiento, son las  $\delta$ -ACTXs que se unen específicamente al sitio 3 de canales  $\text{Na}_v$ . Las  $\delta$ -ACTXs son péptidos compuestos por 42 aminoácidos de los cuales ocho son cisteínas. Existen dos estructuras tridimensionales resueltas por resonancia magnética nuclear (NMR), la de la  $\delta$ -ACTX-Hv1a (Fletcher *et al.*, 1997) y la  $\delta$ -ACTX-Ar1a (Pallaghy *et al.*, 1997) y presentan un plegamiento en una hoja beta triple antiparalela y en el caso de la  $\delta$ -ACTX-Hv1a una hélice  $3_{10}$  en el extremo carboxilo terminal.

Los estudios electrofisiológicos han demostrado que las  $\delta$ -ACTXs alteran la excitabilidad neuronal tanto en insectos como en mamíferos prolongando la duración del potencial de acción. Lo anterior resulta en potenciales planos y disparos espontáneos repetitivos. Estas toxinas producen el retardamiento selectivo de la inactivación de los canales  $\text{Na}_v$  TTX sensibles y la reducción en el pico de la corriente. Además, estas toxinas causan un modesto corrimiento hiperpolarizante en la activación dependiente del voltaje (Nicholson *et al.*, 1994). Esto indica que estas toxinas interactúan con el sitio 3 para inhibir la conversión del canal de sodio del estado abierto al inactivo resultando en una corriente remanente a potenciales de membrana en los que la inactivación esta normalmente completa. La toxina  $\delta$ -ACTX-Hv1a fue probada en ensayos de competencia con la toxina de alacrán Lqh-II comprobando que se une de manera similar a esta al sitio 3 de canales de sodio (Gilles *et al.*, 2002). Interesantemente, además de ser tóxicas para mamíferos, las ACTXs causan parálisis en insectos de manera muy semejante a la toxina Lqh $\alpha$ IT y también la desplazan en ensayos de competencia. Estas toxinas no comparten homología ni en secuencia, ni en estructura con las toxinas de alacrán o de anémona de mar. Desafortunadamente los estudios de la relación estructura-función de las ACTXs no se ha determinado directamente ya que no hay reportes de este tipo de toxinas expresadas heterológamente ni de mutantes recombinantes o sintéticas.

### La toxina Magi 4

Al igual que las ACTXs, Magi 4 es un péptido tóxico tanto para insectos como para mamíferos y comparte una identidad estructural y de secuencia considerable con aquellas. En ensayos de competencia en canales  $Na_V$  desplaza a la toxina Lqh $\alpha$ IT del sitio 3 de canales de insecto, pero se une de manera distinta de las ACTXs a los canales  $Na_V$  de mamíferos ya que no desplaza a la toxina de alacrán Lqh-II en ensayos de competencia en sinaptosomas de rata (Corzo *et al.*, 2003). Aún así, Magi 4 retarda la inactivación de canales  $Na_V$  de neuronas de rata DRG de manera análoga a las  $\delta$ -ACTXs (Gunning *et al.*, 2003). Magi 4 es un péptido de 43 aminoácidos de los cuales 8 son cistinas que forman 4 puentes disulfuro. Estructuralmente pertenece a la familia de los péptidos con plegamiento ICK (Inhibitor Cystein Knot) ver figura A-1B. La dosis letal ( $LD_{50}$ ) para ratones es de 0.5  $\mu$ g/20g y para larvas de lepidópteros de 20 pmol/larva. En la tabla A-1 se muestran los resultados de los ensayos de unión de las toxinas Magi resaltando en rojo los datos obtenidos para Magi 4 (Corzo *et al.*, 2003).

### Expresión de Magi 4

El sistema de expresión con el que se decidió trabajar fue el que permitiera cumplir con las características principales de los trabajos reportados con éxito para la obtención de péptidos solubles, por lo que se eligió la fusión a la proteína glutatión-S-transferasa (GST) que se construyó en el vector de expresión pGEX-5X. El vector de expresión codifica además de la GST para el sitio de corte para al FXa antes del gen que se quiere expresar. Además del FXa se generó el sitio de corte para la proteasa enterokinasa inmediatamente antes de Magi 4 por lo que la proteína GST podía ser separada de la toxina Magi 4

A

```

                                     GAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC 28
GGGGAGAGCAAGTTCAGAAACAGATCCTTGCACAGGAAGTCTCTGCTTACGTCTCCGAT 88
ATGAAGACCTTAGTGATTGCTTGCCTTGCCTTTGGTGTCTGGTGGTTGTACATGGCGAGGTG 148
M K T L V I A C V A L V L V V V H G E V 20
ATTGAAGAAGTGAATGAAAAACAACCTCAAGAAAGTGTGAAGAGAAGTACTCACTTTTG 208
I E E V N E K Q L Q E S V E E K Y S L L 40
CAGAGACTGGAAAAGCTTGACGAAGCTATCACGGCAGAAAGAAAACAGAAACTCTCGTGTA 268
Q R L E K L D E A I T A E E N R N S R V 60
AGGCGTTGCGGCAGCAAGAGAGCTTGGTGTAAAGAAAAGAAAGACTGCTGCTGCGGATAT 328
R R C G S K R A W C K E K K D C C C G Y 80
AACTGCGTCTATGCCTGGTACAATCAACAGTCTTCTTGCAGAAAGGAAATGAAATATCTT 388
N C V Y A W Y N Q Q S S C E R K W K Y L 100
TTCACAGGTGAGTGCTAAAATACCTGAAAACGGCGAACGACATTCTTAAAATCTTAAAA 448
F T G E C * 105
AAGAAAATTGTATTAATAATACGTAACCTTTGTCAAGCAGTATTCTGCTAAAGAAGCTTC 508
ATTAATAATTTTGAAGACCTAAAAAATAAAAAAAAAA 538

```

B

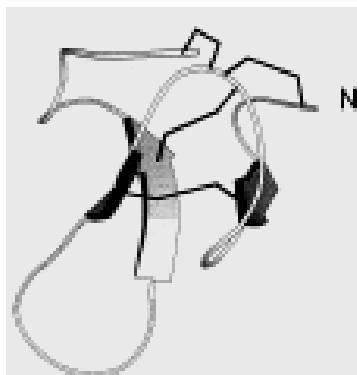


Figura A-1. A) Secuencia que codifica para la toxina magi 4 obtenida a partir de una clona de un banco de ADNc y B) ejemplo del motivo ICK estructura típica de toxinas de araña.

Tabla A-1. IC<sub>50</sub> determinada por ensayos de competencia de las toxinas de la araña *Macrothele gigas* con las correspondientes de alacrán específicas para diferentes sitios farmacológicos en canales de sodio

Peptide	BjTxr (site4,insects)	Css4 (site4,rat)	Lqh-alpha-IT (site3,insects)	Lqh2 (site3,rat)	TxVIA (site6,rat)
			IC <sub>50</sub> (nM)		
Magi1	>1000	>500	1747	>1000	>1000
Magi2	>1000	>500	21	>1000	>1000
Magi3	>1000	>500	1718	>1000	>1000
<b>Magi4</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>&gt;500</b>	<b>0.05</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>&gt;1000</b>
Magi5	>1000	1.2	>500	>1000	>1000
Magi6	>1000	>500	>500	>1000	>1000

con cualquiera de las dos proteasas. Una vez clonado el gen de Magi 4, se expresó la proteína de fusión obteniéndola en la fracción insoluble, siendo recuperada después de romper las células a partir de cuerpos de inclusión como se describió en **Materiales y métodos** para HisrCssII. En el caso de ésta proteína la solución de extracción fue: Tris 50 mM, Urea 0.5 M a pH 8. Aunque la cantidad de proteína de fusión en el extracto es considerable, como se observa en la figura A-2A, después de la purificación por afinidad con GST siguiendo las recomendaciones del proveedor no se obtuvieron buenos rendimientos y aunque se probaron digestiones con FXa la cantidad de proteína que se obtuvo no fue suficiente para continuar con la caracterización de la toxina recombinante. Ver figura A-2B.

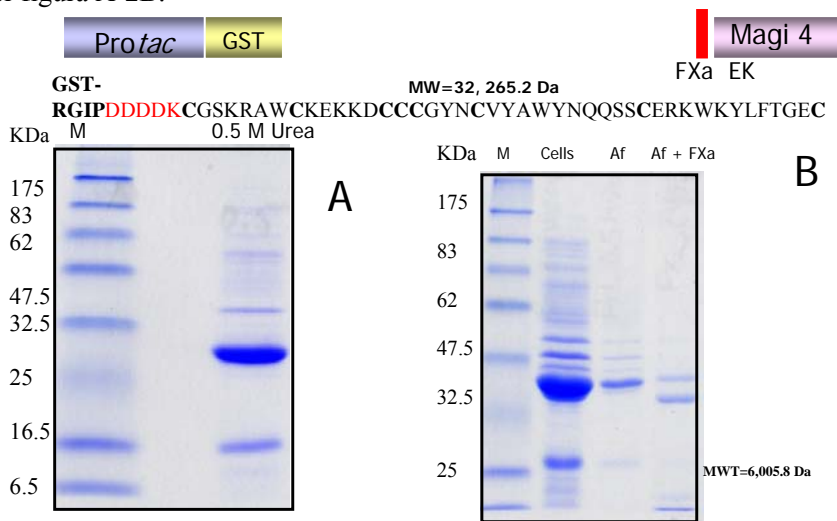


Figura A-2. Diagrama de la estructura génica para la expresión de Magi 4 fusionada a GST. Estructura primaria de Magi 4, en rojo están los aminoácidos que reconoce la enterokinasa. En el gel A podemos observar que la proteína de fusión es la mayoritaria en la extracción con 0.5 M de urea. En el gel B se aprecia el bajo rendimiento después de la purificación por afinidad (Af), así como el cambio en el tamaño de la proteína de fusión cuando se corta con FXa y la aparición de una proteína de bajo peso molecular con la masa molecular correspondiente a Magi 4.

Otro sistema de expresión utilizado fue el descrito en los resultados de la tesis en la expresión de CssII, con el vector pQE-30. Las condiciones para la clonación y expresión son idénticas a las descritas en **Materiales y métodos** en su sección correspondiente que se describió para la toxina CssII. Se trabajó con la construcción previa con enterokinasa para realizar el corte proteolítico, sin embargo, este péptido se cortaba inespecíficamente ya que al purificar los producto de la proteólisis por HPLC y determinar las masas de las fracciones obtenidas se obtuvieron masas de péptidos y secuencias del amino terminal que correspondían con cortes dentro de la secuencia de la toxina. La proteína de fusión expresada se observa en la figura A-3. Como para CssII, se obtuvo una construcción de Magi 4 en pQE-30 donde el sitio de corte proteolítico para FXa se generó con el oligonucleótido que va de 5' a 3' codificando a los aminoácidos IEGR e inmediatamente después la primera cisteína de la toxina. Con este sistema se obtuvieron mayores rendimientos después de la purificación por afinidad lo cual permitió seguir trabajando con el péptido, para realizar ensayos de toxicidad y evaluar su estructura. El sistema en general funciona como para la toxina CssII obteniendo buenos rendimientos de proteína, y algunas fracciones tóxicas a ratones con la toxina recombinante que adopta verios patrones de puentes disulfuro, lo cual se puede observar en la figura A-4. Aunque se probaron muchas condiciones de plegamiento *in vitro* para intentar obtener una fracción homogénea esto no fue posible para el péptido Magi 4.

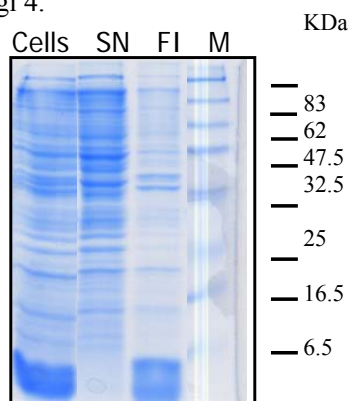


Figura A-3. SDS-PAGE al 15%. Se observa la expresión de la proteína de fusión HisrMagi 4 con 6 histidinas y el sitio de corte para FXa como la mancha abajo de la banda que corresponde a 6.5 KDa del marcador de peso molecular. Cells.- indica células completas, SN.- sobrenadante después de romper y centrifugar que corresponde a proteínas solubles. FI.- fracción insoluble después de romper, centrifugar y lavar el precipitado. M.- marcador de peso molecular.

Una vez purificada y después de varios intentos para plegar la toxina Magi 4 *in vitro*, se realizó la comparación de los espectros de dicroísmo circular entre algunas fracciones con toxicidad y se comparó con la toxina sintética plegada anteriormente. Los resultados indican que la estructura secundaria de cualquier forma en que se pliega la proteína recombinante es muy diferente al espectro que corresponde a la estructura ICK en la que está plegada la Magi 4 sintética. Por estos motivos se decidió utilizar este sistema de expresión y purificación de toxinas recombinantes ahora expresando una toxina de

importancia médica como lo es CssII. Además de su estructura primaria estas dos toxinas difieren en su estructura tridimensional, en longitud de la cadena polipeptídica y en los arreglos de cisteínas que son determinantes para el plegamiento de las proteínas. Es evidente que la experiencia adquirida durante los intentos por obtener a la toxina Magi 4 recombinante con una estructura y función adecuada fueron muy importantes para determinar las condiciones para la expresión de CssII.

Hasta este momento sabemos que la expresión de toxinas con pQE-30/BL21 no es un sistema general y aunque la expresión funciona bien para toxinas de 43 a 70 aminoácidos, el paso limitante en este sistema de expresión es el plegamiento *in vitro*.

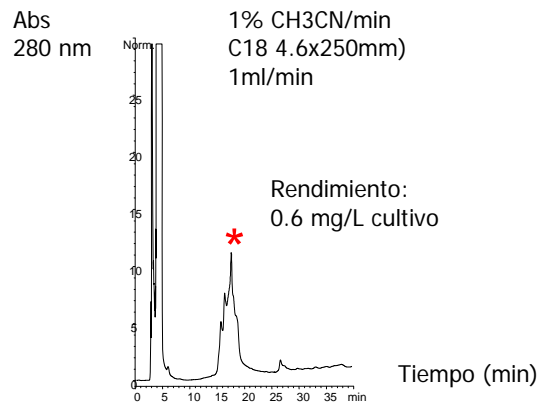


Figura A-4. Perfil de HPLC de la proteína de fusión HisrMagi 4 después de purificar por afinidad. Las masas moleculares corresponden al valor teórico esperado para el mismo péptido oxidado. El asterisco indica la fracción tóxica.

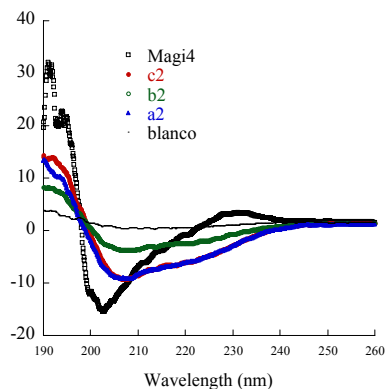


Figura A-5. Espectros de dicroísmo circular de la toxina Magi 4 sintética que corresponde al motivo ICK. Los espectros a2, b2, c2 son los que presentan fracciones de la proteína de fusión después del plegamiento *in vitro* que no muestra los motivos típicos de la estructura secundaria esperada. La pureza de la proteína es de aprox. 95% y la concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ .  
Expresión de la toxina Ts1

Una vez que se obtuvo la toxina recombinante CssII se clonó el gen de la toxina Ts1 también conocida por otros nombres como TsVII o Ts $\gamma$  debido a la falta de una nomenclatura sistemática y los múltiples reportes que se encuentran en las bases de datos. La toxina Ts1 es una toxina de 61 aminoácidos, de tipo  $\beta$  que se ha reportado como el componente más tóxico del veneno del alacrán de Brasil *Tityus serrulatus*. Este alacrán es el más importante por ser el causante de la mayoría de los casos graves de intoxicación por picadura de alacrán en Brasil (Possani *et al.*, 1985). Se sabe que la toxina Ts1 compite por el mismo sitio en los canales de sodio que la toxina CssII, pero su toxicidad en mamíferos es mayor ya que su dosis letal determinada por vía intracraneal es de 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Se ha reportado actividad preferencial sobre el subtipo de canal de sodio Nav 1.4, sin embargo se sabe que también afecta al 1.2 y por el desplazamiento de CssII al 1.6. No se ha determinado su especificidad en todos los subtipos de canales, pero se conoce su estructura tridimensional determinada por cristalografía de rayos X (Pinheiro *et al.*, 2003) y ha sido objeto de múltiples estudios fisiológicos e inmunológicos buscando poder disminuir los casos de muerte que se dan por las intoxicaciones en humanos. En ese sentido la expresión en sistemas bacterianos con la recuperación del péptido correctamente plegado se considera indispensable si en México, hay una escasa o nula disponibilidad de alacranes para la obtención de la toxina nativa y la incapacidad de generar variantes que permitan el estudio de la relación estructura-función.

A pesar de que comparten el sitio de unión a su receptor Ts1 y CssII presenta solo 30% de identidad de secuencia de aminoácidos incluyendo a las 8 cisteínas que forman 4 puentes disulfuro, siendo además diferentes en la longitud de las asas que unen a la estructura  $\alpha/\beta$  estabilizada por cisteínas.

Ts1 KEGYLM DHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC\*

## Resultados.

Aunque la expresión de la toxina Ts1 se realizó en el mismo esquema que CssII a diferencia que para este gen se optimizaron todos los codones para el uso preferencial de *E. coli*. Esta toxina expresada en pQE-30/BL21(DE3) también forma cuerpos de inclusión, por lo que se recupera la proteína de fusión (HisrTs1) de la fracción insoluble después de romper las células. La purificación se realizó de manera idéntica que la recombinante HisrCssII con rendimientos muy semejantes. Las diferentes fracciones celulares después de romper en prensa de French, así como la proteína pura se muestran en la figura A-6A. Al igual que con HisrCssII se obtienen varios patrones de puentes disulfuro, y al reducir la proteína con 50 mM de DTT se observa un cambio en el perfil de HPLC correspondiente a la proteína de fusión reducida, ver figura 6B. La diferencia sustancial en los resultados obtenidos fue que el plegamiento *in vitro* se da en condiciones distintas al de HisrCssII y el proceso no es tan eficiente obteniendo alrededor del 10% del péptido correctamente plegado. Se probaron inicialmente las mismas condiciones que para HisrCssII, pero fue necesario modificar el tiempo y la concentración de proteína utilizada obteniendo, de cualquier modo, varias fracciones en el perfil de HPLC después del plegamiento, las diferentes fracciones obtenidas se muestran en la figura A-7 donde se indica la fracción más tóxica como proteína de fusión y se superpone el cromatograma con el de la nativa (nTs1). Las condiciones de plegamiento para HisrTs1 fueron: 2M GndHCl, 50mM tris-base, 1mM



GSH/ 0.1mM GSSG a pH 8 durante 72 h. Esto es evidencia de que las condiciones de plegamiento son diferentes para cada toxina y es un dato que soporta que la estructura primaria es determinante para obtener un péptido correctamente plegado. Las mismas condiciones fueron probadas reduciendo a la toxina nTs1. Con este ensayo se comprobó que se obtienen varias formas de disulfuros al plegar *in vitro*. De manera semejante a los resultados obtenidos con HisrCsslI, podemos concluir que los 16 aminoácidos en el extremo amino terminal no tienen una influencia importante sobre el plegamiento *in vitro*.

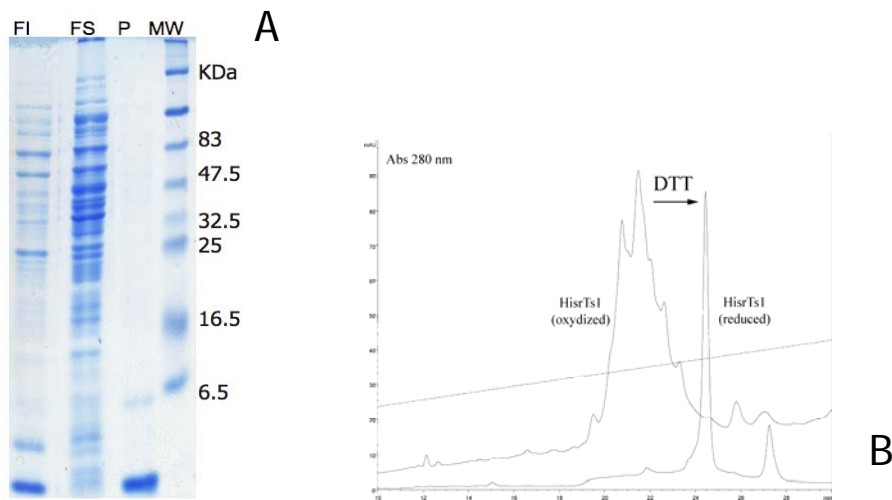


Figura A-6. A) Gel SDS-PAGE al 15% donde se muestra que la proteína sobreexpresada HisrTs1 se encuentra mayoritariamente en la fracción insoluble de la células (FI), y no en la fracción soluble (FS). La proteína de fusión HisrTs1 purificada por afinidad (P) con Ni-NTA agarosa en condiciones desnaturizantes, y MW.- es el marcador de peso molecular. B) Superposición de perfiles de HPLC de la proteína de fusión HisrTs1 oxidada y la misma reducida con 50 mM de DTT.

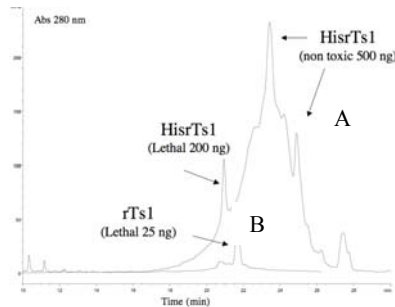


Figura A-7. Superposición de los cromatogramas obtenidos en la separación por HPLC de las fracciones que se obtienen del plegamiento *in vitro* de HisrTs1(A) y la toxina recombinante después del corte proteolítico con FXa (B). La toxicidad de las fracciones por vía intracraneal se indica entre paréntesis. La fracción que se sometió al corte corresponde a la que fue más tóxica como HisrTs1, su toxicidad aumentó en un orden de magnitud al cortarla con FXa.

## Referencias

- Corzo G, Gilles N, Satake H, Villegas E, Dai L, Nakajima T, Haupt J. 2003. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. FEBS Letters. 547:43-50.
- Fletcher JI, Chapman BE, Mackay JP, Howden MEH, King GF. 1997. The structure of versutoxin ( $\delta$ -atracotoxin-Hv1): implications for binding of site 3 toxins to the voltage-gated sodium channel. Structure 5:1525-1535.
- Gilles N, Harrison G, Karbat I, Gurevitz M, Nicholson GM, Gordon D. 2002. Variations in receptor site 3 on rat brain and insect sodium channels highlighted by binding of a funnel-web spider -atracotoxin. Eur J Biochem. 269:1500-1510.
- Gunning SJ, Chong Y, Khalife AA, Hains PG, Broady KW, Nicholson GM. 2003. Isolation of delta-missulenatoxin-Mb1a, the major vertebrate-active spider delta-toxin from the venom of *Missulena bradleyi* (Actinopodidae). FEBS Lett. 554:211-8.
- Nicholson GM, Willow M, Howden MEH, Narashi T. 1994. Modification of sodium channel gating and kinetics by versutoxin from the Australian funnel-web spider *Hadronyche versuta*. Pflugers Arch. 428:400-9.
- Pallaghy PK, Alewood D, Alewood PF, Norton RS. 1997. Solution structure of robustoxin, the lethal neurotoxin from the funnel-web spider *Atrax robustus*. FEBS Lett. 419:191-6.
- Pinheiro CB, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I. 2003. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na<sup>+</sup> channels Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 59:405-415
- Possani LD, Martin BM, Svendsen I, Rode GS, Erickson BW. 1985. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Biochem J. 229: 739-750.
- Torda TA, Loong E, Greaves I. 1980. Severe lung edema and fatal consumption coagulopathy after funnel-web bite. Med J Aust. 18:442-4.